

**TESIS DE MASTER**

**USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES  
(SSRs) PARA EL ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD  
MOLECULAR Y LA IDENTIFICACIÓN DE LAS  
VARIETADES DE OLIVO DEL BANCO DE  
GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” (SFAX,  
TÚNEZ)**

**MAHDI FENDRI**

**Córdoba, Octubre 2008**



Tesis presentada para optar al título de MASTER OF SCIENCE en Olivicultura y Elaiotecnia por Mahdi Fendri, bajo la dirección de los doctores Juan de Dios Alché Ramírez e Isabel Trujillo Navas.

Alumno:

Fdo:

Mahdi Fendri

V°D° Directores:

Fdo:

Fdo:

Dr. Juan de Dios Alché Ramírez  
Científico Titular del CSIC  
Estación Experimental del Zaidín

Dra. Isabel Trujillo Navas  
Profesora Producción Vegetal  
Universidad de Córdoba

**Córdoba, Octubre 2008**



Este trabajo ha sido realizado conjuntamente en el Grupo de Biología Reproductiva de Plantas del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C) y en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, gracias a la concesión de una beca de postgraduado de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID). Dicho trabajo ha sido financiado por los proyectos MEC BFU 2004-00601/BFI y Junta de Andalucía P06-AGR-01791.



A mi familia



# **AGRADECIMIENTOS**



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

En primer lugar, me gustaría brindarle mi más sincero agradecimiento a mis directores, el Doctor Juan de Dios Alché y la Doctora Isabel Trujillo Navas que han puesto a mi disposición enormes capacidades de trabajo y múltiples recursos para la realización de este trabajo. Gracias por haber depositado su confianza en mí y por ofrecerme la oportunidad de trabajar en sus respectivos grupos.

Quiero dedicar una mención especial a la Doctora M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez por su supervisión y valiosos consejos.

Agradezco al Doctor Luis Rallo el haber puesto a mi disposición los recursos y la experiencia del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Deseo manifestar un profundo agradecimiento a los Doctores Roberto de la Herrán Moreno y AbdelMounim Hamman-Khalifa del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Les agradezco su ayuda y consejos en los temas relacionados con el análisis de los microsátélites

Agradezco al “Institut de l’olivier” (Túnez) y especialmente al Doctor Ahmed Trigui el haber puesto en mi disposición todos los recursos genéticos de la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughara” de Sfax (Túnez). También a Hsan Belguith y Abdelmajid Yengui les agradezco su ayuda en la recolección de las muestras.

A la Doctora M<sup>a</sup> Concepción Muñoz Díez por su generosidad y su valiosa ayuda en el análisis estadístico, y a todo el grupo del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba por su colaboración incondicional.

Igualmente, agradezco a todo el Grupo de Biología Reproductiva de Plantas el aceptarme como compañero. Vuestra amistad me ha dado ánimo y voluntad.

No tengo palabras para agradecer a mi querida familia, especialmente a mi padre y a mi madre, también a Sahla, Emna, Amine y Yousef, su respaldo y el haber sido siempre fuente de ánimo y de aliento.

Y por último quisiera agradecer a Yara haber sido siempre a mi lado, gracias por todo tu cariño y apoyo.





## **RESUMEN**



La olivicultura es una de las actividades más antiguas que ha desarrollado el hombre a través de su historia. Como consecuencia, la mayoría de los países olivareros tradicionales disponen, hoy día, de un patrimonio genético importante constituido principalmente de cultivares autóctonos. Antes de los 90 del siglo pasado, no se dedicaba un gran esfuerzo para el estudio de las variedades de olivo en Túnez. Sin embargo, tras la aparición de una olivicultura moderna, la identificación, la evaluación y la conservación de los recursos genéticos locales constituyen una gran prioridad en países como Túnez.

En este trabajo se ha seleccionado un conjunto de 8 marcadores microsátélites, previamente descritos, para el estudio de 84 individuos del Banco de Germoplasma de “Boughrara” de Sfax (Túnez). Dichos marcadores han demostrado gran eficacia, dado que presentan elevado nivel de polimorfismo y salvo en el caso de *ssrOeUA-DCA15* no mostraron la presencia de alelos nulos. Los índices de diversidad genética generados, tales como el número total de alelos (64), el número de alelos por locus (8), los niveles de la heterocigocidad observada y esperada (promedios: 0,77 y 0,68 respectivamente) y el contenido en información polimórfica (media de 0,64) muestran que indudablemente el olivar de Túnez, representado por la colección mencionada, posee una elevada riqueza genética. Además, se detectó la presencia de 6 alelos únicos y de una serie de alelos con baja frecuencia, que pueden considerarse marcadores interesantes para identificar separadamente algunas variedades. El análisis de la probabilidad de identidad (probabilidad acumulada:  $1,23 \times 10^{-7}$ ) permitió evaluar la capacidad discriminativa de los marcadores utilizados por separado y conjuntamente. Los marcadores *UDO99-43*, *GAPU101*, *ssrOeUA-DCA16* y *ssrOeUA-DCA18* fueron capaces por sí solos de discriminar el 82,5% del total de genotipos identificados con el conjunto de los 8 microsátélites.

La utilización de nombres genéricos por los olivareros de Túnez para designar a las variedades, y la probable existencia de algunos errores de identificación han generado la presencia de sinonimias y homonimias en el Banco de Germoplasma de “Boughrara” de Sfax (Túnez). Según el presente estudio, sólo el 47,6% de las accesiones analizadas representan genotipos distintos (se identificaron 40 genotipos del total de 84 accesiones). De hecho, el presente trabajo puede servir de base para un mejor

manejo del Banco en cuestión y, además permitirá suministrar material con garantías de autenticidad varietal a la industria viverística actualmente en auge.

Finalmente, se realizaron diversos análisis que han permitido establecer las relaciones genéticas existentes entre los distintos genotipos identificados y también realizar un análisis factorial de correspondencia para caracterizar las tendencias de agrupación entre los mismos. El análisis de las relaciones genéticas demostró la presencia de 4 grupos cladísticos con un buen grado relativo de relación o parentesco interno así como 5 variedades separadas genéticamente, probablemente debido a sus orígenes distintos, y en las que se detectó la presencia de alelos únicos o con baja frecuencia. Por otro lado, se manifestó la existencia de una pequeña variabilidad intra-varietal posiblemente debida a la presencia de mutaciones somáticas, especialmente en cultivares ampliamente difundidos como ‘Chemlali Sfax’.

El análisis factorial de correspondencia demuestra la aparición de una tendencia de separación genética que se revela claramente en las variedades destinadas a la elaboración de aceituna de mesa. Es muy probable que esta separación genética sea la consecuencia de una prologada selección de genotipos distintos según las necesidades del agricultor a lo largo de la historia olivarera de Túnez. Sin embargo, no se pudo constatar ninguna separación genética según la zona de origen de cada una de las variedades, quizá debido a la continuidad geográfica entre las principales regiones olivareras del país, que ha favorecido el intercambio genético.

Las características morfológicas de los endocarpos han sido también analizadas en detalle. Estas características confirman los datos obtenidos a partir de los marcadores SSR, especialmente en cuanto a la amplia variabilidad en la colección, la existencia de sinonimias y homonimias, y la separación de los cultivares en función de su destino para aceite o mesa.





## **SUMMARY**



Olive cultivation is one of the oldest activities developed by humans in the course of the History. As a consequence, most of the traditional olive producing countries have, nowadays, a diversified genetic patrimony which is mainly formed by autochthonous cultivars. Before the 90s of the previous century, no notable effort has been made to study olive cultivars in Tunisia. However, since the emergence of the modern oliviculture, the identification, the evaluation and conservation of the local genetic resources have been considered as a priority in countries like Tunisia.

In this work, a set of 8 previously-described microsatellite markers has been selected in order to analyse 84 olive accessions provided by the “Boughrara” (Sfax, Tunisia) Germoplasm Bank. The mentioned markers showed a good efficacy, since they displayed a high level of polymorphism, and no null allele presence was reported, except in the case of *ssrOeUA-DCA15*. The genetic diversity indexes generated in this report, like the total number of alleles (64), the number of alleles per locus (8), both the observed and the expected heterozygosity levels (averages of 0,77 and 0,68, respectively) and the polymorphic information content (average of 0,64), undoubtedly show that Tunisian olives, represented by this germplasm collection, possess a high degree of genetic diversity. Furthermore, 6 unique- and several low-frequency- alleles were detected, which can be considered markers of interest to separately identify several cultivars. The analysis of the probability of identity (cumulated probability:  $1,23 \times 10^{-7}$ ) allowed us to evaluate the discrimination power of the markers either used individually or in combination. The *UDO99-43*, *GAPU101*, *ssrOeUA-DCA16* and *ssrOeUA-DCA18* markers were able by themselves to discriminate a 82,5% of the whole genotypes identified by the 8 microsatellites markers all together.

The use of generic names by Tunisian olive growers to name cultivars, together with some miss-identifications, have generated the presence of synonymy and homonymy cases within the “Boughrara” (Sfax, Tunisia) Germoplasm Bank. According to the present study, only 47,6% of the analysed accessions represent unique genotypes (40 genotypes were identified among 84 accessions). In fact, the present study may provide support for a better management of the mentioned Germoplasm Bank and it will be useful to provide cultivar-guaranteed plant material to the currently rising plant nursery industry.

Finally, several statistic analyses have allowed us to establish the genetic relationships existing between the different genotypes identified, and also to perform a factorial analysis of correspondence to characterize clustering tendencies. The analysis

of the genetic relationships showed the presence of 4 cladistic groups with a good level of internal relationship, as well as 5 genetically separated cultivars, probably as a consequence of their different origins, which contained unique or low frequency alleles. On the other hand, the existence of a small intra-cultivar variation was detected, possibly due to the presence of somatic mutations, particularly in some widely spread cultivars like 'Chemlali Sfax'.

The correspondence factorial analysis has shown the appearance of a tendency of genetic separation clearly revealed among the cultivars destined to olive table consumption. This genetic drift is most likely a consequence of the prolonged selection of different genotypes according to farmers' needs throughout olive History in Tunisia. However, no genetic separation has been reported on the basis of the geographical origin of the different cultivars, perhaps as the result of the geographical continuity of the olive-growing regions of the country, which has contributed to the genetic interchange.

The morphological characteristics of the fruit endocarps have also been analyzed in detail. These characteristics confirm the data obtained after the analysis of SSR markers, especially as regards to the wide variability in the collection, the existence of synonyms and homonyms, and the genetic separation based on cultivars uses (table/oil).





# ÍNDICE GENERAL



Agradecimientos.....	i
Resumen.....	vii
Summary.....	xiii
Índice General.....	xix
Índice de Figuras.....	xxv
Índice de Tablas.....	xxxí
Lista de Abreviaturas.....	xxxv

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. HISTORIA DEL OLIVO EN EL MUNDO Y DIFUSIÓN DEL CULTIVO.....	3
2. SELECCIÓN Y ORIGEN DE LAS VARIEDADES DE OLIVO.....	4
3. EL OLIVO EN TÚNEZ.....	5
3.1. Historia.....	5
3.2. Particularidades.....	6
3.3. Recursos genéticos y estructura varietal de olivar de Túnez .....	10
4. BANCOS DE GERMOPLASMA.....	14
5. IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES EN EL OLIVO.....	15
5.1. Los caracteres morfológicos y/o agronómicos.....	15
5.2. Marcadores moleculares.....	19
5.2.1. Los isoenzimas.....	19
5.2.2. Los marcadores de ADN.....	20
- Los marcadores RFLPs.....	20
- Marcadores de ADN amplificados por PCR.....	21
✓ Los marcadores RAPDs.....	21
✓ Los marcadores AFLPs.....	22
✓ Los marcadores tipo SCARs.....	22
✓ Los marcadores microsatélites o SSRs.....	23
<b>II. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....</b>	<b>27</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>

<b>1. MATERIAL VEGETAL.....</b>	<b>33</b>
<b>2. MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
- Recolección de hojas para la extracción de ADN genómico.....	34
- Extracción de ADN de las hojas.....	35
- PCR-SSRs.....	35
- Análisis de los microsatélites.....	36
- Descripción morfológica de los endocarpos.....	41
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>1. VARIABILIDAD SSRs EN LAS ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ.....</b>	<b>45</b>
1.1. Número, rango de tamaño y frecuencias de los alelos obtenidos.....	45
1.2. Índices de Heterocigosidad y Contenido en información polimórfica de los SSRs.....	49
<b>2. DISCRIMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ.....</b>	<b>52</b>
<b>3. SINONIMIAS Y HOMONIMIAS DETECTADAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ.....</b>	<b>57</b>
3.1. Sinonimias.....	58
3.2. Homonimias.....	61
<b>4. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE VARIEDADES.....</b>	<b>62</b>
4.1. Análisis de grupos.....	62
4.2. Análisis Factorial de Correspondencia.....	68
<b>5. DISCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ENDOCARPOS.....</b>	<b>72</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>





## **ÍNDICE DE FIGURAS**



<b>Figura 1.</b> Difusión del cultivo del olivo en el mundo.....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Situación geográfica de las provincias productoras de aceituna en Túnez.....	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Distribución por municipios de pies de olivo en Túnez.....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Distribución geográfica de variedades autóctonas de olivo de Túnez.....	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Caracteres morfológicos de la variedad más importante en el Sur de Túnez ‘Chemlali Sfax’ .....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Caracteres morfológicos de la variedad más importante en el Norte de Túnez ‘Chétoui’ .....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Ejemplo de visualización de los productos de la amplificación SSR en el locus DCA9.....	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Fluorogramas analizados con el programa GENOTYPER para el SSR UDO99-43 en 8 accesiones evaluadas .....	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Fluorogramas analizados con el programa GENEMAPPER para los SSR DCA18, DCA3, DCA16, DCA15, DCA9, GAPU71B y GAPU101 en 4 accesiones evaluadas .....	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Dendrograma obtenido para los 40 genotipos definidos en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax.....	<b>64</b>
<b>Figura 11.</b> Análisis Factorial de Correspondencia según el destino del fruto (mesa, mixto, aceite) de los 40 genotipos evaluados .....	<b>70</b>
<b>Figura 12.</b> Análisis Factorial de Correspondencia según la procedencia geográfica de los 40 genotipos evaluados.....	<b>71</b>
<b>Figura 13.</b> Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos perteneciente a las 31 accesiones de la variedad ‘Chemlali Sfax’ definidas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax.....	<b>74</b>
<b>Figura 14.</b> Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos perteneciente a las 24 accesiones correspondientes a las 10 variedades: ‘Fakhari Tataouine’, BL2, ‘Injassi Hchichina’, ‘Chemlali Chouamekh’, ‘Chétoui’, ‘Chemlali Zarzis’, ‘Khechinet Sig’, ‘Marsaline’, ‘Chemlali Sig’ y ‘Chemchali Gtar’ definidas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax.....	<b>75</b>

- Figura 15.** Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos de las 29 accesiones que no se encuentran duplicadas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax. Para cada una de ellas se indica el número del genotipo al que pertenece..... **76**
- Figura 16.** Fotografías de los endocarpos para cada uno de los genotipos de la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax clasificados molecularmente ..... **78**





## **ÍNDICE DE TABLAS**



<b>Tabla 1.</b> Denominaciones de las 84 accesiones analizadas y procedencia geográfica de cada una de ellas.....	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Serie, motivo repetitivo y secuencias de los cebadores (Forward y Reverse), tamaño esperado (en pb) y temperatura de hibridación para los 8 microsatélites analizados.....	<b>35</b>
<b>Tabla 3.</b> Tamaño (expresado en pb), y frecuencia (expresada en %) de los alelos obtenidos en los diferentes loci analizados en la totalidad de los individuos..	<b>46</b>
<b>Tabla 4.</b> Alelos presentes en una accesión y alelos presentes en dos o tres accesiones obtenidos para los 8 SSR evaluados.....	<b>48</b>
<b>Tabla 5.</b> Heterozigosidad esperada ( $H_E$ ), Heterozigosidad observada ( $H_O$ ), Frecuencia de alelos nulos ( $F_0$ ), Número de heterocigotos y Número de homocigotos en la población para cada uno de los locus estudiados.....	<b>50</b>
<b>Tabla 6.</b> Contenido en información polimórfica (PIC) para los SSRs evaluados.....	<b>52</b>
<b>Tabla 7.</b> Perfiles alélicos y genotipos diferentes obtenidos para las 84 accesiones evaluada.....	<b>53</b>
<b>Tabla 8.</b> Probabilidad de Identidad (PI) en las 84 accesiones analizadas.....	<b>57</b>
<b>Tabla 9.</b> Sinonimias detectadas en la colección.....	<b>58</b>
<b>Tabla 10.</b> Número y distribución por procedencia geográfica de las sinonimias detectadas en la colección.....	<b>61</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**



**ADN** (Desoxyribonucleic acid): Ácido desoxiribonucleico.

**AFLPs** (Amplified fragment length polymorphism PCR) Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR.

**COI** (International Olive Oil Council). Consejo oleícola internacional

**CTAB** (Cetyl trimethylammonium bromide) Bromuro de cetil-trimetilamonio.

**dNTPs** (Deoxynucleosides) Desoxinucleótidos trifosfato.

*f* (Allele frequency) Frecuencia del alelo.

**F<sub>0</sub>** (Null allele frequency estimate) Frecuencia estimada de alelos nulos.

**H<sub>E</sub>** (Expected heterozygosity) Heterocigosidad esperada.

**H<sub>O</sub>** (Observed heterozygosity) Heterocigosidad observada.

**ISSRs** (Inter-simple sequence repeats) Inter-secuencias simples repetidas.

**PCR** (Polymerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa.

**PI** (Probability of identity) Probabilidad de identidad.

*r* (Cofenetic coefficient ) Coeficiente cofenético.

**PIC** (Polymorphic information content) Contenido en información polimórfica.

**RAPDs** (Random amplified polymorphic DNA) ADN polimórfico amplificado al azar.

**RFLP** (Restriction fragment length polymorphism) Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

**SCARs** (Sequence characterised amplified regions) Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas.

**SSAPs** (Sequence specific amplification polymorphism) Polimorfismo de la amplificación de secuencias específicas.

**SSRs** (Simple sequence repeats) Repeticiones simples de secuencia.

**STR:** (Short tandem repeat) Repeticiones cortas de tándem.

**STSs** (Sequence- Tagget Sites PCR) PCR de sitios marcados de la secuencia.

**UPGMA** (Unweighted pair group method with arithmetic mean) Método de pares no ponderados usando medias aritméticas.



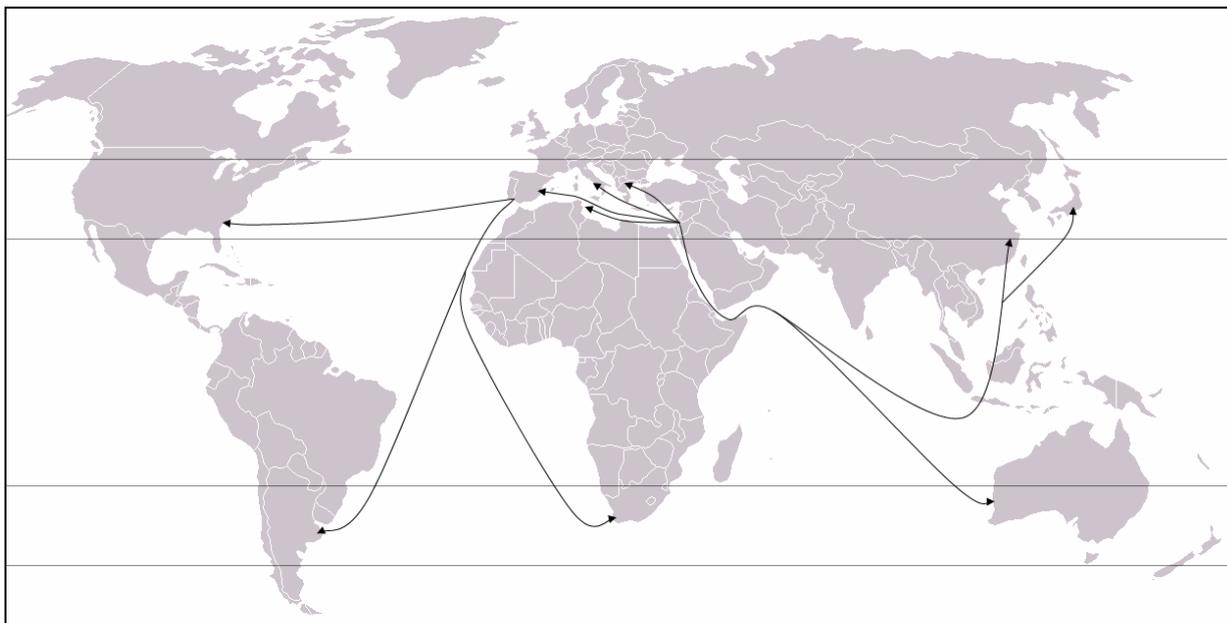
# **I. INTRODUCCIÓN**



## **1. HISTORIA DEL OLIVO EN EL MUNDO Y DIFUSIÓN DEL CULTIVO**

La olivicultura es una de las actividades más antiguas que ha realizado el hombre a través de su historia. El origen del olivo tal como se conoce en la actualidad es un tema de gran debate (Loukas y Krimbas 1983). Las pruebas más antiguas de la existencia del olivo fueron descubiertas en Persia antigua y Mesopotamia y datan de hace 5000 años. La presencia de un ancestro del olivo con una antigüedad de 1 millón de años ha sido también demostrada tras una datación de restos de fósiles en Italia (Kapellakis et al., 2007). La cuenca mediterránea, ámbito principal y tradicional del olivo, ha visto aparecer grandes imperios donde el árbol contribuyó vivamente al desarrollo de la civilización. De esta manera el olivo ocupaba un lugar privilegiado, no sólo a nivel económico sino también a nivel cultural y espiritual. El olivo se consideraba como el árbol sagrado o el símbolo de paz para unos pero también representaba la potencia y la supremacía para otros.

El olivo se difundió de la zona de Oriente Próximo hacia la orilla Este del Mediterráneo y de allí se empezó a propagarse en todas las colonias de la cuenca (Besnard et al., 2001a). La dirección de la difusión del cultivo del olivo en el mediterráneo fue paralela a las vías comerciales establecidas primero por los fenicios y los griegos (De Graaff y Eppink, 1999) y posteriormente por los romanos. Estos últimos jugaron un papel fundamental en el desarrollo del cultivo en la cuenca mediterránea ya que practicaban una propagación masiva del árbol cada vez que ampliaban su imperio. A partir del siglo XV, y con el descubrimiento del nuevo mundo, se amplió el ámbito del cultivo de olivo hacia el continente americano. Más recientemente, se ha introducido el olivo en nuevas zonas como Sudáfrica, China, Japón y Australia (Barranco et al., 2004). La figura 1 representa la difusión del cultivo del olivo en el mundo a lo largo del tiempo.



**Figura 1.** Difusión del cultivo del olivo en el mundo

## **2. SELECCIÓN Y ORIGEN DE LAS VARIETADES DE OLIVO**

Se supone que los primeros olivares empezaron a seleccionar empíricamente de los bosques de acebuches (olivo silvestre), aquellos individuos más sobresalientes por caracteres tales como el tamaño de fruto, productividad y contenido graso. Para obtener plantas idénticas a la madre, utilizaron un sistema de propagación vegetativa basado en la transplantación de grandes propágulos (estacas leñosas, zuecas, estacas-plantón). Este método es la única forma tradicional descrita en la mayor parte de las zonas olivareras clásicas (Caballero y del Río, 2004) y se sigue utilizando con frecuencia hoy día en Túnez (Jardak, 2006). Las primeras variedades de olivo se obtuvieron de esta forma y fueron sometidas posteriormente a una incorporación progresiva de genes mediante introgresión a partir de las poblaciones de acebuches presentes en toda la Cuenca del Mediterráneo (Zohary, 1994). Este fenómeno de hibridación natural permitió la aparición continua de nuevas variedades de olivo. Dichos genotipos generados a partir de la reproducción sexual tienen un área de difusión limitada. Puesto que la propagación de las variedades cultivadas de olivo necesitaba grandes propágulos en la época antigua, la difusión de una nueva variedad tuvo que ser muy lenta. En la mayoría de los países oleícolas, se sigue cultivando una gran diversidad de cultivares cuya difusión está aparentemente limitada en torno a su área de origen (Rallo *et al.*, 2005).

Sin embargo, por otro lado, la importancia del aceite de oliva en la época antigua no sólo como alimento sino como producto farmacéutico y fuente de energía, condujo a una difusión importante en el Mediterráneo (Kapellakis *et al.*, 2007).

### **3. EL OLIVO EN TÚNEZ**

#### **3.1. Historia**

Aunque conoció especialmente la gloria en la época cartaginesa, romana y árabo-musulmana, el olivo ha sido siempre el árbol más cultivado a lo largo de la historia de Túnez. El aceite representaba una fuente primordial de alimento y de energía para los habitantes, mientras que el árbol en sí permitía concretizar el ámbito de influencia política de los imperios (Trigui, 1990).

No se conoce la época exacta de la introducción del olivo en Túnez pero existen evidencias arqueológicas de la presencia de este árbol en el Paleolítico Superior en el Norte de África, ya que se han encontrado restos fosilizados en capas que datan de dicha época (COI, 2007). Según Panestrella, un analista romano, el primer olivo fue introducido a Italia bajo el reino de Lucio Tarquinino Prisco (616 a 578 adC) desde el Norte de África, posiblemente a partir de Trípoli en Libia o del golfo de Gabès en Túnez y, posteriormente, se difundió en toda Italia. Por otra parte, se menciona en escrituras antiguas que cuando los romanos alcanzaron las costas del Norte de África, los habitantes originales sabían ya injertar el olivo y desarrollaban el cultivo en todas las tierras que ocupaban (COI, 2007). Efectivamente, el cultivo del olivo fue mencionado en el libro de las prácticas agronómicas de Magon (III-II siglo adC) uno de los agrónomos más estimados de la antigüedad. También, se menciona que Aníbal ordenó a su ejército plantar olivos en la costa Este durante la segunda guerra púnica (218-202 aC) (Trigui, 1990).

En una época más reciente, la presencia colonial francesa dio un gran impulso al cultivo del olivo en Túnez, que fue acompañada de la introducción de nuevos recursos genéticos que contribuyeron al enriquecimiento del patrimonio ya existente.

La pertenencia de Túnez a grandes imperios donde la olivicultura ocupaba un lugar privilegiado (cartagineses, romanos, árabes, etc...) le ha permitido heredar un patrimonio olivarero importante con respecto a las prácticas de cultivo, a la elaboración de aceite pero sobre todo a los recursos genéticos. También su situación geográfica, en

el encuentro de las grandes vías comerciales de la cuenca mediterránea ha implicado un aporte continuo de material vegetal nuevo (Trigui et al., 1990).

### **3.2. Particularidades**

En Túnez, el olivo ocupa la tercera parte de las tierras de labor con 1.685.000 ha. De ellas, la mayoría (1.667.000 ha), está destinada para olivo de aceite y sólo 18.600 ha para aceituna de mesa (DGPDI, 2006). Túnez posee un olivar generalmente tradicional distribuido especialmente en las zonas semiáridas y áridas del Centro y del Sur del país caracterizadas por unas condiciones edafo-climáticas difíciles. Efectivamente, en la mayoría de dichas zonas, la pluviometría no supera los 300 mm por año y los suelos son arenosos y pobres. Por otra parte, el 97 % del olivar de Túnez se encuentra en régimen de secano (Jardak, 2006).

El olivar encuentra únicamente en las regiones del Norte del país las condiciones óptimas para su desarrollo, con una pluviometría anual superior a 400 mm, un invierno suave (temperaturas superiores a 7°C) y un suelo profundo bien drenado. Sin embargo, las tierras del Norte de Túnez fueron, tradicionalmente, reservadas a otros cultivos como los cítricos, las hortalizas, la vid, los cereales, etc... que se consideraban más rentables, mas apropiados a estas zonas y difíciles de cultivar en las regiones semi-áridas y áridas del Centro y del Sur del país. Efectivamente, los recursos abundantes en agua del Norte fueron muy poco movilizados hacia el desarrollo del cultivo del olivo cuya presencia se concentró en zonas con menor potencial hídrico (Jardak, 2006). No obstante, gracias a las técnicas ancestrales de manejo del suelo, del agua y del cultivo, y también gracias a largos procesos de selección de variedades autóctonas adaptadas a las condiciones extremas, ha sido posible que el olivo sea cultivable y productivo en las zonas del Centro y del Sur del país bajo unas condiciones hídricas y edáficas difíciles (Trigui et al., 2002). Pero con el renovado interés para la olivicultura debido a la subida de los precios del aceite de oliva en el mercado internacional (COI, 2007) y al aumento del consumo local tras la subida del poder adquisitivo en Túnez (INS, 2007), empiezan a ampliarse las plantaciones de olivo en el Norte del país principalmente bajo un régimen intensivo.

En la actualidad, existen en Túnez dos tipos de olivares. El predominante es el olivar tradicional constituido por plantaciones mayoritariamente viejas, que se

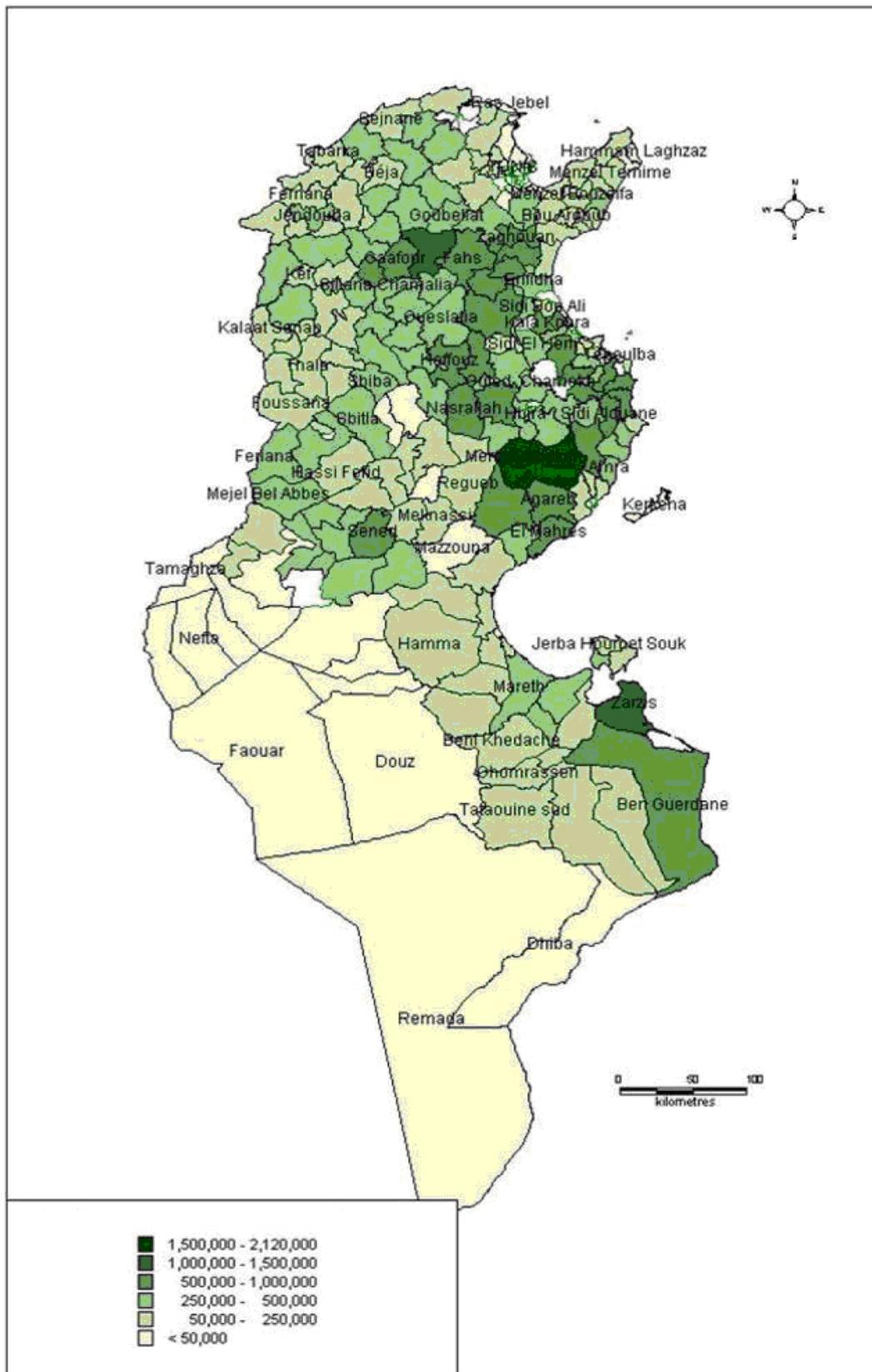
concentran sobre todo en las zonas clásicas del cultivo en el Centro y el Sur del país como la provincia de “Sfax”, la zona del “Sahel”, el litoral del Sur-Este (región de “Zarzis”) y la zona continental de “Gafsa”. El olivar tradicional sufre problemas como baja productividad, envejecimiento y pérdida del potencial productivo e incluso de árboles debido a periodos de sequía prolongada que ocurren ocasionalmente en dichas zonas. No obstante, este olivar está en perfecto equilibrio con su ecosistema, y por lo tanto no requiere gastos elevados de mantenimiento. De este modo constituye una actividad muy interesante para la población rural con una capacidad de invención limitada (INS, 2007). Para esta población, el olivar permite una renta importante, bien de manera directa (si se trata de propietarios) o indirecta para la mano de obra local (Jardak, 2006).

El otro tipo es un olivar moderno y consiste en plantaciones jóvenes, intensivas y casi exclusivamente en régimen de regadío. Este tipo de olivicultura tiene, hoy día, una rentabilidad bastante elevada. Por lo tanto constituye una atracción para los inversores tunecinos y extranjeros. El área de difusión de este sistema de cultivo está estrechamente relacionada con los recursos de agua. Consecuentemente, el mayor incremento de superficies se ha observado en la zona del Norte pero también en el resto del territorio donde se descubrió la presencia de agua subterránea. La presencia de grandes empresas, algunas de ellas extranjeras, genera una fuente de labor constante para la mano de obra rural y contribuye vivamente al desarrollo en estas zonas. Sin embargo, la olivicultura intensiva y superintensiva no supera el 3% en términos de superficie en el año 2006 por lo cual el cultivo tradicional sigue siendo el sistema predominante en Túnez (Jardak, 2006). El olivar de Túnez cuenta con un 30% de plantaciones jóvenes (menos de 20 años). Las plantaciones de entre 20 y 70 años representan el 55%, mientras que los olivos viejos constituyen el 15%. Por lo tanto, la reforma del olivar de Túnez es una de las prioridades especialmente con el renovado interés para el aceite de oliva en el mercado mundial (Jardak, 2006).

La figura 2 representa la situación geográfica de las provincias productoras de aceituna en Túnez. La figura 3 representa la distribución de pies de olivos por municipios en todo el país.



**Figura 2.** Situación geográfica de las provincias productoras de aceituna en Túnez.



**Figura 3.** Distribución por municipios de pies de olivo en Túnez (Gargouri et al., 2005).

Con una media interanual de producción en periodos de 5 años de 151.200 tm en 2002/2007 (COI, 2007), Túnez cubre el 5,4% de la producción mundial de aceite y permanece en el segundo rango después de la Unión Europea. Una gran parte de la producción está destinada a la exportación, con una media interanual de 111.600 toneladas (2002/2007). De esta manera Túnez contribuye el 19,3% del total del mercado mundial de aceite de oliva (COI, 2007). Dichas exportaciones representan el 45% de las exportaciones de productos agrícolas y un 5% del total de las exportaciones del país (Jardak, 2006).

Además de su papel económico fundamental, el olivar participa vivamente en el desarrollo rural y en la creación del empleo en Túnez. Efectivamente, el sector olivarero ofrece 30 millones de jornales por año sobre todo en las zonas rurales desfavorecidas. El olivar afecta, de manera directa o indirecta a los ingresos de 1 millón de tunecinos en un país de 10 millones de habitantes.

En Túnez, el olivar permite valorizar regiones donde los recursos son escasos y la población rural tiende a emigrar hacia las grandes ciudades de las zonas costeras. El cultivo del olivo ha sido capaz de mantener estable la población rural de las zonas citadas y contribuir a su desarrollo (Jardak, 2006).

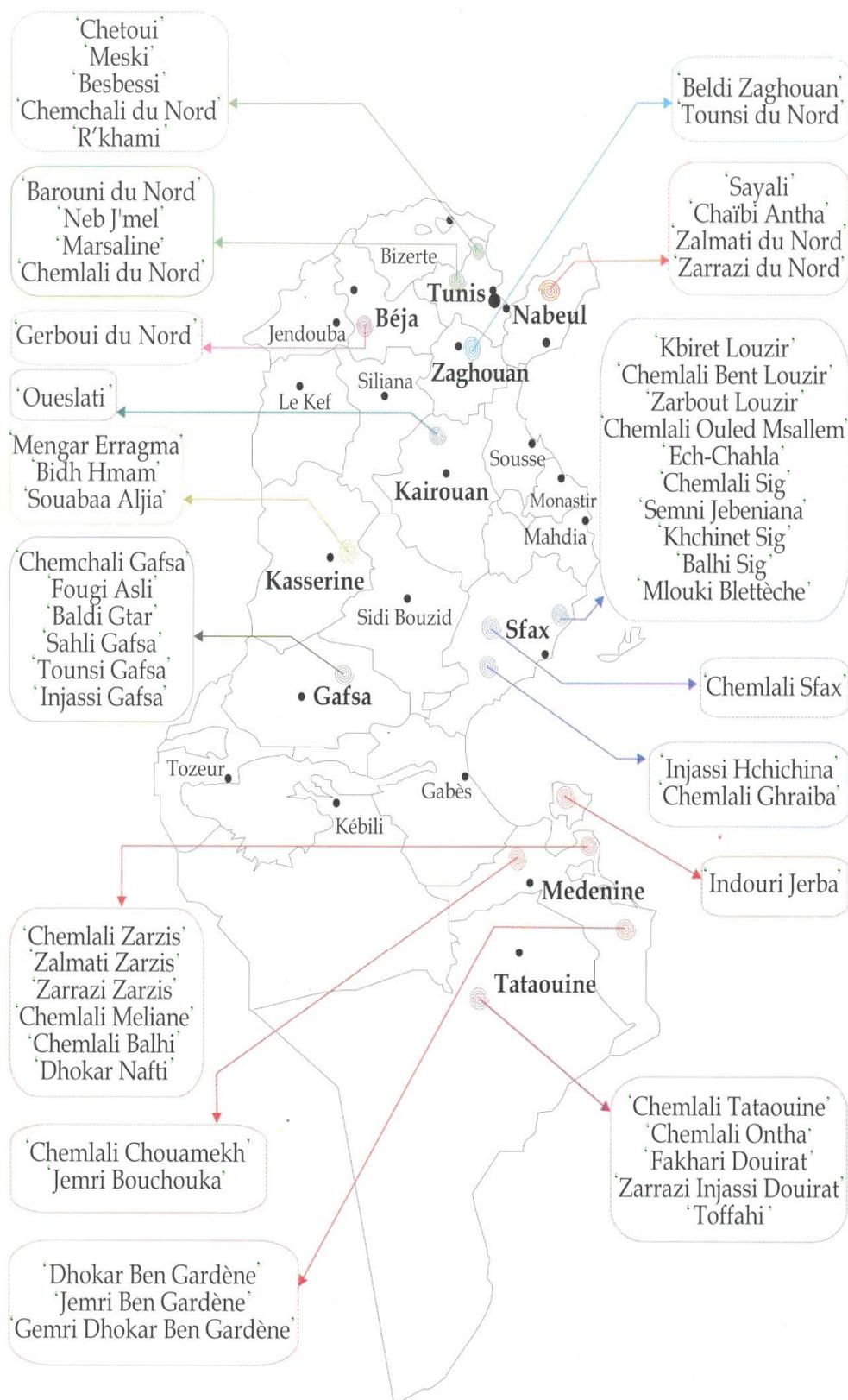
### **3.3. Recursos genéticos y estructura varietal del olivar de Túnez**

A pesar de la gran importancia socio-económica del olivo, no se ha dado en Túnez, como en muchos otros países olivareros, una gran importancia al estudio de los recursos genéticos hasta la iniciativa del Consejo Oleícola Internacional (en los 90 del siglo pasado). Esta iniciativa pretende conservar el patrimonio genético existente sobre todo en la cuenca mediterránea. De allí, empezó un gran programa nacional de prospección, identificación, conservación y estudio de variedades autóctonas de Túnez. Un primer catálogo que reúne 56 variedades fue publicado por Trigui y colaboradores en el 2002. Este catalogo fue elaborado según la metodología desarrollada por Barranco y Rallo en 1984 y adoptada por el Consejo Oleícola Internacional, basándose en el estudio de una serie de caracteres morfológicos distintivos primarios.

Se ha observado una gran riqueza genética en el olivar de Túnez, debido al número importante de variedades cultivadas pero también de olivos silvestres (Trigui et al., 2002). Algunas de estas variedades presentan un grado de adaptación y de rusticidad

importante y son capaces de colonizar regiones con características edáficas y climáticas difíciles (Trigui et *al.*, 2006). Sin embargo, este potencial genético ha sido bastante desconocido durante mucho tiempo ya que está enmascarado por la presencia de variedades dominantes como la ‘Chemlali Sfax’ en el Sur y en el Centro y la ‘Chétoui’ en el Norte del país (Hannachi et *al.*, 2007).

La Figura 4 indica la distribución geográfica de algunas variedades autóctonas de olivo importantes en Túnez.



**Figura 4.** Distribución geográfica de variedades autóctonas de olivo de Túnez

(Trigui et al., 2002)

Algunas variedades autóctonas de Túnez sufren el riesgo de la erosión genética (Trigui et *al.*, 2006). Dicho fenómeno es consecuencia de varias razones, como el cambio de la olivicultura hacia un sistema agronómico cada vez más intensivo donde ciertos cultivares se consideran relativamente poco adaptados (Trigui et *al.*, 2006). Por otra parte, las nuevas exigencias del mercado en términos de características del aceite hacen que un número de variedades antiguas sean de poco interés económico. Consecuentemente, se realizó una sustitución con variedades “nuevas” procedentes mayormente de zonas lejanas geográficamente (variedades extranjeras) como por ejemplo ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, ‘Koroneiki’ etc... en muchos casos sin estudios previos del comportamiento a largo plazo en las condiciones edafo-climáticas de Túnez. También, la presión urbana constituye una de las causas de la desaparición de un número de árboles centenarios que pueden ser los últimos representantes de algunas variedades antiguas.

Además de los esfuerzos de conservación de los recursos genéticos del olivo en Túnez, se empezó paralelamente, un programa de mejora genética destinado esencialmente a modificar la composición en ácidos grasos de la variedad más extendida ‘Chemlali Sfax’ mediante cruzamientos con las variedades extranjeras ‘Arbequina’, ‘Koroneiki’, ‘Coratina’, ‘Sauri’ y una variedad local ‘Chemchali’ (Trigui et *al.*, 2006). La variedad ‘Chemlali Sfax’ tiene un bajo contenido en ácido oleico y un alto contenido en ácido palmítico y linoleico (Grati-kamoun et *al.*, 2002). Se obtuvieron 1685 genotipos, algunos de los cuales presentan características agronómicas y tecnológicas interesantes (Trigui et *al.*, 2006).

Como en otros países olivareros tradicionales (Caballero y Del Río, 1999), se ha observado el problema de homonimias (variedades distintas con el mismo nombre) y sinonimias (la misma variedad con distintos nombres) a la hora de realizar la caracterización pomológica (Trigui et *al.*, 2002). Este problema es debido al carácter genérico de las denominaciones atribuidas por los agricultores. El problema de homonimias se ha visto claramente con la denominación más abundante que es la “Chemlali”, que corresponde a “frutos pequeños” en lengua antigua (Trigui et *al.*, 2006). También, se han observado sinonimias en los casos de las variedades ‘Chemlali Sfax’, ‘Oueslati’, ‘Chétoui’, ‘Neb Jmel’ (Mehri et *al.*, 1997)

El sistema de denominación basado en los nombres genéricos que corresponden a una descripción del fruto como por ejemplo el “Meski” (fruto perfumado), “Injassi” (fruto con forma de pera), o de un carácter determinado como la denominación “Dhokkar” (olivo polinizador con polen denso) o “Beldi” (olivo del país), etc... genera una gran confusión a la hora de identificar el material vegetal olivarero de Túnez.

#### **4. BANCOS DE GERMOPLASMA**

El olivo es una especie que cuenta con un número importante de variedades. Efectivamente, Lavee, en 1994, destacó la presencia de mas de 2000 cultivares, y dos revisiones de Bartolini et *al.*, (1994 y 1998) documentaron la existencia de 1200 variedades autóctonas con mas de 3000 denominaciones. Para la conservación de estos recursos, se procedió a la creación de Bancos de Germoplasma en distintos países del mundo. Un Banco de Germoplasma es una parcela que reúne un número de genotipos distintos y permite por una parte, salvaguardar un patrimonio genético determinado, pero también sirve de base para el estudio de la expresión de la variabilidad genética en la especie bajo las mismas condiciones ambientales y de cultivo. El conocimiento del potencial real de cada variedad es imprescindible para conseguir una olivicultura competitiva basada en material vegetal seleccionado mediante experimentación o tras un programa de mejora genética dirigida (Caballero y Del Río, 1999). En ambos casos la creación de Bancos de Germoplasma debe contener una amplia base genética. El Banco debe tener una superficie relativamente pequeña donde se mantiene el máximo de recursos bajo condiciones relativamente controladas evitando, sobre todo, la presencia de duplicaciones (Caballero et *al.*, 2005).

Actualmente existen en Túnez 11 colecciones repartidas en distintas partes del país y registradas en la base de datos mundial de la FAO, accesible a través del sitio web “<http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>”. (FAO, 2006).

El Banco de Germoplasma más importante del país es el Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax con más de 120 variedades principalmente procedentes del Centro y Sur del país pero además con variedades procedentes del norte y también unas de otros países.

## **5. IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES EN EL OLIVO**

### **5.1. Los caracteres morfológicos y/o agronómicos**

Tradicionalmente, para la identificación y caracterización de las especies de interés agronómico, entre las que se incluye el olivo, se han utilizado los caracteres morfológicos y/o agronómicos.

La evaluación agronómica se basa en el estudio de caracteres tales como el vigor del árbol, la precocidad, la producción media, la aptitud al enraizamiento, la susceptibilidad a ciertas enfermedades y plagas etc... Para caracterizar las diferencias genéticas entre cultivares mediante criterios agronómicos, se requiere un número elevado de repeticiones en espacio y en tiempo ya que se trata de caracteres muy influenciados por las condiciones ambientales (Rallo *et al.*, 2005).

Para la caracterización morfológica en olivo se han utilizado muchos métodos a lo largo del tiempo que se basan, generalmente, en caracteres con elevada capacidad discriminativa, una constancia entre genotipos idénticos y con poca influencia por las condiciones ambientales y del año. El procedimiento de caracterización debe de ser a la vez fiable, rápido y económicamente rentable. Los métodos de identificación morfológica más empleados para variedades de olivo incorporan un gran número de caracteres del árbol, del ramo, del fruto, del endocarpo, de la hoja y de la inflorescencia (Barranco y Rallo, 1984). Entre los caracteres de mayor utilidad para la identificación destacan los del endocarpo debido a su menor fluctuación y fácil conservación (Rallo *et al.*, 2005). Actualmente el esquema pomológico que se está utilizando para caracterizar e identificar a las variedades de olivo es el definido por Barranco y Rallo en 1984, aunque algo más simplificado, este incluye un total de 28 caracteres del árbol, hoja, fruto y endocarpo (Barranco *et al.*, 2005)

Los marcadores morfológicos y agronómicos siguen siendo utilizados ampliamente hoy día ya que no requieren medios o tecnologías complicadas y también son los únicos marcadores basados en la observación directa de la planta. No obstante, el empleo de esquemas pomológicos, presenta dificultad en la evaluación de muchos de los caracteres como por ejemplo los relativos a las inflorescencias. También es notable la influencia de muchos factores sobre las medidas como por ejemplo la edad, el estadio fenológico y sanitario de la planta, el manejo del cultivo y las condiciones ambientales. Además, existe un alto grado de subjetividad a la hora de hacer la descripción. En

consecuencia, se requiere personal con experiencia, que sea capaz, sobre todo, de diferenciar entre variabilidad debida a la genética y aquella debida a la fluctuación ambiental. Dicha experiencia requiere tiempo, y la identificación con este tipo de marcadores ha llevado en algunos casos a caracterizaciones erróneas (Trujillo y Barranco, 1999).

A pesar de dichas limitaciones, se puede decir que se han mostrado muy útiles para llevar a cabo trabajos de prospección (Barranco y Rallo, 1984; Barranco y Rallo, 1985; Cimato *et al.*, 1993; Tous y Romero, 1993; Cantini *et al.*, 1999; Barranco *et al.*, 2000, 2005) y que son necesarios para catalogar o describir un Banco de Germoplasma (Caballero *et al.*, 2006)

En Túnez, el primer trabajo sistemático de caracterización de variedades autóctonas de olivo mediante estudio morfológico y agronómico fue realizado por Trigui *et al.*, (2002). En las Figuras 5 y 6 se ilustran con fotografías del árbol, hoja, frutos y endocarpos, las dos variedades más importantes en Túnez, ‘Chemlali Sfax’ y ‘Chétoui’. Como puede observarse existen claras diferencias morfológicas entre tamaño y forma de las hojas, frutos y endocarpos.



## Chemlali Sfax



**Figura 5.** Caracteres morfológicos de la variedad más importante en el Sur de Túnez ‘Chemlali Sfax’. (Trigui *et al.*, 2002).



## Chétoui



**Figura 6.** Caracteres morfológicos de la variedad más importante en el Norte de Túnez ‘Chétoui’. (Trigui et al., 2002).

## 5.2. Marcadores moleculares

El desarrollo y utilización de marcadores moleculares en las últimas décadas ha contribuido a perfeccionar los estudios de los recursos genéticos en olivo reduciendo las incertidumbres debidas a la fluctuación en los caracteres morfológicos y agronómicos (Hamrick y *al.*, 1992). Efectivamente, dichos marcadores presentan una buena constancia e incluso son completamente independientes de las condiciones externas en caso de los marcadores de ADN. Además, los marcadores moleculares pueden ser analizados en distintos tejidos y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Este tipo de marcadores, especialmente en el caso de las isoenzimas y los marcadores de ADN, ha demostrado niveles de polimorfismo considerables y han sido de gran utilidad para los estudios de identificación en olivo.

Hoy día, los marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares se utilizan conjuntamente para conseguir una evaluación completa de los recursos genéticos (Rallo et *al.*, 2005).

### 5.2.1. Los isoenzimas

La técnica de identificación de variedades mediante el uso de las isoenzimas es una técnica sencilla, rápida y económica (Trujillo et *al.*, 1995). La metodología se basa en la distinción por electroforesis de las distintas formas de una enzima (isoenzimas) codificadas por diferentes alelos de un mismo gen (Soltis y Soltis, 1989).

Las isoenzimas son marcadores codominantes y permiten, por lo tanto, distinguir entre individuos homocigóticos y heterocigóticos. Además, el hecho de que las isoenzimas se consideren como productos primarios del gen hace que sus patrones sean reproducibles y el análisis sea muy poco afectado por las condiciones ambientales.

El principal inconveniente de este tipo de marcadores es su nivel relativamente bajo de polimorfismo, que resulta insuficiente para identificar variedades muy próximas (Liu y Furnier, 1993). De hecho, las isoenzimas están más adaptadas a especies alogamas donde el nivel de variabilidad es suficientemente alto.

Los marcadores isoenzimáticos han sido frecuentemente utilizados para la identificación de variedades de olivo (Pontikis et *al.*, 1980; Loukas y Krimbas, 1983; Trujillo et *al.*, 1990; Ouazzani et *al.*, 1993, 1995; Ouazzani et *al.*, 1996; Trujillo et *al.*,

2006). No obstante, su uso en la actualidad para fines de identificación varietal es limitado, tras la aparición de los marcadores de ADN.

### **5.2.2 Los marcadores de ADN**

Estos marcadores están basados en el análisis directo del genotipo de la planta. Efectivamente, la gran variación existente a nivel de ácidos nucleicos tanto en las regiones codificantes como las no codificantes ha sido aprovechada para la identificación de los cultivares de olivo. Los marcadores de ADN han demostrado su gran aptitud en el estudio de la diversidad genética a niveles intraespecífico e interespecífico (Karp y Edwards, 1997). Estos marcadores tienen la capacidad de identificar con certeza una variedad sin recurrir al estudio de muchos caracteres (Rallo *et al.*, 2005). Los marcadores de ADN requieren solamente una pequeña cantidad de material vegetal de partida (generalmente tejido de hoja en caso del olivo) independientemente de la edad, del estado de la planta o del medio ambiente.

Los primeros marcadores de ADN fueron los RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) y se utilizaron a partir del principio de los 80 del siglo pasado. Posteriormente, y con la aparición de la técnica de PCR se desarrollaron los marcadores RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA), los marcadores AFLPs (Amplified Length Polimorphism) y recientemente los marcadores microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats). También, se utilizan en olivo otros marcadores de ADN como por ejemplo los SCARs (Sequenced Characterised Amplified Region), STSs (Sequence Tagged Site PCR), SSAPs (Sequence Specific Amplification Polymorphism) y los ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats).

#### **- Los marcadores RFLPs**

Los marcadores RFLPs permiten detectar diferencias en determinadas zonas del ADN mediante la utilización de distintas enzimas de restricción. Dichas enzimas actúan cortando el ADN y permiten obtener un patrón específico tras la migración en gel. Los RFLPs tienen la ventaja de ser marcadores codominantes pero presentan un bajo nivel de polimorfismo y un número bajo de alelos por locus. Los inconvenientes mencionados han hecho que el uso de los RFLPs haya disminuido a favor de otros marcadores de ADN tras la aparición de la técnica de PCR.

Los marcadores RFLPs fueron ampliamente utilizados en olivo sobre todo para distinguir los olivos silvestres de las variedades cultivadas. Los RFLPs han mostrado grandes diferencias entre olivos silvestres del Este y oeste del Mediterráneo (Amane et al., 1999). También permitieron determinar el momento de divergencia genética entre los distintos taxones de la especie *Olea europaea* (Besnard et al., 2001b). Los tipos de RFLPs más frecuentemente utilizados han sido los RFLPs mitocondriales (Besnard et al., 2002) y los RFLPs cloroplásticos (Amane et al., 1999; Lumaret et al., 2000).

## **- Marcadores de ADN amplificados por PCR**

### **✓ Los marcadores RAPDs**

Los marcadores RAPDs se basan en el análisis mediante amplificación con PCR de fragmentos de ADN usando cebadores arbitrarios o semi-arbitrarios de 10 pares de bases (Williams et al., 1990). Este tipo de marcadores es ampliamente utilizado en el estudio de los recursos genéticos (Hormaza, 1996).

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

En olivo, los RAPDs demostraron una gran utilidad para la identificación y la clasificación de variedades (Bogani et al., 1994; Fabbri et al., 1995; Mekuria et al., 1999; Hess et al., 2000; Belaj et al., 2001; Besnard et al., 2001c). También se han utilizado para el estudio de la variabilidad intra e inter-cultivar (Gemmas et al., 2000) y para la estimación de las distancias genéticas dentro de y entre las formas silvestres, asilvestradas y cultivadas de olivo (Besnard y Bervillé, 2000; Belaj et al., 2001; Besnard et al., 2001c; Sanz-Cortés et al., 2001). En Bancos de Germoplasma así como en viveros, los RAPDs se utilizaron para la detección de la presencia de homonimias y sinonimias (Besnard et al., 2001b; Belaj et al., 2004a).

### ✓ **Los marcadores AFLPs**

Los marcadores AFLPs se basan en la amplificación de fragmentos de ADN predigeridos con enzimas de restricción y unidos a adaptadores específicos. Se usan cebadores selectivos (marcados) diseñados para dichos adaptadores. Los AFLPs son muy polimórficos y permiten obtener una gran resolución en el análisis, dando la posibilidad de analizar individuos con mucha similitud genética. Además, se dispone de un número ilimitado de marcadores AFLPs y su desarrollo no requiere un conocimiento previo de la secuencia. Sin embargo, los AFLPs presentan una serie de inconvenientes ya que son marcadores dominantes, generan un coste elevado de análisis, requieren un ADN de mayor cantidad y pureza que en el caso de los RAPDs por ejemplo, son arduos en poner a punto y difíciles de interpretar. También, puede que haya un cierto grado de subjetividad en el análisis con este tipo de marcadores.

En olivo, se han empleado los marcadores AFLPs en el estudio de la variación genética inter y intra-cultivar en variedades españolas (Sanz-Cortés *et al.*, 2003), en variedades italianas (Angiolillo *et al.*, 2006) y en variedades del Este del Mediterráneo (Owen *et al.*, 2005). Dichos marcadores se han estudiado en 29 variedades de olivo de Túnez y del Mediterráneo presentes en el Banco de Germoplasma de “Kssar Ghriss” en el Sur del país (Grati-kamoun *et al.*, 2006).

Los AFLPs también se han utilizados combinados a otros tipos de marcadores como los RAPDs, los SSRs y los caracteres morfológicos, para la discriminación entre cultivares de olivo (Rotondi *et al.*, 2003; Hagidimitriou *et al.*, 2005). En otro trabajo, la asociación de los AFLPs y los RAPDs permitió estudiar la presencia de variabilidad intra-cultivar en olivo (Belaj *et al.*, 2004b).

### ✓ **Los marcadores tipo SCARs**

Los marcadores de tipo SCARs (Paran y Michelmore, 1993) se obtienen mediante clonación y secuenciación de fragmentos amplificados con algunos de los marcadores citados anteriormente (RFLPs, RAPDs y AFLPs). Existen también otros marcadores (STs y SSAPs) que se basan en el mismo fundamento.

Los SCARs son marcadores altamente específicos y son menos susceptibles a las condiciones de PCR. De manera general, los marcadores SCARs son dominantes puesto que permiten solamente detectar la presencia o la ausencia de la amplificación. Sin

embargo, dichos marcadores se pueden convertir en marcadores codominantes (Rafalski y Tingey, 1993). Estas técnicas generan un nivel de polimorfismo menor y requieren un coste más elevado en comparación con marcadores como RFLPs, RAPDs y AFLPs (Xu y Bakalinsky, 1996). Estos marcadores se consideran apropiados para usos rutinarios.

✓ **Los marcadores microsatélites o SSRs**

Los marcadores microsatélites llamados también SSRs (Simple Sequence Repeat) o STRs (Short Tandem Repeat) son motivos de di, tri o tetra-nucleótidos (incluso pueden ser más complejos) repetidos en tándem a lo largo del ADN (Hamada et al., 1982). Normalmente, los microsatélites no son codificantes. Posiblemente, desempeñan un papel en la regulación genética (Hamada et al., 1982) o actúan como señales en los procesos de conversión genética y recombinación (Jeffreys et al., 1985).

Aunque requieren una puesta a punto laboriosa de la reacción PCR (según el cebador), se considera que la metodología del análisis por SSRs es relativamente sencilla. Se trata de marcadores muy polimórficos, multi-alélicos, codominantes y reproducibles entre laboratorios (Hamada et al., 1982; Rafalski et al., 1993). Además, el análisis requiere solamente 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. La técnica SSRs es también susceptible de automatización. La interpretación de los resultados generados por este tipo de marcadores es relativamente sencilla. El principal inconveniente de los microsatélites es la labor y el coste bastante elevados que requieren el desarrollo de los cebadores.

Así pues, la técnica SSRs representa hoy día una herramienta de confianza para resolver los problemas relacionados con la caracterización genética y la identificación varietal en olivo. Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en olivo (Rallo et al., 2000; Sefc et al., 2000; Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; De la rosa et al., 2002; Diaz et al., 2006; Ganino et al., 2007; Noormohammadi et al., 2007). Se han realizado estudios tanto con un número limitado de cultivares (Bandelj et al., 2002; Belaj et al., 2004c) como con grandes colecciones de distintas partes geográficas del mundo (Khadari et al., 2003; Montemurro et al., 2005; Noormohammadi et al., 2007). El primer trabajo que pretendió caracterizar variedades de olivo a nivel regional mediante microsatélites dentro de un Banco de Germoplasma, se realizó en 46

individuos perteneciente a 30 cultivares originarios de 7 provincias de Sicilia (La Mantia et al., 2005).

Gracias a los marcadores SSRs, se están estudiando relaciones genéticas existentes entre distintos cultivares dentro de la propia especie (Carriero et al., 2002; Belaj et al., 2003) y se ha evaluado la transferencia a otras especies del género *Olea* (Rallo et al., 2003) o de otros géneros de la familia Oleaceae (De la Rosa et al., 2002). Por otro lado, algunos estudios han señalado mediante microsatélites la presencia de variación intra-cultivares (Cipriani et al., 2002; Noormohammadi et al., 2007). Además, los microsatélites han demostrado su utilidad en la realización de pruebas de paternidad en progenies procedentes de cruzamientos controlados entre cultivares de olivo (De la Rosa et al., 2004).

La comparación de los marcadores SSRs con otros tipos de marcadores (RAPDs y AFLPs) en variedades españolas e italianas de olivo permitió evaluar su potencial real con respecto al nivel de información generado, la eficiencia en estudios de variabilidad genética y el establecimiento de las relaciones genéticas (Belaj et al., 2003). En este sentido, los microsatélites presentaron un mejor contenido en información y una mayor fiabilidad puesto que, junto con los marcadores AFLPs, tienen una reproducibilidad bastante elevada, contrariamente a los marcadores RAPDs. En la actualidad, los SSRs y los AFLPs, son los marcadores de ADN más utilizados en el olivo (Trujillo et al., 2005).





## **II. OBJETIVOS DEL TRABAJO**



En los años 90 y tras la iniciativa del Consejo Oleícola Internacional con la finalidad de promover la conservación de los recursos genéticos del olivo en los países olivareros, se inicia un trabajo de prospección en las distintas zonas olivareras de Túnez (principalmente del Sur). Una vez identificado morfológicamente el material prospectado, se incluye en el Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax. Actualmente el Banco de Germoplasma ocupa 6 hectáreas de superficie e incluye 120 variedades supuestamente diferentes y autóctonas que presentan caracteres cualitativos y adaptativos interesantes. Parte de los trabajos realizados en dichas accesiones han sido publicados en un catálogo nacional de variedades autóctonas de Túnez (Trigui et *al.*, 2002).

En este sentido el presente estudio viene a complementar el trabajo antes mencionado con los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar e identificar mediante marcadores microsatélites (SSRs) las accesiones de olivo presentes en la colección.
- Comprobar la presencia de homonimias y/o sinonimias entre el material evaluado.
- Estudiar las relaciones genéticas entre las diferentes variedades identificadas en la colección.
- Complementar la identificación molecular de las accesiones evaluadas de la colección con la identificación morfológica de los endocarpos.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL VEGETAL

Las 84 accesiones atribuidas a las variedades autóctonas objeto de este trabajo provienen del Banco de Germoplasma de Túnez: Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax. La región donde esta situada dicha colección presenta condiciones edafo-climáticas características de las zonas semiáridas del Centro y del Sur del país, con una media de pluviometría que no supera los 220 mm anuales. En la Tabla 1 se muestran las denominaciones de todas las accesiones estudiadas y las zonas geográficas de origen de cada una de ellas.

**Tabla 1.** Denominaciones de las 84 accesiones analizadas y procedencia geográfica de cada una de ellas

Denominaciones	Procedencia geográfica
Chemchali Gtar 3	Gafsa
Sahli Gafsa autre que Gtar	
Lattout Sned 3	
Sehli Gafsa Dawla1	
Sehli Sned 7	
Tounsi Gafsa	
Autre Zarrazi	Mednine
Chemlali Balhi	
Chemlali Barrani	
Chemlali Zarzis	
Chemlali Chouamekh	
Dhokar Nafti	
Meski Zarzis	
Zalmati Zarzis	
Zarrazi Kgh	
Chemlali Ontha Tataouine	Tataouine
Chemlali Tataouine10	
Fakhari Tataouine	
Jemri Bouchouka	
Neb Tataouine	
Besbessi	Tunis
Chemlali Bjawa	
Chétoui 2	
Chétoui 2 à mam	
Marsaline	
Meski Bjawa	
Chemlali Sfax	Sfax Manzel Chaker
Chemlali Sfax COI	
Horr Sfax	
Baldi Charqia BL8	Sfax Norte
BL16 G	
BL2	
BL20	
BL23	
BL24	
BL26	
BL31	
BL32 G	
BL37	

Bou Bazzoula BL19PG	
Horr Blettech BL11 PG	
Horr Louzir BL32 PG	
Sehli Jbeniana BL15 Bent Louzir	
Zarbout Louzir	
Zeitoun Boubazzoula COI	
Zeitoun Boubazzoula COI	
Chemlali Sig	
CHL Ouled Youssef Sig 13	
CHL Sig 12PG	
Ech- Chahla /g	
Khechinet Sig	
Mallahi El Mouammar Sig 1G	
Semni Jbeniana Sig 0	
Sig 112PG	
Sig 113 G	
Sig 14 PG	
Sig 15	
Sig 3PG	
SIG19	
Chemlali Mahares	
Hchichina 10	
Hchichina 6	
Hchichina 7	
Injassi Hchichina	
Jeddaria Chaal	
Mfartah Hchichina H9	
Chahla	
Chemlali Bouchouka	
Chemlali Ouled Youssef	
K17	
K56PG	
Kotti K11	
Kotti K12	
Kotti K14	
Kotti K18	
Kotti K21	
Kotti K23 (avec mam)	
Kotti K3	
Kotti K30 PG	
Kotti K30G	
Kotti K32	
Kotti K56 G	
Kotti K9 PG	
Kotti K9G	
Lqam El Kotti Kotti K3	

Tabla 1. (Cont.)

## 2. MÉTODOS

### - Recolección de hojas para la extracción de ADN genómico

Las muestras de hojas se tomaron de brotes jóvenes de 25 cm de longitud con suficientes hojas jóvenes. Después de etiquetarlos, y envolverlos en papel humedecido (para evitar la deshidratación), se introducen en bolsas de plástico que fueron cerradas herméticamente. Las muestras fueron transportadas lo más rápidamente posible al laboratorio donde se realizó la extracción de ADN con material fresco.

**- Extracción de ADN de las hojas**

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

**- PCR-SSRs**

En este trabajo se usaron 8 microsatélites previamente descritos para la identificación y caracterización de variedades en olivo. Los cebadores utilizados pertenecen a las series descritas por Sefc et al., (2000) (ssrOeUA-DCA), Carriero et al., (2002) (GAPU) y Cipriani et al., (2002) (UDO99):

**Tabla 2.** Serie, motivo repetitivo y secuencias de los cebadores (Forward y Reverse), tamaño esperado (en pb) y temperatura de hibridación para los 8 microsatélites analizados.

Serie cebadores	Motivo repetitivo	Secuencia del Forward (5'-3')	Secuencia del Reverse (5'-3')	Tamaño esperado (pb)	Tª de hibridación (°C)
ssrOeUA-DCA3	(GA) <sub>19</sub>	FAM-cccaagcggagggtatattgttac	Tgctttgtcgtgtttgagatgttg	228-250	52
ssrOeUA-DCA9	(GA) <sub>23</sub>	FAM-aatcaagtctctctctcatttcg	Gatccttceaaaagataacctctc	161-205	50
ssrOeUA-DCA15	(CA) <sub>3</sub> G(AC) <sub>14</sub>	FAM-gatctgtctgtatataccacac	Tatacctttccatcttgacgc	242-266	52
ssrOeUA-DCA16	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>29</sub>	FAM-ttaggtgggattctgtagatggttg	Ttttaggtgagttcatagaattagc	120-178	52
ssrOeUA-DCA18	(CA) <sub>4</sub> CT(CA) <sub>3</sub> (GA) <sub>19</sub>	FAM-aagaagaaaaaggcagaattaagc	Gtttctctctctacataaagtac	168-184	50
GAPU71B	GA(AG) <sub>6</sub> (AAG) <sub>8</sub>	HEX-gatcaaaggaagaaggggataaa	Acaacaaatccgtacgcttg	285	52
GAPU101	(GA) <sub>8</sub> (G) <sub>3</sub> (AG) <sub>3</sub>	NED-catgaaaggaggggacata	Ggcactgtgtgagcagattg	264	52
UDO99-043	(GT) <sub>12</sub>	FAM-tcggtttacaaccatttc	Tgccaattatggggtaact	174	50

El protocolo PCR-SSRs usado en este trabajo es el descrito por (Belaj et al., 2004c). La amplificación de los microsatélites, se realizó mediante PCR en un volumen total de 20µl que incluía: 5ng de ADN genómico, 1X tampón de PCR (Biotools, Madrid), 1,5mM de MgCl, 60µM de dNTPs, 0,028U/µl de Taq polimerasa (Biotools) y 0,2µM de cada uno de los cebadores Forward y Reverse (Thermo).

La PCR se realizó en un termociclador TGradient Thermoblock (Biometra) ó en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, USA):

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

HOLD: Desnaturalización inicial: 95°C – 5 minutos

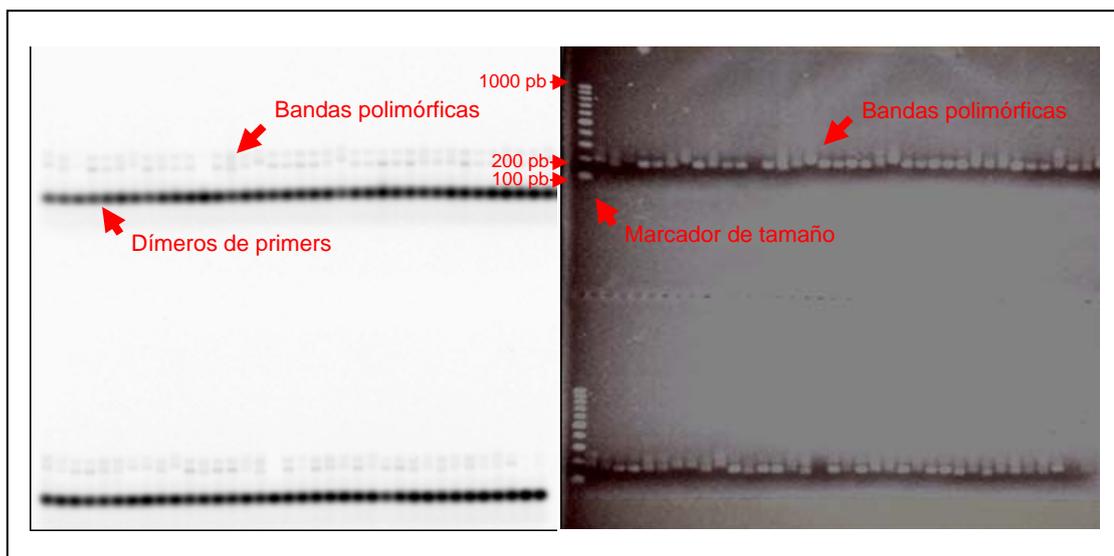
CYCLING: 35 ciclos - Desnaturalización: 95°C – 20 segundos  
 - Hibridación: 50 o 52°C – 30 segundos  
 - Extensión: 72°C – 30 segundos

HOLD: Extensión final: 72°C – 8 minutos

HOLD: Mantenimiento: 4°C (indefinido)

**- Análisis de los microsatélites**

La presencia de productos de amplificación se visualizó previamente en geles de agarosa al 2%. Los geles fueron visualizados en un escáner de fluorescencia (Pharos FX, Bio-Rad) utilizando la combinación de filtros y el láser adecuado para cada fluoróforo, y en un transiluminador ultravioleta tras teñir con bromuro de etidio.



**Figura 7.** Visualización de los productos de la amplificación SSR en el locus *ssrOeUA-DCA 9*: en escáner de fluorescencia (Izquierda) y en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Derecha).

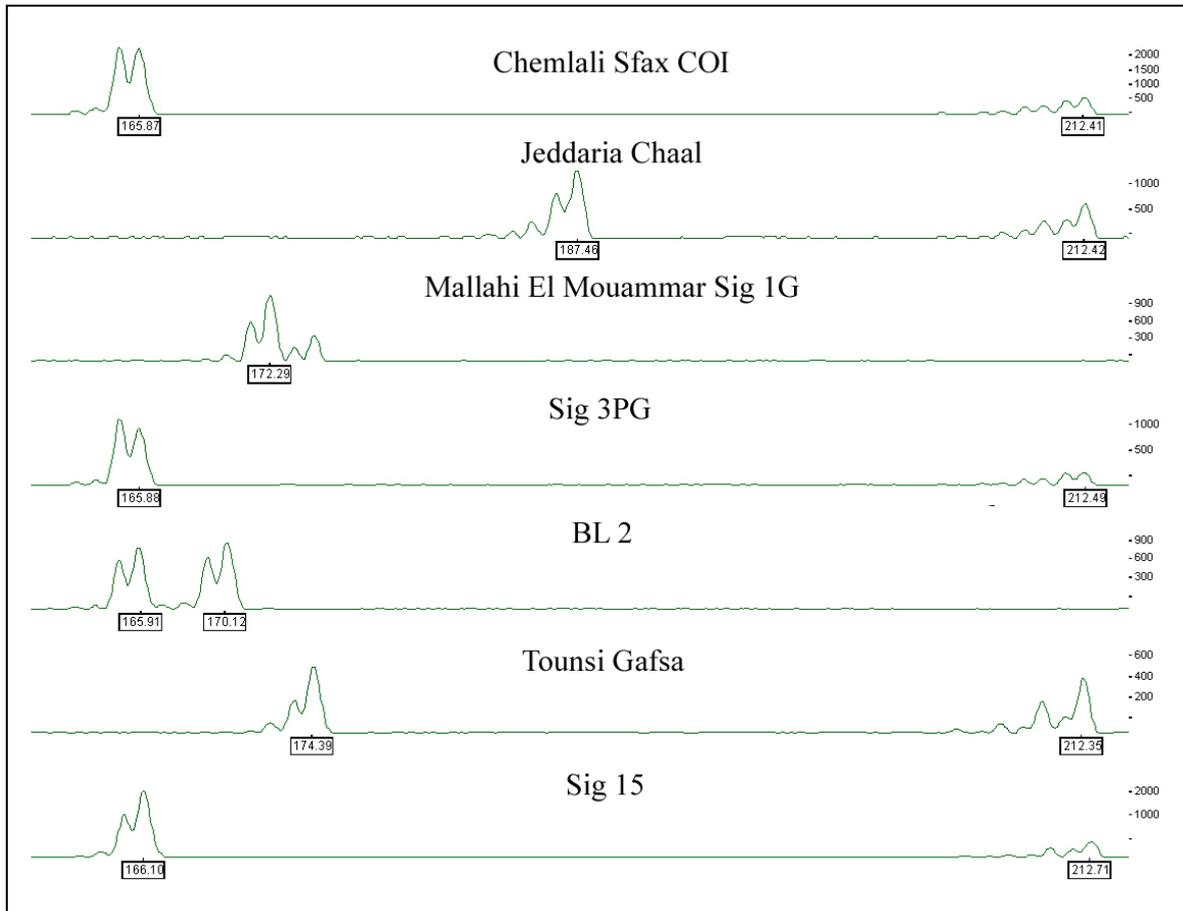
Posteriormente, la separación se realizó mediante un secuenciador automático de tipo capilar ya que permite detectar las pequeñas diferencias en pares de bases entre alelos. Se usó un secuenciador ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems), con un marcaje fluorescente (Tabla 2). Los tamaños de los fragmentos fueron determinados utilizando marcadores internos como referencia.

Para separar simultáneamente varias muestras a la vez, se realizaron agrupaciones de distintos microsatélites de la manera siguiente:

- Agrupación de microsatélites cuyos alelos son de rangos de tamaños no solapantes: (ssrOeUA-DCA3, ssrOeUA-DCA18) y (ssrOeUA-DCA15, ssrOeUA-DCA16) con bastante diferencia de tamaño para que no interfieren los picos.
- Agrupación de microsatélites marcados con fluorocromos diferentes ya que se pueden analizar de manera simultánea en la misma muestra: ssrOeUA-DCA9 (Marcado con FAM), GAPU71B (Marcado con HEX) y GAPU101 (Marcado con NED).

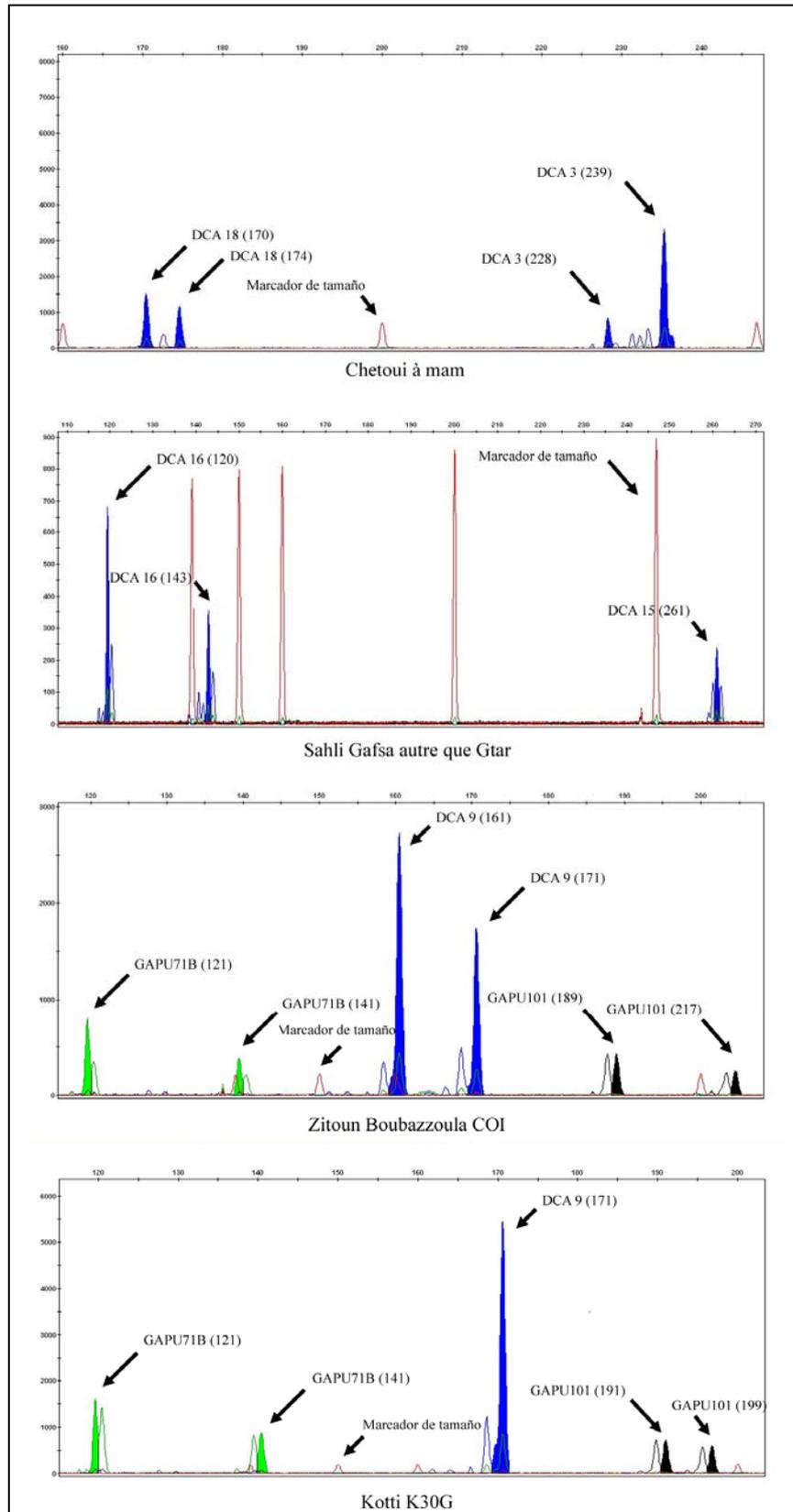
Para analizar el tamaño de los alelos se utilizaron los programas informáticos GENEMAPPER 3.0 (Applied Biosystems) y GENOTYPER 3.7 (Applied Biosystems).

La Figura 8 muestra varios ejemplos de análisis individuales de productos de amplificación mediante el programa GENOTYPER y la Figura 9 representa ejemplos de análisis simultáneo de productos de amplificación mediante el programa GENEMAPPER.



**Figura 8.** Fluorogramas analizados con el programa GENOTYPER para el SSR UDO99-43 en 8 accesiones evaluadas.

Los números indican el tamaño de cada uno de los alelos estimado en pares de bases.  
 (Todos los individuos representados en la figura son heterocigotos para UDO99-43)



**Figura 9.** Fluorogramas analizados con el programa GENEMAPPER para los SSR DCA18, DCA3, DCA16, DCA15, DCA9, GAPU71B y GAPU101 en 4 accesiones evaluadas.

La accesión Chétoui 2 à mam es heterocigota para ambos loci DCA18 y DCA3.

La accesión Sahli Gafsa autre que Gtar es heterocigota para el locus DCA16 y homocigota para el locus DCA15.

La accesión Zeitoun Boubazzoula COI es heterocigota para los loci GAPU71B/DCA9/GAPU101.

La accesión Kotti K30G es heterocigota para los loci GAPU71B y GAPU101, y homocigota para DCA9.

Para el análisis de la variabilidad genética se utilizó el programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998). Este programa requiere la elaboración de una matriz alélica que incluye, para cada una de las muestras, los tamaños de alelos obtenidos para los 8 microsatélites estudiados.

Los parámetros estudiados fueron:

- Los valores de Heterocigosidad Esperada y Observada ( $H_E / H_O$ ) conforme a la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987)
- El Contenido en Información Polimórfica (PIC) que es un coeficiente informativo basado en el la heterocigosidad esperada y también en las frecuencias alélicas (Botstein *et al.* 1980)
- La frecuencia de los alelos nulos, una de las principales causas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Pemberton *et al.* 1995).
- La probabilidad de identidad (PI) calculada con el programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) que es la probabilidad de que un genotipo determinado no difiere de otros dos individuos elegidos al azar (Waits *et al.* 2001).

El estudio de las relaciones genéticas se realizó con el programa NTSYS-pc vesion 2.02 (Rohlf, 1998). Este análisis se basa en una matriz de 0 y 1 que reúne todos los alelos obtenidos para todo el conjunto de microsatélites. Cada alelo de SSR correspondiente a una banda amplificada se registró con “1” ó “0”, según su presencia o ausencia, respectivamente, para cada genotipo.

El análisis factorial de correspondencia entre los genotipos se realizó mediante el programa DARWIN versión 5.0.155 (Perrier *et al.*, 2003). Dicho programa está basado en una metodología parecida a la del programa NTSYS pero permite además introducir una matriz de identidad que especifica una serie de caracteres atribuidos a cada uno de los individuos.

En este estudio, el cálculo de las distancias genéticas se realizó según los coeficientes de DICE. El método de agrupación utilizado para la construcción de los dendrogramas fue el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Sneath and Sokal, 1973).

**- Descripción morfológica de los endocarpos**

Para confirmar el análisis molecular mediante microsatélites de las accesiones presentes en la colección, se realizó la descripción morfológica de los endocarpos, dado su gran poder discriminante, menor fluctuación y fácil disponibilidad de éstos. Principalmente se utilizaron los 11 caracteres seleccionados en el esquema pomológico que actualmente se utiliza en olivo y descrito por Barranco *et al.*, 2005. Estos son: peso, forma del endocarpo, simetría en posición A, simetría en posición B, posición del diámetro transversal máximo, forma del ápice, forma de la base, superficie, número de haces fibrovasculares, distribución de los haces fibrovasculares y presencia de mucrón .



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. VARIABILIDAD DE LOS SSRs EN LAS ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ

### 1.1. Número, rango de tamaño y frecuencias de los alelos obtenidos

Los 8 marcadores SSRs analizados en este estudio fueron polimórficos. Los loci *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA18* y *GAPU71B* se amplificaron en la totalidad de los individuos estudiados (84). En el caso de los loci *ssrOeUA-DCA16* y *UDO99-43* sólo se obtuvo productos de amplificación para 82 individuos, mientras que en los loci *ssrOeUA-DCA15* y *GAPU101* se pudo genotipar 83 y 81 individuos respectivamente. La proporción de individuos genotipados fue de 98,8%, 96,4% para los loci *ssrOeUA-DCA15* y *GAPU101* respectivamente y de 97,6% para *ssrOeUA-DCA16* y *UDO99-43*. La dificultad de amplificación para algunas accesiones puede ser debida a la baja calidad del ADN extraído para estas muestras.

Se detectaron un total de 64 alelos para los 8 loci analizados en las 84 accesiones de la colección. El número de alelos por locus varió de 5 (loci *ssrOeUA-DCA15* y *GAPU71B*), a 12 (locus *UDO99-43*). En este estudio, el promedio de número de alelos por locus fue de 8, superior al obtenido en otros estudios, como por ejemplo el realizado por Noormohammadi *et al.*, (2007) en 92 accesiones pertenecientes a 10 variedades de olivo de Irán, con los mismos marcadores. En dicho estudio se obtuvieron un total de 51 alelos (número medio de alelos por locus: 6,37). La obtención de un número de alelos superior en nuestro estudio se puede explicar por una mayor variabilidad en el material vegetal analizado debido a un mayor número de genotipos diferentes. La tabla 3 muestra los tamaños de los alelos obtenidos para cada uno de los loci analizados así como sus frecuencias.

**Tabla 3.** Tamaño (expresado en pb), y frecuencia (expresada en %) de los alelos obtenidos en los diferentes loci analizados en la totalidad de los individuos

	Locus <i>ssrOeUA-DCA3</i>		Locus <i>ssrOeUA-DCA9</i>		Locus <i>ssrOeUA-DCA15</i>		Locus <i>ssrOeUA-DCA16</i>		Locus <i>ssrOeUA-DCA18</i>		Locus <i>GAPU71B</i>		Locus <i>GAPU101</i>		Locus <i>UDO99-43</i>	
	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)	Alelos (pb)	f (%)
	228	38,1	161	4,1	241	24,1	120	36,6	166	1,2	117	2,9	183	3	166	25
	235	43,4	171	60,1	252	3,6	122	1,2	168	8,3	121	44,6	189	11,7	170	4,2
	239	11,3	175	1,8	258	0,6	136	0,6	170	34,5	123	9,5	191	37	172	4,2
	241	1,8	181	0,6	261	62,6	143	3,1	172	13,1	127	8,3	197	28,4	175	17,7
	245	2,9	183	2,9	264	9	147	15,2	174	36,9	141	34,5	199	3,7	177	0,6
	249	2,4	185	4,1		152	1,2	176	3,5		205	13,6	179	4,8		
			193	18,4		157	4,8	180	2,4		217	2,5	185	6,1		
			196	1,1		159	1,2						187	1,2		
			202	1,1		160	2,4						202	0,6		
			204	4,1		170	1,2						210	3		
			208	1,1		172	3,6						212	27,4		
													214	4,8		
<b>N° de alelos</b>	6		11		5		11		7		5		7		12	
<b>Media</b>	8															

El número total de alelos detectado y la media de número de alelos por locus fueron variables entre series. El número de alelos por locus varió en la serie *ssrOeUA-DCA* de 5 para *ssrOeUA-DCA15* a 11 en para *ssrOeUA-DCA16* y *ssrOeUA-DCA9* (con un promedio de 8 alelos). Sefc et al., (2000) detectaron de 4 a 15 alelos (9,8 de promedio) en un estudio realizado mediante los mismos cebadores, en este caso en 47 variedades italianas e ibéricas. El hecho de que se obtuviera un promedio superior en el estudio señalado puede explicarse por la existencia de una mayor variabilidad en la colección de individuos, ya que procedían de dos zonas geográficamente distintas (Italia y Península Ibérica). Contrariamente, la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax reúne individuos de procedencia geográfica relativamente próxima (existe una distancia de aproximadamente 700 km entre “Tunis” y “Tataouine”, las dos poblaciones de origen más lejanas entre sí).

Montemurro et al., (2005) obtuvieron un promedio de número de alelos por locus de 3 en los microsatélites *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA15* y *ssrOeUA-DCA18* en 111 accesiones que representan 60 cultivares en su mayoría de Italia. En nuestro estudio se ha obtenido un promedio de 7,66 considerando únicamente dichos microsatélites.

Para la serie *GAPU*, y usando los mismos cebadores del presente estudio, Carriero et al., (2002) detectaron 6 y 9 alelos respectivamente en *GAPU71B* y *GAPU101* en 20

accesiones pertenecientes a 16 cultivares. Montemurro et al., (2005) obtuvieron 2 y 3 alelos en los mismos marcadores con 111 accesiones de 60 variedades. En este estudio hemos obtenido 5 y 7 alelos en GAPU71B y GAPU101 respectivamente en material autóctono de Túnez.

Para UDO99-43, Cipriani et al., (2002) detectaron la presencia de 5 alelos en 12 cultivares comunes y antiguos. Belaj et al., (2004c) obtuvieron 13 alelos en 35 cultivares procedentes de España e Italia. En la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax, se han detectado 12 alelos en dicho locus.

Todas estas comparaciones con trabajos previos permiten concluir que en el presente estudio se ha obtenido un número relativamente elevado de alelos por locus, si se tiene en cuenta del número total de accesiones analizadas en el estudio de variabilidad y también la pertenencia geográfica del material vegetal examinado. Por lo tanto, se puede hablar de una gran riqueza genética presente en la colección del Banco de Germoplasma del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax y en el olivar de Túnez en manera general. Dicha riqueza se puede explicar por el hecho de que Túnez, como la mayoría de los países olivareros tradicionales, posee un patrimonio genético importante que se ha ido ampliándose y diversificándose a lo largo de la historia del cultivo.

Las frecuencias de los distintos alelos fueron bastante variables, siendo la menor (0,6%) para los alelos 177 y 202 del locus UDO99-43, 181 del locus *ssrOeUA-DCA9*, 258 del locus *ssrOeUA-DCA15* y 136 del locus *ssrOeUA-DCA16*. Las mayores frecuencias (62,6% y 60,1%) se observaron para los alelos 261 del locus *ssrOeUA-DCA15* y 171 del locus *ssrOeUA-DCA9* respectivamente (Tabla 3).

Las frecuencias menos elevadas se corresponden con los alelos únicos, presentes exclusivamente en una sola accesión de la colección. Estos alelos son de gran interés ya que pueden servir de marcadores específicos de una variedad determinada. Los alelos que están presentes en dos o tres variedades también pueden considerarse como marcadores interesantes. La Tabla 4 recoge los alelos únicos y los alelos presentes en sólo dos o tres individuos, indicando en cada caso el nombre de las accesiones correspondientes.

Tabla 4. Alelos presentes exclusivamente en una, dos o tres accesiones, de los 8 SSR evaluados.

Alelos presentes en una accesión			Alelos presentes en dos accesiones			Alelos presentes en tres accesiones		
Locus	Alelo	Denominación	Locus	Alelo	Denominación	Locus	Alelo	Denominación
ssrOeUA-DCA15	258	Chemlali Bouchouka	ssrOeUA-DCA18	166	Mallahi El Mouammar Sig 1G	ssrOeUA-DCA18	180	Marsaline
					Chemlali Balhi			Mallahi El Mouammar Sig 1G
								BL32 G
ssrOeUA-DCA16	136	Chemlali Balhi	ssrOeUA-DCA16	152	Chemlali Balhi	ssrOeUA-DCA3	241	Mallahi El Mouammar Sig 1G
					Zarbout Louzir			Autre Zarrazi
								Chemlali Balhi
ssrOeUA-DCA16	170	Marsaline	ssrOeUA-DCA16	122	Besbessi	ssrOeUA-DCA3	249	Marsaline
					Mallahi El Mouammar Sig 1G			Mallahi El Mouammar Sig 1G
ssrOeUA-DCA9	181	Chemlali Bouchouka	ssrOeUA-DCA9	175	Chemlali Chouamekh	ssrOeUA-DCA16	160	Chemlali Barrani
					Chemlali Ontha Tataouine			Chemlali Ontha Tataouine
								Chemlali Chouamekh
UDO99-43	177	Ech- Chahla /g	ssrOeUA-DCA9	196	Sig 112PG	GAPU71B	117	Mallahi El Mouammar Sig 1G
					CHL Sig 12PG			Marsaline
UDO99-43	202	Zarbout Louzir	ssrOeUA-DCA9	202	Chemlali Balhi	GAPU101	217	Besbessi
					BL32 G			Mallahi El Mouammar Sig 1G
								Marsaline
<b>Total: 6</b>			ssrOeUA-DCA9	208	Mallahi El Mouammar Sig 1G	<b>Total: 6</b>		
					Kotti K32			
			UDO99-43	187	Chahla			
					Jeddaria Chaal			
			<b>Total: 8</b>					

Como se indica más adelante en el apartado 4, durante el análisis de la colección, se detectó la presencia de genotipos idénticos correspondientes a la existencia de duplicaciones en la colección. Un nuevo análisis de las composiciones alélicas, llevado a cabo tras descartar todas las duplicaciones observadas (resultados no mostrados), reveló una ligera variación en las frecuencias de los alelos que en ningún caso afecta a las conclusiones de este trabajo.

## **1.2 Índices de Heterocigosidad y Contenido en Información Polimórfica de los SSRs**

La heterocigosidad esperada se calculó a partir de la frecuencia de cada uno de los alelos asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987) que establece que la composición genética de una población natural permanece en equilibrio mientras no actúen la selección natural, ni ningún otro factor como la mutación o la deriva.

La heterocigosidad esperada es un indicador del nivel de información del locus. Por debajo de 0,5 la heterocigosidad esperada se considera insuficiente. En este trabajo, la heterocigosidad media esperada ( $H_E$  media) fue de 0,68 y osciló entre 0,54 (locus *ssrOeUA-DCA15*) y 0,82 (locus *UDO99-43*). En un trabajo similar, Belaj *et al.*, (2004d) obtuvieron una variación de la heterocigosidad de 0,15 a 0,95 con 9 microsatélites de la serie *UDO99* en 35 variedades de olivo españolas y italianas.

La heterocigosidad observada es el número de individuos heterocigotos dividido por el número total de individuos de la población analizada. La heterocigosidad media observada ( $H_O$  media) en el total de la población estudiada fue del orden de 0,77 y varió desde 0,31 (*ssrOeUA-DCA 15*) a 0,96 (*ssrOeUA-DCA18* y *UDO99-43*).

Los valores de heterocigosidad esperada y observada para cada uno de los locus analizados se muestran en la tabla 5. Con la excepción de los loci *ssrOeUA-DCA15* y *ssrOeUA-DCA9*, la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) fue siempre inferior a la observada ( $H_O$ ).

**Tabla 5.** Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ), Heterocigosidad observada ( $H_O$ ), Frecuencia de alelos nulos ( $F_0$ ), Número de heterocigotos y Número de homocigotos en la población para cada uno de los locus estudiados.

	Heterocigosidad esperada ( $H_E$ )	Heterocigosidad observada ( $H_O$ )	Frecuencia de Alelos nulos ( $F_0$ )	Numero de heterocigotos	Número de homocigotos
ssrOeUA-DCA18	0,72	0,96	-0,16	81	3
ssrOeUA-DCA3	0,65	0,72	-0,05	61	23
ssrOeUA-DCA15	0,54	0,31	+0,3	26	57
ssrOeUA-DCA16	0,74	0,86	-0,09	71	11
GAPU71B	0,66	0,91	-0,17	77	7
ssrOeUA-DCA9	0,60	0,52	+0,08	44	40
GAPU101	0,75	0,91	-0,1	74	7
UDO99-43	0,82	0,96	-0,08	79	3
<b>Media*</b>	0,68	0,77	-	513	151

\* El número de heterocigotos y el número de homocigotos son total

La frecuencia de alelos nulos ( $F_0$ ) es un indicador importante de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos de una población. Dicha frecuencia es calculada mediante un algoritmo iterativo basado en las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos analizados (Summers y Amos, 1997). 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 *et al.* 1995). Cuando la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) es inferior o igual a la heterocigosidad observada ( $H_O$ ), (como es el caso en todos los locus estudios excepto el ssrOeUA-DCA15 y ssrOeUA-DCA9) (Tabla 5), la frecuencia de alelos nulos es entonces negativa o cero. En este caso, se puede concluir que el análisis realizado refleja realmente la variabilidad de la población. En caso contrario (como ocurre con ssrOeUA-DCA15 y ssrOeUA-DCA9), la presencia de alelos nulos disminuye la heterocigosidad esperada y en consecuencia resulta en una sobreestimación del nivel de homocigosidad. De esta forma, al observar un individuo homocigoto en el locus ssrOeUA-DCA15, no se sabe si es homocigoto realmente o si se trata de heterocigoto para un alelo nulo. Efectivamente, en caso del locus ssrOeUA-

DCA 15 existen 57 individuos homocigotos. De ellos, 46 poseen el alelo de tamaño 261, 12 el alelo 241 y uno posee el alelo 252. Este exceso de homocigosis puede ser debido, en realidad, a la existencia de alelos nulos, por lo que estos individuos podrían no ser realmente homocigotos. En caso del *ssrOeUA-DCA 9*, la frecuencia estimada de alelos nulos es muy cercana a “0” ( $F_0 = 0,08$ ), por lo cual se puede considerar como nula. Es decir que el número de homocigotos detectado en este locus es muy cercano al que existe realmente. Noormohammadi *et al.*, (2007) lograron valores elevados de la frecuencia de alelos nulos para *ssrOeUA-DCA15* ( $F_0 = 0,61$ ) pero en caso de *ssrOeUA-DCA9* se obtuvieron un valor negativo ( $F_0 = -0,011$ ) en dicho estudio.

El número total de heterocigotos marca la diversidad genética de una población. La presencia de un 77,26% de heterocigotos indica que la colección analizada posee una gran diversidad genética y confirma, por lo tanto, lo que se ha mencionado anteriormente.

Los índices previamente mencionados fueron igualmente recalculados tras eliminar los datos provenientes de las duplicaciones existentes en el Banco de Germoplasma del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax. En este caso se obtuvo una media de heterocigosidad esperada ( $H_{E\text{ media}} = 0,87$ ), una media de heterocigosidad observada ( $H_{O\text{ media}} = 0,94$ ) y un valor positivo de la frecuencia de alelos nulos en el locus *ssrOeUA-DCA15* ( $F_0 = 0,12$ ), nulo para el locus *ssrOeUA-DCA 9* ( $F_0 = 0,00$ ) y negativo para el resto de los locus. Aunque los resultados obtenidos tras dicha modificación son ligeramente distintos, la variación detectada con respecto al análisis de la totalidad de la colección no afecta en ningún caso a las conclusiones de este trabajo.

El estudio realizado sobre los distintos indicadores de la variabilidad genética permite concluir que el olivar de Túnez en general y particularmente la colección estudiada, presenta una gran riqueza genética. Este dato coincide con la gran variedad detectada también en los estudios morfológicos realizados previamente (Trigui *et al.*, 2002).

El contenido en información polimórfica (PIC) representa las posibles combinaciones entre los distintos alelos obtenidos y un índice de la capacidad informativa de cada uno de los microsatélites. Como se resume en la Tabla 6, el PIC promedio de todos los locus fue de 0,64 mientras que de forma individual osciló entre 0,48 (en *ssrOeUA-DCA15*) y 0,79 (en *GAPU101*).

Con la excepción de *ssrOeUA-DCA15*, todos los loci utilizados en este trabajo presentan valores del PIC superiores al valor de 0,5 indicado como umbral por encima del cual un marcador se considera informativo y dos de ellos (*GAPU101* y *UDO99-43*) presentan un PIC superior a 0,7, valor por encima del cual el marcador es especialmente de utilidad para la construcción de mapas genéticos (Bandelj *et al.*, 2004).

**Tabla 6.** Contenido en información polimórfica (PIC) para los SSRs evaluados.

SSR	Contenido en información polimórfica (PIC)
<b><i>ssrOeUA-DCA3</i></b>	0,58
<b><i>ssrOeUA-DCA9</i></b>	0,56
<b><i>ssrOeUA-DCA15</i></b>	0,48
<b><i>ssrOeUA-DCA16</i></b>	0,69
<b><i>ssrOeUA-DCA18</i></b>	0,67
<b><i>GAPU71B</i></b>	0,60
<b><i>GAPU101</i></b>	0,70
<b><i>UDO99-43</i></b>	0,79
<b>Media</b>	0,64

Los valores obtenidos en este estudio demuestran un buen contenido en información polimórfica y, en consecuencia, un alto poder discriminativo del conjunto de microsatélites estudiados. Bandelj *et al.*, (2004) y Noormohammadi *et al.*, (2007) obtuvieron valores similares de contenido en información polimórfica en respectivos estudios en poblaciones de olivos.

## 2. DISCRIMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ

El estudio de los perfiles alélicos de los individuos analizados reveló la presencia de 40 genotipos. En total, el 47,61% de los individuos presentes en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax representan perfiles alélicos distintos para los 8 microsatélites analizados. El resto de las accesiones

(44) se trata de duplicaciones existentes en el mencionado Banco. Dichas duplicaciones estaban incluidas en 11 genotipos diferentes (Tabla 7), que agrupaban desde dos accesiones (como en el caso de los genotipos 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 que corresponden a BL2/BL31, ‘Chemlali Zarzis’, ‘Injassi Hchichina’, ‘Chétoui’, ‘Marsaline’, ‘Fakhari Tataouine’, ‘Chemlali Chouamekh’ respectivamente), hasta 31 accesiones (caso del genotipo 1, que se correspondían con la variedad ‘Chemlali Sfax’). Las sinonimias y homonimias detectadas en el presente trabajo se indican en detalle el siguiente apartado.

Una vez definidas las 40 variedades distintas, y en base a la información disponible para realizar este trabajo se procedió a asignarle la denominación definitiva a cada una de ellas. Como se indica en la Tabla 7, esto fue posible para 26 variedades, mientras que no se pudo realizar en 14 variedades. En su mayoría se trataba de denominaciones asignadas circunstancialmente por el autor de la prospección, (como por ejemplo K56PG, BL32 G, entre otras).

**Tabla 7.** Perfiles alélicos y genotipos diferentes obtenidos para las 84 accesiones evaluadas. Se indica para cada una de ellas la denominación en colección así como el genotipo al que pertenecen. En aquellos casos en los que las denominaciones son muy conocidas, se les ha asignado la denominación definitiva después de la identificación de las mismas.

DENOMINACIÓN ACCESIÓN COLECCIÓN	ssrOeUA-DCA18-1	ssrOeUA-DCA18-2	ssrOeUA-DCA3-1	ssrOeUA-DCA3-2	ssrOeUA-DCA15-1	ssrOeUA-DCA15-2	ssrOeUA-DCA16-1	ssrOeUA-DCA16-2	GAPU71B-1	GAPU71B-2	ssrOeUA-DCA9-1	ssrOeUA-DCA9-2	GAPU101-1	GAPU101-2	UDO99-43-1	UDO99-43-2	GENOTIPO	DENOMINACIÓN DEFINITIVA VARIEDAD
Chemlali Sfax	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	- x	-	-	-	1	‘Chemlali Sfax’
Chemlali Sfax COI	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Sig 3PG	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Baldi Charqia BL8	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
BL24	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	-	-	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Kotti K18	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
CHL Ouled Youssef Sig 13	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Hchichina 10	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Sehli Sned 7	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Kotti K12	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
K17	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Hchichina 6	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
BL26	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’
Chemlali Bjawa	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	‘Chemlali Sfax’

DENOMINACIÓN ACCESIÓN COLECCIÓN	ssrOeUA-DCA18-1	ssrOeUA-DCA18-2	ssrOeUA-DCA3-1	ssrOeUA-DCA3-2	ssrOeUA-DCA15-1	ssrOeUA-DCA15-2	ssrOeUA-DCA16-1	ssrOeUA-DCA16-2	GAPU7IB-1	GAPU7IB-2	ssrOeUA-DCA9-1	ssrOeUA-DCA9-2	GAPU101-1	GAPU101-2	UDO99-43-1	UDO99-43-2	GENOTIPO	DENOMINACIÓN DEFINITIVA VARIEDAD
Zalmati Zarzis	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Sig 15	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Sehli Gafsa Dawla1	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
BL23	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
BL20	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Horr Sfax	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
BL16 G	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Hchichina 7	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Kotti K9G	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Kotti k21	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Kotti K30G	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Sig 113 G	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Sehli Jbeniana BL15 Bent Louzir	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
BL37	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Chemlali Ouled Youssef	170	174	228	235	261	261	-	-	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Sahli Gafsa autre que Gtar	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Horr Blettech BL11 PG	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	1	`Chemlali Sfax`
Khechinet Sig	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	-	-	2	`Khechinet Sig`
SIG19	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	179	212	2	`Khechinet Sig`
Bou Bazzoula BL19PG	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	179	212	2	`Khechinet Sig`
Kotti K23 (avec mam)	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	179	212	2	`Khechinet Sig`
BL2	174	176	228	235	261	261	143	143	121	121	171	183	191	197	166	170	3	*
BL31	174	176	228	235	261	261	143	143	121	121	171	183	191	197	166	170	3	*
Chemlali Zarzis	172	174	235	235	241	241	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	4	`Chemlali Zarzis`
Mfartah Hchichina H9	172	174	235	235	241	241	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	4	`Chemlali Zarzis`
Injassi Hchichina	172	174	235	235	241	261	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	5	`Injassi Hchichina`
Chemlali Mahares	172	174	235	235	241	261	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	5	`Injassi Hchichina`
Chétoui 2	170	174	228	235	241	241	120	172	117	123	193	193	191	205	175	214	6	`Chétoui`
Chétoui 2 à mam	170	174	228	235	241	241	120	172	117	123	193	193	191	205	175	214	6	`Chétoui`
Marsaline	174	180	239	249	261	261	147	170	117	127	161	171	197	217	210	214	7	`Marsaline`
Meski Bjawa	174	180	239	249	261	261	147	170	117	127	161	171	197	217	210	214	7	`Marsaline`
Fakhari Tataouine	168	172	239	245	241	241	147	172	141	141	161	171	199	205	172	212	8	`Fakhari Tataouine`

DENOMINACIÓN ACCESIÓN COLECCIÓN	ssrOeUA-DCA18-1	ssrOeUA-DCA18-2	ssrOeUA-DCA3-1	ssrOeUA-DCA3-2	ssrOeUA-DCA15-1	ssrOeUA-DCA15-2	ssrOeUA-DCA16-1	ssrOeUA-DCA16-2	GAPU7IB-1	GAPU7IB-2	ssrOeUA-DCA9-1	ssrOeUA-DCA9-2	GAPU101-1	GAPU101-2	UDO99-43-1	UDO99-43-2	GENOTIPO	DENOMINACIÓN DEFINITIVA VARIEDAD
Meski Zarzis	168	172	239	245	241	241	147	172	141	141	161	171	199	205	172	212	8	`Fakhari Tataouine`
Chemlali Chouamekh	168	170	228	239	252	261	147	160	123	127	175	204	189	197	175	175	9	`Chemlali Chouamekh`
Chemlali Tataouine10	168	170	228	239	252	261	147	160	123	127	175	204	189	197	175	175	9	`Chemlali Chouamekh`
Chemchali Gtar 3	172	174	228	239	241	264	120	147	121	127	171	193	191	205	175	185	10	`Chemchali Gtar`
Jemri Bouchouka	172	174	228	239	241	264	120	147	121	127	171	193	191	205	175	185	10	`Chemchali Gtar`
Kotti K30 PG	172	174	228	239	241	264	120	147	121	127	171	193	191	205	175	185	10	`Chemchali Gtar`
Chemlali Sig	170	172	228	228	241	264	120	157	121	123	193	193	191	191	175	185	11	`Chemlali Sig`
Kotti K14	170	172	228	228	241	264	120	157	121	123	193	193	191	191	175	185	11	`Chemlali Sig`
Sig 14 PG	170	172	228	228	241	241	120	157	121	123	193	193	191	191	175	185	11	`Chemlali Sig`
Besbessi	172	172	239	245	241	261	122	147	123	141	171	193	189	217	172	175	12	`Besbessi`
Lattout Sned 3	172	174	228	245	241	264	-	-	121	141	161	193	191	199	172	175	13	`Lattout Sned`
CHL Sig 12PG	170	172	228	228	241	264	120	157	121	123	193	196	191	191	175	185	14	*
Chemlali Ontha Tataouine	168	174	228	239	-	-	143	160	127	141	171	175	191	197	166	166	15	`Chemlali Ontha Tataouine`
Chemlali Bouchouka	168	170	235	235	258	261	147	147	121	127	181	204	191	205	170	214	16	`Chemlali Bouchouka`
Horr Louzir BL32 PG	168	170	235	245	241	261	120	157	121	123	171	193	191	197	175	212	17	`Horr Louzir`
Chahla	172	174	235	235	241	261	143	143	121	127	193	204	189	205	187	212	18	*
Semni Jbeniana Sig 0	168	176	228	239	241	261	120	120	121	127	193	204	189	205	185	212	19	`Semni Jbeniana`
Jeddaria Chaal	170	174	235	235	241	252	147	147	123	141	171	183	189	205	187	212	20	`Jeddaria Chaal`
Mallahi El Mouammar Sig 1G	166	180	241	249	241	241	122	147	117	121	193	208	205	217	172	175	21	`Mallahi El Mouammar`
Tounsi Gafsa	168	172	228	239	241	241	147	147	121	141	171	171	191	205	175	212	22	`Tounsi Gafsa`
Autre Zarrazi	172	172	241	249	241	264	147	157	123	141	171	193	191	199	185	212	23	*
Ech- Chahla /g	170	170	228	228	261	264	120	159	121	123	171	193	191	197	175	177	24	`Ech-Chahla`
Neb Tataouine	170	172	239	239	241	264	159	172	121	141	171	183	183	199	170	172	25	`Neb Tataouine`
Kotti K9 PG	170	174	228	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	179	210	26	*
Lqam El Kotti Kotti K3	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	210	27	*
Kotti K56 G	170	174	228	239	261	261	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	28	*
Chemlali Barrani	170	174	228	239	252	261	120	160	121	123	171	204	191	197	175	212	29	`Chemlali Barrani`
K56PG	168	176	235	235	241	264	120	143	121	127	193	204	183	205	170	214	30	*
Chemlali Balhi	166	168	235	241	241	264	136	152	121	121	183	202	189	189	175	179	31	`Chemlali Balhi`
Sig 112PG	170	174	228	235	241	264	120	157	121	123	193	196	191	191	175	185	32	*
Zeitoun Boubazzoula COI	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	171	185	189	205	179	210	33	*
Kotti K32	168	176	235	235	241	264	120	143	121	127	193	208	183	205	170	214	34	*
BL32 G	174	180	235	235	261	261	120	143	121	121	171	202	191	191	175	214	35	*
Zarrazi Kgh	168	170	228	239	241	241	157	172	127	141	161	193	-	-	172	175	36	`Zarrazi`

DENOMINACIÓN ACCESIÓN COLECCIÓN	ssrOeUA-DCA18-1	ssrOeUA-DCA18-2	ssrOeUA-DCA3-1	ssrOeUA-DCA3-2	ssrOeUA-DCA15-1	ssrOeUA-DCA15-2	ssrOeUA-DCA16-1	ssrOeUA-DCA16-2	GAPU7IB-1	GAPU7IB-2	ssrOeUA-DCA9-1	ssrOeUA-DCA9-2	GAPU101-1	GAPU101-2	UDO99-43-1	UDO99-43-2	GENOTIPO	DENOMINACIÓN DEFINITIVA VARIEDAD
Zeitoun Boubazzoula COI	170	174	235	235	261	261	120	147	121	141	161	171	189	205	179	212	37	*
Dhokar Nafti	174	176	228	239	252	252	120	143	123	141	171	193	183	197	175	179	38	‘Dhokar Nafti’
Zarbout Louzir	168	172	228	228	261	264	120	152	121	121	171	185	183	191	170	202	39	‘Zarbout Louzir’
Kotti K11	170	174	228	235	261	261	120	143	121	141	171	171	191	199	166	212	40	*

<sup>x</sup>- Dato no disponible

\*. En estas accesiones no se ha podido asignar una denominación definitiva por no disponer en este trabajo de información suficiente.

Tabla 7 (Cont.)

Como se mencionó en el apartado de metodología, también se estimó la probabilidad de identidad (PI) que representa la probabilidad de que un genotipo determinado elegido al azar sea idéntico al de otro individuo (Waits et al., 2001).

Como se muestra en la tabla 8, la media de la probabilidad de identidad obtenida en este estudio es 0,15 y osciló entre 0,05 en UDO99-43 y 0,26 en ssrOeUA-DCA15. Noormohammadi et al., (2007) obtuvieron valores semejantes de Probabilidad de Identidad ( $PI_{media} = 0,18$ ) con los mismos marcadores.

El valor acumulativo total de la Probabilidad de Identidad del conjunto de los 8 microsatélites fue muy bajo ( $1,23 \times 10^{-7}$ ). Esto confirma el gran poder discriminativo del conjunto de marcadores seleccionados en este estudio.

Los marcadores más informativos fueron UDO99-43, GAPU101, ssrOeUA-DCA16 y ssrOeUA-DCA18. Estos marcadores permitieron diferenciar el 82,5 % del total de variedades discriminadas con el conjunto de los 8 microsatélites, y por otra parte presentaron una media de Contenido en Información Polimórfica de 0,71 y una Probabilidad de Identidad Acumulada de  $7,6 \times 10^{-5}$ .

Con un Contenido en Información Polimórfica de 0,79 y una Probabilidad de Identidad de 0,05, el marcador UDO99-43 fue capaz por sí solo de discriminar el 52,5% de las accesiones discriminadas por el conjunto de los 8 microsatélites. Sólo con la utilización del marcador UDO99-43 se pudieron detectar 21 genotipos distintos.

**Tabla 8.** Probabilidad de Identidad (PI) en las 84 accesiones analizadas

SSR	Probabilidad de identidad (PI)
<b>ssrOeUA-DCA3</b>	0,18
<b>ssrOeUA-DCA9</b>	0,19
<b>ssrOeUA-DCA15</b>	0,26
<b>ssrOeUA-DCA16</b>	0,10
<b>ssrOeUA-DCA18</b>	0,12
<b>GAPU71B</b>	0,17
<b>GAPU101</b>	0,10
<b>UD99-O43</b>	0,05
<b>Media</b>	0,15

### 3. SINONIMIAS Y HOMONIMIAS DETECTADAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE “BOUGHRARA” DE SFAX DE TÚNEZ

Al igual que en otros países tradicionalmente olivareros, el criterio a la hora de denominar a las variedades de olivo de Túnez se ha basado en la asignación de nombres genéricos por los agricultores, lo que ha generado una gran confusión. La aclaración de dicha confusión es un paso importante en el establecimiento de una olivicultura moderna en Túnez. En estudios previos (Mehri et al., 1997; Trigui et al., 2002), detectaron la existencia de homonimias (una misma denominación para diferentes variedades) y sinonimias (diferentes denominaciones para una misma variedad) en el olivar de Túnez mediante el análisis de caracteres morfológicos y/o agronómicos. Igualmente, Belaj et al., (2001) Khadari et al., (2003); Rallo et al., (2005); Noormohammadi et al., (2007), observaron problemas similares en variedades de olivo de distintos países olivareros.

La integración de las metodologías de identificación optimizadas actualmente en olivo, tanto morfológicas y/o agronómicas como moleculares (ADN), nos permiten sin duda la correcta catalogación del material cultivado de esta especie, procedente de trabajos de prospección y/o de Bancos de Germoplasma. Esta catalogación es sin duda de vital importancia para la certificación del material propagado por la industria viverística.

### 3.1. Sinonimias

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, se ha detectado un elevado número de duplicados (un total de 44) en el Banco de Germoplasma de “Boughrara” de Sfax. En la tabla 9 se representan los casos de sinonimias. Las denominaciones circunstancialmente adoptadas para el manejo de la colección y basadas en un código alfanumérico no se han incluido en la mencionada tabla (a modo de ejemplo K56PG, Hchichina 7 y Kotti K9G), por las razones antes mencionadas.

**Tabla 9.** Sinonimias detectadas en la colección

<b>Variedad</b>	<b>Sinonimias</b>
'Chemlali Sfax'	Baldi Charqia
	Sehli Sned
	Chemlali Bjawa
	Zalmati Zarzis
	Sehli Gafsa
	Horr Sfax
	Sehli Jbeniana Bent Louzir
	Chemlali Ouled Youssef
	Horr Blettech
'Khechinet Sig'	Bou Bazzoula
'Chemlali Zarzis'	Mfartah Hchichina
'Injassi Hchichina'	Chemlali Mahares
'Marsaline'	Meski Bjawa
'Fakhari Tataouine'	Meski Zarzis
'Chemlali Chouamekh'	Chemlali Tataouine
'Chemchali Gtar'	Jemri Bouchouka

El mayor número de duplicados así como de sinonimias fue detectado para la variedad I 'Chemlali Sfax', lo que se justifica porque esta variedad es la variedad más importante y difundida de Túnez, debido a que presenta características agronómicas y tecnológicas interesantes, que la hacen ser objeto de una difusión importante para establecer nuevas plantaciones.

Por otra parte, y como se representa en la Tabla 10 en la que se muestra la procedencia geográfica de las sinonimias detectadas, 'Chemlali Sfax' tiene sinonimias en todas las regiones olivareras importantes del país a excepción de las zona de “Tataouine”.

‘Chemlali Sfax’ incluye diversas denominaciones atribuidas por los agricultores en distintas zonas o incluso en la misma región. Esta variedad tiene el nombre de ‘Chemlali Sfax’ en la zona de “Sfax” (Sur del país), Chemlali Ouled Youssef en la zona de “Ouled Youssef” (cerca de “Sfax”) y ‘Chemlali Bjawa’ en la zona de “Bjawa” (Norte del país).

Lo mismo ocurre con otro grupo de denominaciones como Sehli (olivo de la costa) utilizado con un “apellido” que especifica la zona. Sehli Sned proviene de la zona continental de Sned, Sehli Gafsa de la región continental de Gafsa y Sehli Jbeniana de la zona litoral de Jbeniana. Todas estas denominaciones que llevan el nombre Sehli (de la costa) son también sinonimias de ‘Chemlali Sfax’ y sabiendo que la denominación Chemlali es tradicionalmente frecuente en la costa, se puede concluir que posiblemente los antiguos agricultores de las regiones continentales (Gafsa y Sned) trajeron esta variedad de la zona litoral atribuyéndole el nombre Sehli (olivo de la costa) sin guardar su nombre genérico de origen Chemlali (frutos pequeños en lengua antigua).

Otras denominaciones genéricas sinonimias de ‘Chemlali Sfax’ son Baldi Charquia (paisano de la zona de Charquia), Horr Sfax (auténtico de la región de Sfax), Horr Bettlech (auténtico de la región de Bettlech) y también Zalmati Zarzis, denominación cuyo significado no se sabe. Las denominaciones que han sido atribuidas por el autor de la prospección, como por ejemplo las denominaciones BL11PG, Hchichina 6, CHL Ouled Youssef Sig 13, Kotti K21 etc... se consideran simplemente como duplicaciones.

Se ha detectado un caso de sinonimia en la variedad ‘Khechinet Sig’ que lleva el nombre de Bou Bazzoula, este último significa fruto con pezón mientras que ‘Khechinet Sig’ significa frutos gordos. Esta variedad tiene el fruto gordo y con pezón a la vez (Trigui et *al.*, 2002) y posiblemente unos agricultores lo han atribuido el primer nombre genérico mientras que otros lo han atribuido el segundo.

Otro caso de sinonimia se ha detectado para la variedad ‘Chemlali Zarzis’ (Fruto pequeño de la zona de Zarzis) conocida también con el nombre de Mfartah Hchichina (Fruto aplanado de la zona de Hchichina). También en este caso, el fruto es aplanado y pequeño a la vez (Trigui et *al.*, 2002) y cada uno de los agricultores le atribuyó un nombre según el criterio que veía más llamativo. El mismo caso de confusión ocurrió posiblemente con las accesiones denominadas ‘Injassi Hchichina’ (Fruto con forma de pera de la zona de Hchichina) y Chemlali Mahares (Fruto pequeño de la zona de Mahares) dos individuos que presentaron el mismo genotipo y la denominación

finalmente adoptada para esta variedad en este estudio ha sido la ‘Injassi Hchichina’ por ser la denominación más conocida en las zonas donde se cultiva.

Otro caso de sinonimia que se ha detectado ha sido para ‘Marsaline’, una variedad de origen francés que probablemente fue introducida en Túnez durante la época colonial francesa y cuyo nombre ha sido cambiado por los agricultores hacia Meski Bjawa, (fruto perfumado de la zona de Bjawa) asociándolo al carácter perfumado del fruto, y además porque para ellos es más fácil de pronunciar y de aprender que su nombre de origen.

De la variedad ‘Chétoui’ (segunda variedad más importante en Túnez), se ha comprobado que las accesiones Chétoui y Chétoui 2 à mam (con pezón) son duplicados. Otras sinonimias detectadas fueron las denominaciones de ‘Fakhari Tataouine’ y Meski Zarzis; ‘Chemlali Chouamekh’ y Chemlali Tataouine; ‘Chemchali Gtar’ y Jemri Bouchouka donde no se dispone de información sobre el significado exacto del nombre.

La presencia de sinonimias en el olivar de Túnez es principalmente debida a dos razones. Por una parte, los nombres atribuidos por los agricultores son en la mayoría de los casos de carácter subjetivo basado sobre todo en la descripción del fruto como por ejemplo: ‘Chemlali’= fruto pequeño, ‘Ingassi’= fruto con forma de pera, ‘Chala’= fruto bonito etc.... Consecuentemente, existen denominaciones distintas de la misma variedad dependiendo de la opinión del agricultor, del dialecto que usa etc... Por otra parte, los individuos de una misma variedad pueden manifestar caracteres morfológicos diferentes en distintas regiones, como resultado de la influencia de factores externos tal como las condiciones climáticas, el manejo del cultivo y el estado de planta (Rallo *et al.*, 2005). La presencia de sinonimias es muy frecuente en olivo sobre todo en los países olivareros tradicionales, en muchos casos sólo se ha detectado tras el incremento en el uso de marcadores microsatélites y otros tipos de marcadores (Mekuria *et al.*, 1999; Belaj *y al.*, 2001; Khadari *et al.*, 2003; Rallo *et al.*, 2005; Noormohammadi *et al.*, 2007).

**Tabla 10.** Número y distribución por procedencia geográfica de las sinonimias detectadas en la colección.

Sinonimias	Procedencia geográfica					Total
	Gafsa	Tataouine	Sfax	Mednine	Tunis	
'Chemlali Sfax'	2	-	6	1	1	10
'Khechinet Sig'	-	-	2	-	-	2
'Chemlali Zarzis'	-	-	1	1	-	2
'Injassi Hchichina'	-	-	2	-	-	2
'Marsaline'	-	-	-	-	2	2
'Fakhari Tataouine'	-	1	-	1	-	2
'Chemlali Chouamekh'	-	1	-	1	-	2
'Chemchali Gtar'	1	1	-	-	-	2

Aparte de los casos de sinonimias reales, existe en la colección muchos casos de genotipos duplicados. Partiendo de la base de que un Banco de Germoplasma debe tener el mayor número de genotipos posible, la presencia de duplicaciones constituye una pérdida de espacio y genera un mayor coste de mantenimiento. La presencia de dichos duplicados en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax es probablemente debida a una identificación errónea a la hora de reunir las variedades en el Banco de Germoplasma, sobre todo debido a que el programa de prospección a través de las zonas del país se basó en la descripción morfológica (Trigui *et al.*, 2006). Sin embargo, es probable que muchas de las duplicaciones sean debidas, simplemente, a confusiones a la hora del establecimiento del Banco de Germoplasma.

### 3.2. Homonimias

El caso más característico de homonimia (la misma denominación es utilizada para variedades diferentes está en la denominación “Chemlali” que se usa en la mayoría de las zonas sin añadirle ninguna especificación (apellido). Sin embargo, existe en esta denominación un amplio espectro genético que llega hasta sólo un alelo de similitud (121 GAPU71B) entre las variedades ‘Chemlali Balhi’ y ‘Chemlali Sfax’ sobre un total de 16 alelos. El problema de homonimias en la denominación “Chemlali”

ha sido detectado en trabajos previos mediante caracterización morfológica y agronómica (Trigui *et al.*, 2006)

Otros casos que se pueden considerar como homonimias se han visto entre las variedades ‘Ech-Chahla’ y Chahla y (Tabla 7). Desde el punto de vista de la pronunciación, estas dos variedades no difieren a nivel del agricultor pero entre ellas existen diferencias genéticas importantes. La similitud es del orden de un alelo (121 GAPIU71B) entre dichas variedades y la pequeña diferencia en los nombres no refleja la gran disimilitud genética. También entre las variedades denominadas ‘Zarrazi’ y Autre Zarrazi no existe diferencia en pronunciación a nivel del agricultor, pero realmente la diferencia genética es bastante grande ya que comparten sólo 3 alelos (241 *ssrOeUA-DCA15*, 141 GAPIU71B y 193 *ssrOeUA-DCA9*).

Por otro lado las dos accesiones denominadas como Zeitoun Boubazzoula COI presentan 3 alelos de diferencia, 2 alelos para el locus *ssrOeUA-DCA9* y un alelo a nivel del locus UDO99-43.

Todos estos casos de homonimias pueden generar graves errores a nivel del agricultor en Túnez a la hora de realizar nuevas plantaciones. Por otra parte, es muy importante resolver este tipo de confusiones con un mercado de aceite de oliva cada vez más dirigido hacia la autenticidad del material y donde los aceites monovarietales pueden constituir próximamente en Túnez, una variante prometedora.

#### **4. RELACIONES GENÉTICAS ENTRE VARIEDADES**

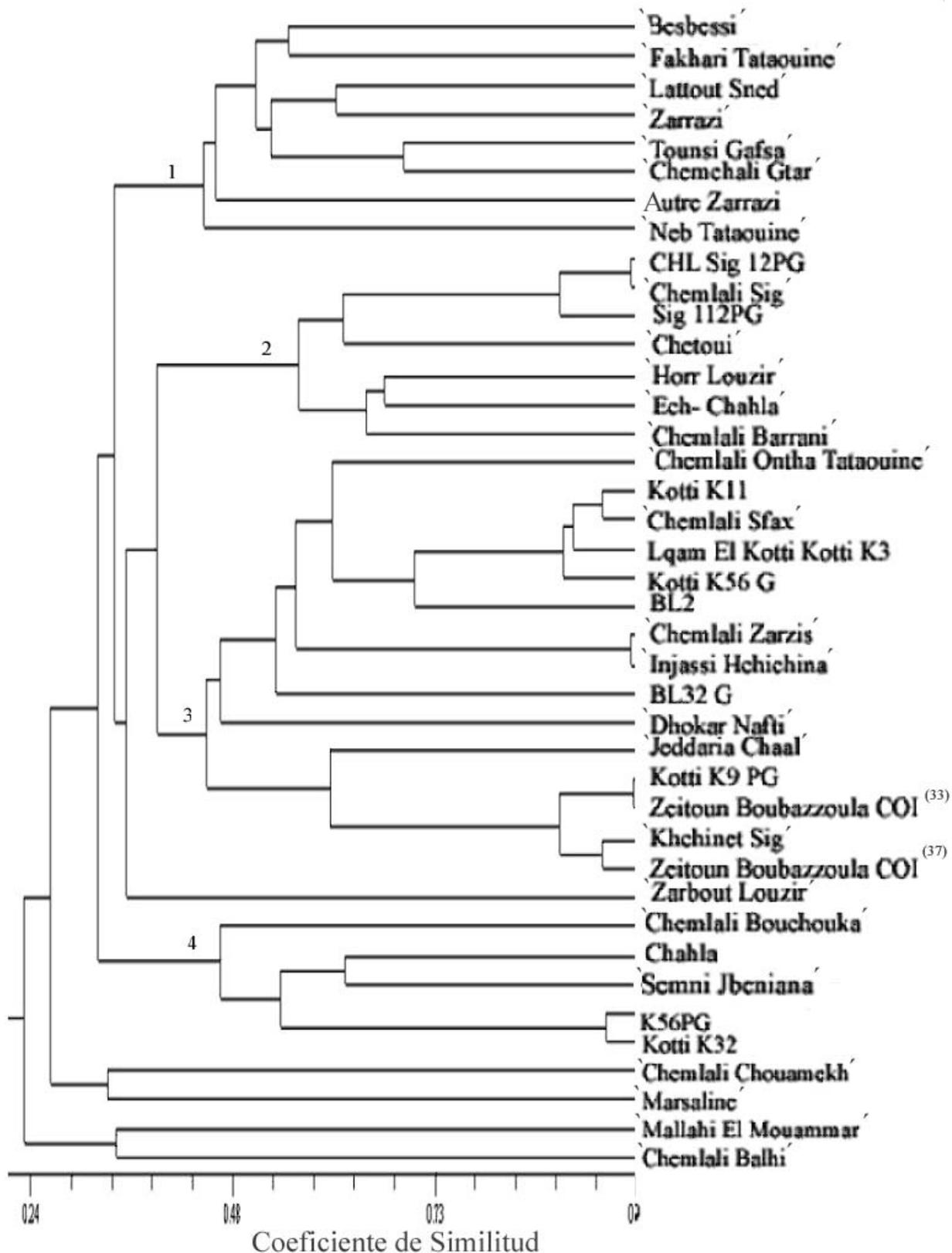
Para el análisis de las relaciones existentes entre las variedades se descartaron previamente todas las duplicaciones existentes en la colección (sólo se consideró un individuo por genotipo). Tal y como se detalla en la metodología, dicho estudio se realizó mediante un análisis de grupos (dendrogramas) y un análisis Factorial de Correspondencia.

##### **4.1. Análisis de grupos**

El análisis de grupos realizado corrobora la gran variabilidad genética existente en la colección. Los genotipos estudiados presentaron coeficientes de similitud generalmente bajos, ya que no superaron el valor de 0,7 en el 73% de las variedades.

Dichos coeficientes oscilaron entre 0,23 (por ejemplo entre ‘Chemlali Balhi’ y ‘Besbessi’) y 0,97 (entre Kotti K9 PG y el genotipo 33 denominado Zitoun Boubazzoula COI). La diversidad genética en el material de Túnez es probablemente debida a la presencia de variedades de origen autóctono mezcladas con variedades introducidas de otros países a lo largo de la historia olivarera del país. En conjunto se puede decir que en Túnez (tal y como observaron Barranco y Rallo (1984) en el olivar español), el cultivo ha sufrido probablemente poca presión selectiva por parte de los agricultores a través del tiempo.

El dendrograma obtenido con el método de agrupación de UPGMA que se representa en la figura 10, mostró un coeficiente cofenético elevado ( $r= 0,93$ ), lo que indica un buen ajuste de los datos originales a la agrupación lograda. Dicho dendrograma se caracteriza por la presencia de ramas relativamente largas demostrando la baja similitud genética. Belaj et al., (2004d), obtuvieron relaciones genéticas similares con variedades procedentes de Italia y España, mientras que Noormohammadi et al., (2007) obtuvieron coeficientes de similitud más elevados para el material procedente de Irán.



**Figura 10.** Dendrograma obtenido para los 40 genotipos definidos en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax

1, 2, 3 y 4 representan los grupos mayoritarios.

En el dendrograma obtenido se puede observar claramente la presencia de 4 grupos distintos, 5 variedades muy separadas genéticamente del resto de los individuos y una serie genotipos con una alta similitud. Dicha similitud puede ser debida tanto a la presencia de variedades muy parecidas genéticamente como a una variación dentro de la misma variedad como consecuencia de mutaciones somáticas. Trabajos previos han señalado la presencia de una variación similar en estudios de variedades de olivo de otros países (Cipriani *et al.*, 2002; Noormohammadi *et al.*, 2007)

El primer grupo incluyó las variedades ‘Besbessi’, ‘Fakhari Tataouine’, ‘Lattout Sned’, ‘Zarrazi’, ‘Tounsi Gafsa’, ‘Chemchali Gtar’, Autre Zarrazi y ‘Neb Tataouine’. En dicho grupo, la similitud es relativamente baja y el coeficiente varió de 0,44 entre ‘Neb Tataouine’ y ‘Besbessi’ por ejemplo, a 0,69 entre ‘Tounsi Gafsa’ y ‘Chemchali Gtar’.

En el segundo grupo se agruparon genotipos que presentaron una gran similitud genética entre ellas (CHL Sig 12PG, ‘Chemlali Sig’ y Sig 112 PG) y, también, genotipos con una diferencia importante (‘Chétoui’, ‘Horr Louzir’, ‘Ech-Chahla’ y ‘Chemlali Barrani’). La similitud observada entre CHL Sig 12PG y ‘Chemlali Sig’ es de 0,97 (solamente un alelo de diferencia a nivel del locus *ssrOeUA-DCA9*). Se puede considerar que estos niveles de diferencia corresponden a una variabilidad intravarietal debida posiblemente a una mutación somática que ha ocurrido durante la reproducción vegetativa. Dichas variaciones parecen ser más frecuentes en variedades muy antiguas (Trujillo, comunicación personal) como es el caso de las variedades de Túnez (Trigui *et al.*, 2002). Además, estas variaciones se observan generalmente en los loci cuyo número de alelos es elevado, como por ejemplo el locus *ssrOeUA-DCA9* (11 alelos), donde la mutación es más probable.

El coeficiente de similitud entre ‘Chemlali Sig’ y Sig112 PG es de 0,88 correspondiente a 3 alelos de diferencia a nivel de los loci *ssrOeUA-DCA18*, *ssrOeUA-DCA3* y *ssrOeUA-DCA 9*. En este caso sería posible considerar estos genotipos como variedades distintas pero la confirmación mediante datos morfológicos y agronómicos es necesaria para poder afirmarlo.

La baja similitud entre ‘Chétoui’, ‘Horr Louzir’, ‘Ech-Chahla’ y ‘Chemlali Barrani’ permite afirmar que se trata de variedades separadas. La similitud más baja de este grupo (0,62) se observó entre ‘Chemlali Barrani’ y ‘Chétoui’.

El tercer grupo comporta el número más elevado de genotipos (un total de 15). A su vez éste se divide en tres subgrupos y 5 variedades separadas del resto de los individuos del grupo. El primer subgrupo está constituido de Kotti K11, 'Chemlali Sfax', Lqam El Kotti Kotti K3 y Kotti K56 G donde la similitud varió de 0,93 entre Kotti K11 y 'Chemlali Sfax' (un alelo de diferencia a nivel del locus GAPU101) a 0,88 entre Kotti K56 G y 'Chemlali Sfax' (un alelo de diferencia a nivel del locus *ssrOeUA-DCA3*). Entre Lqam El Kotti Kotti K3 y 'Chemlali Sfax' existe un alelo de diferencia a nivel del locus UDO99-43. La variedad 'Chemlali Sfax' es una variedad antigua y muy difusa, también los loci donde se han observado las diferencias citadas tienen un gran número de alelos. Consecuentemente es muy probable que dichas diferencias correspondan a mutaciones somáticas ocurridas en la variedad 'Chemlali Sfax'.

El segundo subgrupo del tercer grupo está constituido por Kotti K9 PG, Zeitoun Boubazzoula COI (genotipo 33), 'Khechinet Sig' y Zeitoun Boubazzoula COI (genotipo 37). Entre Kotti K9 PG y el genotipo 33 denominado Zeitoun Boubazzoula COI existe un alelo de diferencia en el locus *ssrOeUA-DCA3*, lo que genera un coeficiente de similitud elevado de 0,97. Entre los dos genotipos denominados Zeitoun Boubazzoula COI existen 3 alelos de diferencia, uno a nivel del locus UDO99-43 y dos a nivel del locus *ssrOeUA-DCA9*. La diferencia entre 'Khechinet Sig' y el genotipo 37 de Zeitoun Boubazzoula COI es de dos alelos a nivel del locus *ssrOeUA-DCA9*. Se puede concluir que lo más probable es que Kotti K9 PG y el genotipo 33 denominado Zeitoun Boubazzoula COI corresponden, realmente, a una misma variedad. Igualmente, 'Khechinet Sig' y el genotipo 37 denominado también como Zeitoun Boubazzoula COI pueden constituir una misma variedad. Sin embargo, el conjunto de los cuatro genotipos de este subgrupo puede también corresponder a una misma variedad, pero que ha sufrido diversas mutaciones en los loci donde se señalaron las diferencias morfológicas o bien que tiene un polimorfismo intravarietal. Para confirmar dichas observaciones, es imprescindible comparar con más datos morfológicos y agronómicos ya que una pequeña diferencia a nivel del genotipo (3 alelos de diferencia como máximo en este sub-grupo) no quiere necesariamente decir que se trata de variedades distintas.

El tercer subgrupo del tercer grupo comporta dos genotipos muy similares, 'Chemlali Zarzis' y 'Injassi Hchichina', con un coeficiente de similitud de 0,97 (un alelo de diferencia en el locus *ssrOeUA-DCA15*). Dichos genotipos pueden corresponder a una misma variedad pero la complementación con otros datos agronómicos y morfológicos es necesaria.

El tercer grupo comporta también genotipos que tienen una baja similitud entre ellos y se separan de los distintos subgrupos en el dendrograma. Estos genotipos son ‘Chemlali Ontha Tataouine’, BL2, BL32G, ‘Dhokar Nafti’ y ‘Jeddaria Chaal’.

El cuarto grupo reúne las accesiones ‘Chemlali Bouchouka’, Chahla, ‘Semni Jbeniana’, K56 PG y Kotti K32. Excepto entre K56 PG y Kotti K32 (coeficiente de similitud de 0,93 con un alelo de diferencia a nivel del locus *ssrOeUA-DCA9*) donde se puede hablar de una variación intravarietal debida a una mutación somática, los genotipos de este grupo se caracterizan por unos coeficientes de similitudes bastante bajos que varían de 0,62 entre Chahla y ‘Semni Jbeniana’ a 0,46 entre ‘Chemlali Bouchouka’ y Chahla por ejemplo.

El agrupamiento mediante el método UPGMA demostró que algunos individuos están genéticamente muy separados del resto de individuos de la colección. Efectivamente, las variedades ‘Zarbout Louzir’, ‘Chemlali Chouamekh’, ‘Marsaline’, ‘Mallahi El Mouammar’ y ‘Chemlali Balhi’ presentan coeficientes de similitudes muy bajos respecto a los genotipos mas próximos (0,34, 0,32, 0,32, 0,33 y 0,33 respectivamente). Además las variedades ‘Chemlali Chouamekh’ y ‘Marsaline’ presentan más similitud entre ellas (0,32) que con el resto de los individuos de la colección (coeficiente de similitud: 0,26). Igualmente ocurre con las variedades ‘Mallahi El Mouammar’ y ‘Chemlali Balhi’, que se distinguen del total de individuos con un 0,23 de similitud y entre ellas con un 0,34 de similitud. Esta separación se explica por la presencia en estas variedades de alelos únicos y/o alelos compartidos con pocas variedades (Tabla 4). La separación de dichas variedades del total de individuos y la separación entre ellas mismas puede ser debida a que estos cultivares fueron introducidos desde distintos sitios, lejanos geográficamente, a lo largo de la historia olivarera de Túnez. Sarri *et al.*, (2006) observaron mediante una combinación de microsatélites parecida a la usada en el presente trabajo que las variedades de olivo procedentes de diferentes partes del Mediterráneo se agrupan diferencialmente. ‘Marsaline’ es una variedad de origen francés que se cultiva en Túnez desde hace mucho tiempo y localizada en Túnez con la sinonimia Meski Bjawa por lo cual su separación del grupo puede ser debida a su origen. Igualmente, esta hipótesis es muy probable en el caso de ‘Mallahi El Mouammar’ cuyo nombre significa (Aceituna de

mesa del Colón). Esta variedad fue probablemente introducida por un agricultor durante la época colonial francesa desde una zona lejana geográficamente.

Para las otras variedades separadas genéticamente, no se dispone en el nombre de ninguna información relativa a la procedencia ya que llevan nombre genéricos relacionados a una descripción de los frutos ('Zarbout Louzir'= "Peonza del ministro" o 'Chemlali Balhi'= "Frutos pequeños con forma de dátiles") o a una zona geográfica a nivel regional ('Chemlali Chouamekh'= "Frutos pequeños de la zona Chouamekh").

A modo de resumen se puede decir que los resultados obtenidos en el análisis de grupos confirma la hipótesis de que, a pesar de que el material analizado en este estudio proviene de zonas geográficas relativamente cercanas en comparación con otros trabajos anteriores, la variabilidad genética es muy elevada. Y que el Banco de Germoplasma del Conservatorio Nacional del Olivo de "Boughrara" de Sfax posee una gran riqueza genética.

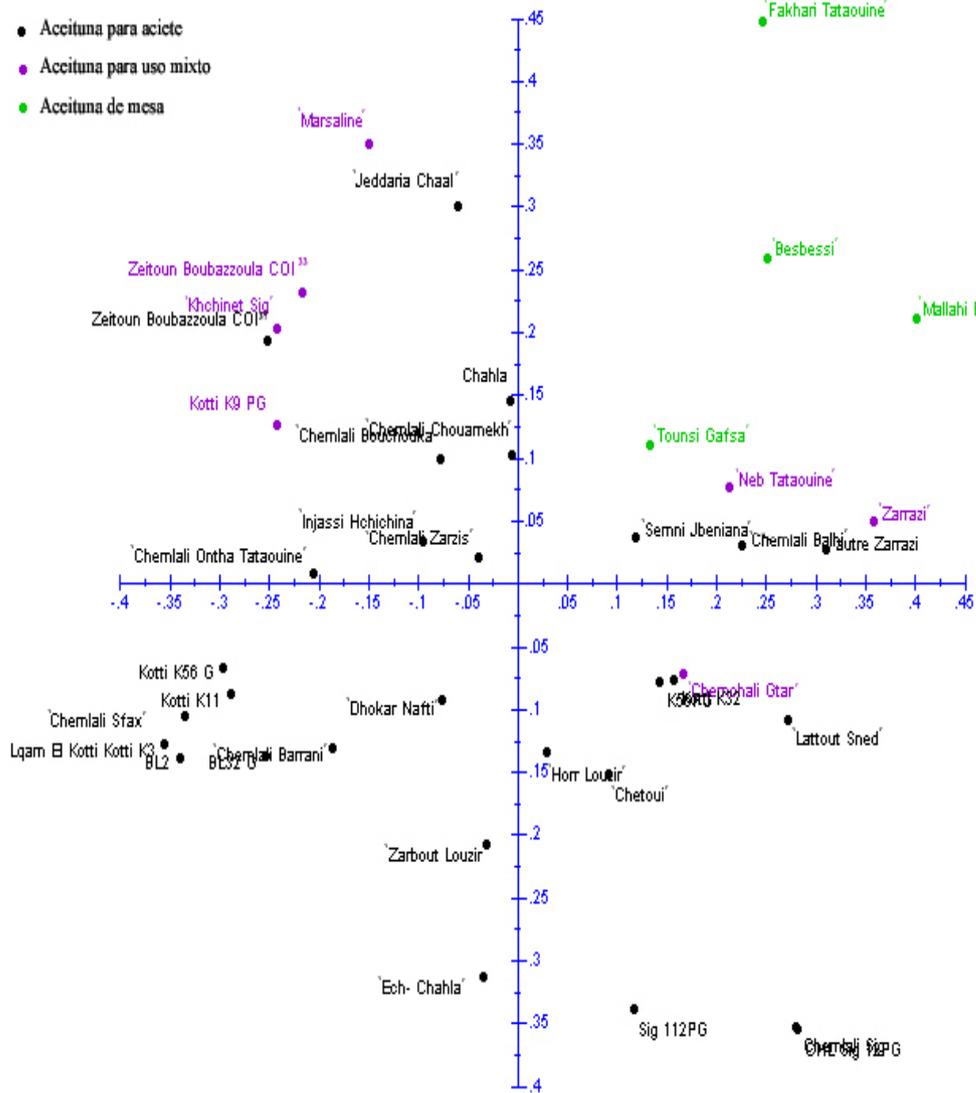
#### **4.2. Análisis factorial de correspondencia**

Con objeto de determinar la posible presencia de correlaciones entre los agrupamientos cladísticos obtenidos y características morfológicas / agronómicas de los diversos genotipos estudiados, se realizó un análisis factorial de correspondencia. Las características agronómicas fueron obtenidas a partir del catálogo de variedades de Túnez existente (Trigui et al., 2002), o a partir de datos aportados por los productores. En algunos casos, estos datos fueron deducidos a partir de las características morfológicas de la aceituna y del endocarpo.

Existen en la colección estudiada 4 variedades usadas mayoritariamente para la elaboración de aceitunas de mesa ('Fakhari Tataouine', 'Besbessi', 'Mallahi El Mouammar' y 'Tounsi Gafsa') y 7 variedades para uso mixto ('Khechinet Sig', 'Marsaline', 'Chemchali Gtar', 'Neb Tataouine', Kotti K9PG, Zeitoun Boubazzoula COI -Genotipo 33- y 'Zarrazi'). Las 29 variedades restantes se destinan sobre todo para la elaboración de aceite (Figura 11). Estas variedades difieren básicamente en el tamaño del fruto y las características organolépticas.

El análisis factorial de correspondencia permitió detectar una inercia de 16,38%, 12,14% y 10,7% respectivamente según los tres primeros ejes representando los factores según los cuales los individuos se agrupan (el porcentaje de la inercia es un indicador de la importancia de las tendencias de agrupación). A pesar de que los porcentajes

obtenidos son bajos, existe una tendencia lógica de que las variedades de mesa ('Fakhari Tataouine', 'Besbessi', 'Mallahi El Mouammar' y 'Tounsi Gafsa') se agrupen separadamente. Dichas variedades se reúnen entre 0,12 y 0,4 del eje de abscisas y 0,1 y 0,45 del eje de ordenadas (Figura 11). Para las variedades destinada a uso mixto no se ha detectado una agrupación clara (lo cual es lógico). Las variedades 'Neb Tatouine' y 'Zarrazi' tienden a agruparse con las variedades de Mesa mientras que la variedad 'Chemchali Gtar' se separa claramente del grupo. El resto de las variedades de uso mixto se agrupan entre -0,15 y -0,25 en el eje de abscisas y entre 0,1 y 0,35 en el eje de ordenadas. Las variedades destinadas a la elaboración de aceite no presentan una agrupación clara con respecto al conjunto de los genotipos de la colección pero están separados de las variedades destinadas para aceituna de mesa. Consecuentemente, se puede concluir que ha habido una selección a través del tiempo de genotipos distintos, unos dirigidos a la elaboración de aceite y otros orientados a la preparación de aceitunas de mesa.



**Figura 11.** Análisis Factorial de Correspondencia según el destino del fruto (mesa, mixto, aceite) de los 40 genotipos evaluados

Con objeto de determinar si existe algún tipo de correlación entre el análisis cladísticos generado sobre la base de los genotipos analizados y su procedencia geográfica, se ha realizado otro análisis factorial de correspondencia, que en este caso según el criterio de la procedencia.

Los 40 genotipos detectados en este trabajo proceden de 6 zonas geográficas distintas “Tataouine”, “Mednine”, “Gafsa”, “Sfax Sur”, “Sfax Norte” y “Tunis” del Sur al Norte del país respectivamente (Ver mapa Figura 2).

Siguiendo el criterio la procedencia geográfica de cada una de las variedades, el análisis factorial de correspondencia no permitió distinguir claramente ninguna



## **5. DISCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ENDOCARPOS**

Usualmente el conjunto de la semilla y del endocarpo se denomina hueso. Los rasgos del endocarpo tienen un gran poder discriminativo y están menos sujetos a las variaciones causadas por las condiciones ambientales que otros parámetros morfológicos estudiados usualmente (Barranco *et al.*, 2005). Puesto que todos los individuos estudiados pertenecen a la misma colección, se supone que todos están sujetos a las mismas condiciones edáficas y climáticas. Sin embargo, algunas variaciones en el terreno de la parcela pueden influenciar la expresión de los genotipos estudiados.

Una vez separados los endocarpos y completado el proceso de limpieza, éstos se describieron para al menos los 11 caracteres descritos por Barranco *et al.*, 2005, los cuales se han detallado en el apartado de metodología. Las figuras 13, 14 y 15 ilustran los endocarpos pertenecientes a los 31 duplicados detectados para la variedad ‘Chemlali Sfax’ (Figura 13), para el resto de las duplicaciones (Figura 14) y para los 29 genotipos únicos (Figura 15). Como se puede observar en las figuras 13 y 14, existe una gran similitud dentro de cada genotipo y las pequeñas diferencias observadas dentro de los genotipos fueron principalmente en el peso (tamaño) de los mismos, diferencias probablemente debidas al estado de los árboles de donde provienen las semillas. La edad, el estado nutricional y fitosanitario del árbol pueden ser el origen de dicha fluctuación.

La presencia de homonimias en la colección también se corroboró con la descripción morfológica de los endocarpos. En la denominación “Chemlali” existe una gran variabilidad morfológica, el endocarpo varía de simétrico (‘Chemlali Balhi’) a asimétrico (‘Chemlali Zarzis’), su forma varía de redondeada (‘Chemlali Ontha Tataouine’) a alargada (‘Chemlali Barrani’), su superficie varía de lisa (‘Chemlali Sfax’) a rugosa (‘Chemlali Chouamekh’) (Figura 13, 14 y 15).

Las diferencias entre los endocarpos de las homonimias Chahla y ‘Ech-Chahla’ están sobre todos a nivel de la simetría (simétrico y ligeramente asimétrico respectivamente) y de la superficie (lisa y rugosa respectivamente) (Figura 15).

También entre Autre Zarrazi y ‘Zarrazi’ existen diferencias a nivel del endocarpo. Para la variedad Autre Zarrazi, la forma es alargada y la superficie es lisa mientras que para ‘Zarrazi’ la forma es esférica y la superficie es rugosa.

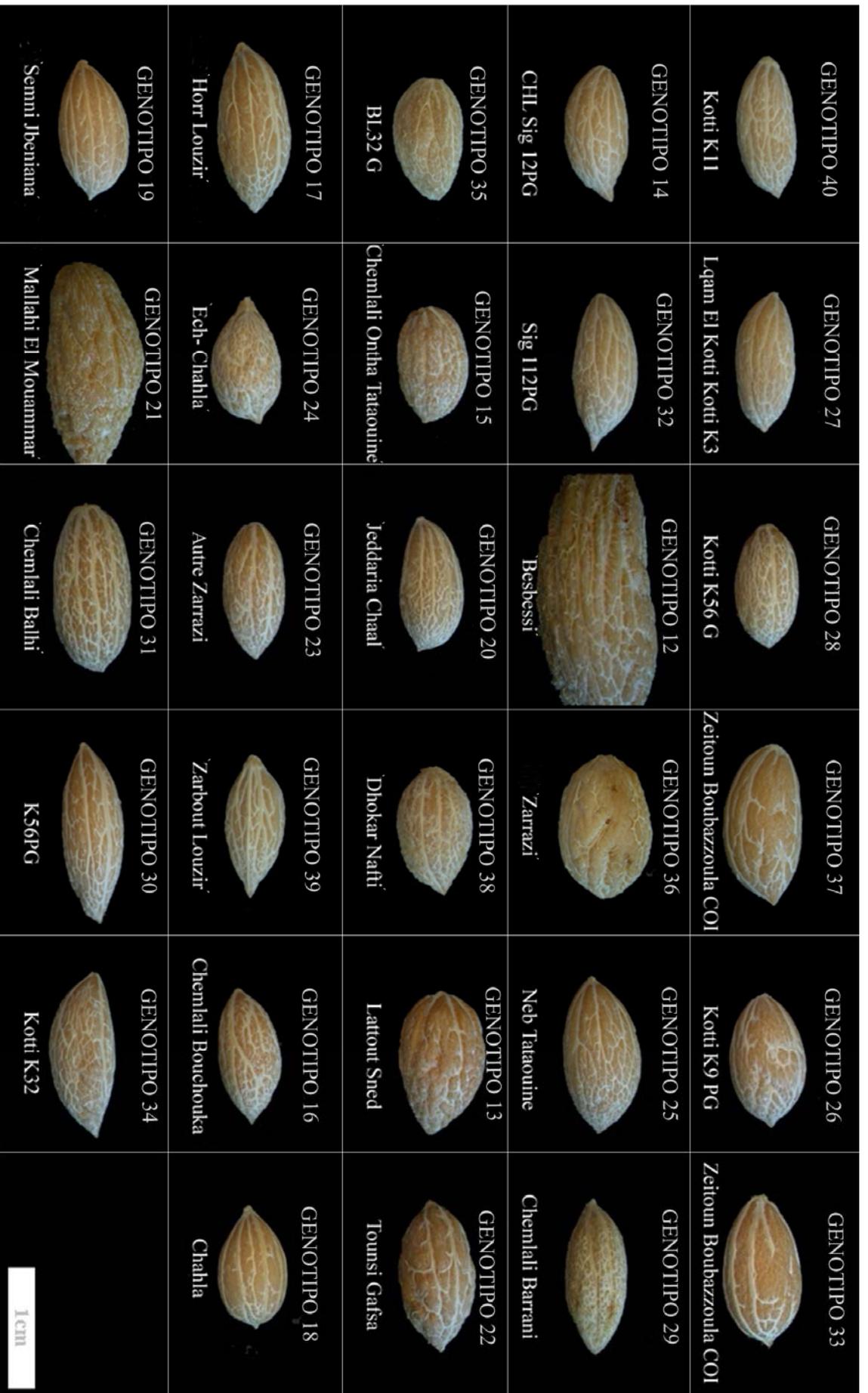
También entre los dos genotipos de la variedad 'Zeitoun Boubazzoula COI' analizados en este trabajo, existe una diferencia especialmente a nivel de la simetría ya que el genotipo 37 es ligeramente asimétrico y el genotipo 33 es simétrico.



**Figura 13.** Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos perteneciente a las 31 accesiones de la variedad 'Chemlali Sfax' definidas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de "Boughrara" de Sfax.



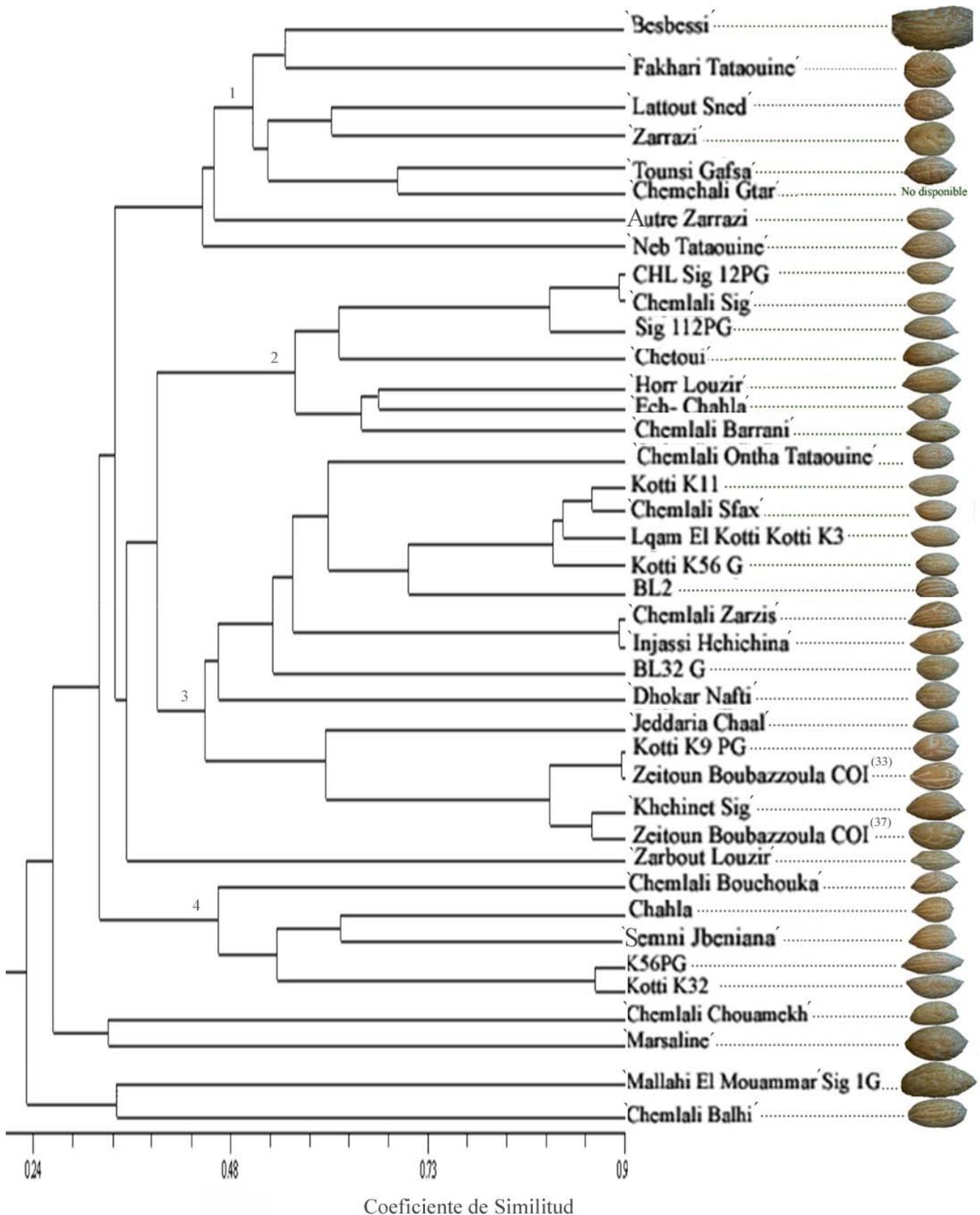
**Figura 14.** Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos perteneciente a las 24 accesiones correspondientes a las 10 variedades: ‘Fakhari Tataouine’, BL2, ‘Injassi Hehichina’, ‘Chemlali Chouamekh’, ‘Chétoui’, ‘Chemlali Zarzis’, ‘Khehinet Sig’, ‘Marsaline’, ‘Chemlali Sig’ y ‘Chemchali Gtar’ definidas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax.



**Figura 15.** Fotografía donde se ilustran las características morfológicas de los endocarpos de las 29 accesiones de las "Boughrara" de Sfax. Para cada una de ellas encuentran duplicadas en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de "Boughrara" de Sfax. Para cada una de ellas se indica el número del genotipo al que pertenece.

El estudio de las relaciones genéticas basado en los 8 SSRs evaluados fue confirmado morfológicamente. Efectivamente, las diferencias a nivel de los endocarpos son muy pequeñas entre los genotipos que comparten un número elevado de alelos especialmente en los casos donde se observó una ligera variación intracultivar. En la figura 16 se ilustra con una fotografía los endocarpos para cada uno de los genotipos clasificados molecularmente.

Como se puede observar en el dendrograma existe una mayor similitud en los endocarpos pertenecientes a los genotipos incluidos en el primer grupo que incluye a las variedades 'Besbessi', 'Fakhari Tataouine', 'Lattout Sned', 'Zarrazi', 'Tounsi Gafsa' y 'Chemchali Gtar' que con el resto. También son notables las diferencias de los endocarpos existentes en las variedades 'Chemlali Balhi', 'Mallahi El Mouammar', 'Marsaline' y 'Chemlali Chouamekh' con respecto al resto de los individuos como ha sido observado por el estudio molecular.



**Figura 16.** Fotografías de los endocarpos para cada uno de los genotipos de la colección del Coservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax clasificados molecularmente.





## **V. CONCLUSIONES**



- Todos los marcadores microsatélites utilizados en este trabajo presentaron un elevado grado de polimorfismo, con la excepción de *ssrOeUA-DCA15*. El número total de alelos diferentes definidos para los 8 loci fue de 64, con una media de 8 alelos/locus, lo que representa un valor muy superior al de estudios similares.
  
- Los valores obtenidos para los índices de variabilidad genética en los 8 marcadores microsatélites evaluados evidencian la utilidad y eficiencia de 7 de ellos para estudios de identificación varietal. Por el contrario, la elevada frecuencia de alelos nulos obtenida para el marcador *ssrOeUA-DCA15*, desaconseja su empleo en este tipo de estudios.
  
- La heterocigosidad estimada considerando únicamente un individuo por genotipo muestra valores elevados, lo que revela la presencia de una gran diversidad genética en el Germoplasma de Túnez incluido en la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de Sfax.
  
- El valor acumulativo de la Probabilidad de Identidad para los 8 microsatélites utilizados fue muy bajo, lo que confirma el gran poder discriminativo del conjunto de marcadores seleccionados en este estudio. Los marcadores más informativos fueron UDO99-43, GAPU101, *ssrOeUA-DCA16* y *ssrOeUA-DCA18* ya que permitieron discriminar el 82,5% del total de variedades, con una elevada Probabilidad de identidad acumulada.
  
- Los marcadores SSR utilizados han permitido discriminar un total de 40 genotipos distintos del conjunto de las 84 accesiones evaluadas.
  
- En las 44 accesiones no discriminadas y pertenecientes a 11 genotipos, se han definido numerosos casos de dúplicas, sinonimias y homonimias. El mayor número de casos se detectó para la variedad ‘Chemlali Sfax’ lo que se justifica por la elevada importancia y difusión de dicha variedad en Túnez. Los errores de duplicación pueden ser debidos a múltiples factores (metodología de identificación insuficiente, errores de plantación etc...). En este sentido, la incorporación de métodos moleculares (SSRs) al análisis de la colección de germoplasma del Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara” de

Sfax ha contribuido sin duda a una correcta catalogación del material existente y a un mejor manejo de la misma.

- El análisis de grupos corrobora la gran variabilidad genética existente en esta colección. Los coeficientes de similitud no superaron el valor de 0,7 en el 73% de las variedades. Las variedades más distintas genéticamente fueron ‘Zarbout Louzir’, ‘Chemlali Chouamekh’, ‘Marsaline’, ‘Mallahi El Mouammar’ y ‘Chemlali Balhi’, como consecuencia de la presencia de alelos únicos o de baja frecuencia, que reflejan posiblemente sus orígenes distintos.

- Las variedades destinadas a la elaboración de aceituna de mesa tienden a separarse genéticamente del resto de los individuos, posiblemente debido a que ha habido una selección de genotipos distintos para dicho uso.

- No se ha observado una agrupación de las variedades de acuerdo a las zonas de origen donde se cultivan, probablemente debido a la presencia de un elevado intercambio de material entre éstas.

- El análisis morfológico de los endocarpos ha permitido corroborar y completar los resultados y conclusiones obtenidos con el análisis molecular. Esto indica la necesidad de integrar ambas metodologías para la correcta catalogación del material cultivado de olivo.





## **VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Amane M, Lumaret R, Hany V, Ouazzani N, Debain C, Vivier G, Deguilloux MF. 1999. Chloroplast-ADN variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99. 133-139.
- Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet.* 98. 411–421
- Angiolillo A, Reale S, Pilla F, Baldoni L. 2006. Molecular analysis of olive cultivars in the Molise region of Italy. *Genetic Res Crop Evol.* 53. 289–295.
- Bandelj D, Jakse J, Javornik B. 2002. DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technology Biotechnology.* 40. 3. 185-190.
- Bandelj D, Jakse J, Javornik B. 2004. Assessment of genetic variability of olive variety by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica.* 136. 93-102.
- Barranco D, Rallo L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, España.
- Barranco D, Rallo L. 1985. Las variedades de olivo cultivadas en España. *Olivae.* 9. 16-22.
- Barranco D, Cimato A, Fiorino P, Rallo L, Touzani A, Castañeda C, Serafín F, Trujillo I. 2000. World catalogue of olive varieties. Internacional Olive Oil Council. Madrid. España. 360.
- Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L. 2004. El cultivo del olivo. 5ª edición. Junta de Andalucía. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. México.
- Barranco D, Trujillo I, Rallo L. 2005. Libro I. Elaiografía Hispánica. En: *Variedades de olivo en España*. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Bartolini, G, Prevost G, Messeri C. 1994. Olive tree germoplasm: descriptor lists of cultivated varieties in the world. *Acta Hort.* 365:116-118

Bartolini G, Prevost G, Messeri C, Gargnani G. 1998. Olive germoplasm: Cultivars and world-wide collections. FAO. Roma.

Belaj A, Trujillo I, de la Rosa R, Rallo L, Giménez MJ. 2001. Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc HortSci.* 126. 64–71

Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet* 107. 736–744.

Belaj A, Satovic Z, Rallo L, Trujillo I. 2004a. Optimal use of RAPD markers for varietal identification in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections. *J. Am. Soc. HortSci.* 129. 2. 226-270.

Belaj A, Trujillo I, Rallo L, Baldoni L. 2004b. Using of RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of the olive cultivars “Arbequina” and “Manzanilla” de Sevilla. *HortSci.* 39. 1566-1570.

Belaj A, Cipriani G, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. 2004c. Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat-markers. *HortSci.* 39. 7. 1557–1561.

Belaj A, Satovic Z, Trujillo I, Rallo L. 2004d. Genetic Relationships of Spanish Olive Cultivars Using RAPD Markers. *HortSci.* 39. 5. 948-951.

Besnard G, Bervillé A. 2000. Multiple origin of the Mediterranean olive deduced from mitochondrial ADN polymorphisms. *C R Acad Sci France. Sér III.* 323. 173–181

Besnard G, Baradat P, Bervillé A. 2001a. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet.* 102. 251–258

Besnard G, Batadat P, Chevalier D, Tagmount A, Bervillé A. 2001b. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genetic Resources and crop Evolution.* 48. 165-182.

Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Bervillé A. 2001c. Cultivar identification in olive based on RAPD markers . *J. Am. Soc. HortSci.* 126. 668–675.

Besnard G, Khadari B, Baradat P, Berville A. 2002. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast ADN polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 104. 1353–1361.

Bogani P, Cavalieri D, Petruccelli R, Polsinelli L, Roselli G. 1994. Identification of olive tree cultivars by using Random Amplified Polimorphic DNA. *Acta Horticulturae.* 365. 98-102.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331

Caballero JM, Del Río C. 1999. Seminario internacional sobre innovaciones científicas y sus aplicaciones en olivicultura y elaiotecnía. Consejo Oleícola Internacional. Florencia. Conservación de los recursos genéticos del olivo. 1-19.

Caballero JM, Del Río C. 2004. Métodos de multiplicación, 93-123. En: *El cultivo del olivo*, 5ª edición. Barranco Fernández-Escobar, Rallo, Eds. Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, 800pp.

Caballero JM, Del Río C, Tous J, Romero A, Plana J, Paz S, Illa F, Iñiguez A. 2005. Bancos de Germoplasma. En *Varietades de olivo en España* (Libro II: Variabilidad y Selección). Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Caballero J M., Del Rio C., Barranco D., Trujillo I. 2006. The Olive World Germplasm Bank of Córdoba, Spain. *Olea*. 25:14-19.

Cantini C, Cimato A, Sani G. 1999. Morphological evaluation of olive germoplasm present in Tuscany region. *Euphytica*. 109. 173-181.

Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104. 301–307.

Cimato A, Cantini C, Sani G, Marranci M. 1993. *Il Germoplasma dell'Olivo in Toscana*. Ed. Regione Toscana, Florence, Italy.

Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A, Testolin R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104. 223-228.

De Graaff J, Eppink L A A J. 1999. Olive oil production and soil conservation in southern Spain in relation to EU subsidy policies. *Land Use Policy*. 16. 259-267.

De la Rosa R, James C, Tobutt KR. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleacea. *Molecular Ecology Notes*. 2. 265-267.

De la Rosa R, James CM, Tobutt KR. 2004. Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortSci*. 39. 351–354.

DGPDIA. 2006. *Enquête des structures des exploitations agricoles*. Ministères de l'Agricultures et des ressources hydrauliques.

Diaz A, De la Rosa R, Martin A, Rallo P. 2006. Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genetics and Genomes*. 2. 165-175.

Fabbri A, Hormaza JI, Polito VS. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J Am Soc HortSci. 120. 538–542.

Ganino T, Beghé D, Valenti S, Nisi R, Fabbri A. 2007. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region. Genetic Resources and Crop Evolution. 54. 1531-1540.

Gargouri K, Sahnoun A, Ben Rouina B, Bentaher H, Ghrab M. 2005. Mapping of drought impact on olive growing in Tunisia. Interdraught-II the 2nd International Conference on Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production Under Drought Stress. Rome, Italie, 24-28.

Gemas VJ, Rijo-Johansen MJ, Tenreiro R, Feveireiro P, 2000. Inter-and Intra varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD techniques. J Hort Sci and Biotech. 75. 3. 312–319.

Grati Kamoun N, Khlif M, Ayadi M, Karray B. 2002. Clonal selection of olive tree variety “Chemlali de Sfax”: Preliminary results. Acta Hort. 586. 147–150.

Grati Kamoun N, Lamy Mahmoud F, Rebai A, Gargouri A, Panaud O, Saar A. 2006. Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 53. 265-275.

Hagidimitriou M, Katsiotis A, Menexes G, Pontikis, Loukas M. 2005. Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFPLs and RAPDs) markers and morphological traits. J. Am. Soc. Hort. Sci. 130. 211-217.

Hamada H, Petrini MG, Kakunaga T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. Proceegings of the National Academy of Sciences of USA. 79. 6465-6469.

Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6. 95-124.

Hannachi H, Msallem M, Ben Elhadj S, El Gazzah M. 2007. Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l'olivier (*Olea europaea* L.) en Tunisie. C. R. Biologies. 330.135–142.

Hess J, Kadereit JW, Vargas P. 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic ADNs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). Mol. Ecol. 9. 857–867.

Hormaza JI. 1996. Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales. ITEA. Vol 92 N°1. 5-15.

Jardak T. 2006. The olive industry in Tunisia. Special seminar: the olive industry in the Mediterranean countries. 35-46.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein S. 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature. 316. 76-79.

Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC. 2007. Olive Oil History, Production and By-product Management. Reviews in Environmental Science & Bio/Technology.

Karp A, Edwards KJ. 1997. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. pp11. IPGRI Workshop, 9-11 October 1995. Editado por Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR. IRGRI. Roma. Italia.

Khadari B, Breton C, Moutier N, Roger JP, Besnard G, Bervillé A, Dosba F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. Theor. Appl. Genet. 106. 521–529.

La Mantia M, Lain O, Caruso T, Testolin R. 2005. SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. J Horticult Sci Biotechnol. 80. 628-632.

Lavee, S.1994. ¿Por qué la necesidad de nuevas variedades de olivo? *Fruticultura*. 62. 29-38.

Liu Z, Furnier GR. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor Appl Genet*. 87. 97-105.

Loukas M, Krimbas CB. 1983. History of Olive cultivars based on their genetic distances. *Journal of Horticultural Science*. 58. 121–127.

Lumaret R, Amane M, Ouazzani N, Baldoni L. 2000. Chloroplast ADN variation in the cultivated wild olive taxa of the genus *Olea* L. *Theor Appl Genet*. 101. 547–553.

Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7. 639-655.

Mehri H, M'sallem M, Kamoun-Mehri R. 1997. Identification des principaux cultivars d'olivier cultivés en Tunisie. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 112. 68-72.

Mekuria GT, Collins GG, Sedgley M. 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J Hort Sci Biotechnol*. 74:309–314.

Montemurro C, Simeone R, Pasqualone A, Ferrara E, Blanco A. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 80. 105–110.

Murry MG, Tompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 8. 4321-4325.

Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.

Noormohammadi Z, Hosseini-Mazinani M, Trujillo I, Rallo L, Belaj A, Sadeghizadeh M. 2007. Identification and characterization of main iranian olive cultivars using microsatellites markers. HortScience. 42(7). 1545-1550.

Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Di Giusto F. 1993. Leaf allozyme variation in cultivated and wild Olive trees (*Olea europaea* L.). Journal of Heredity. 84. 34–42.

Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P. 1995. Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'Olivier (*Olea europaea* L.). Agronomie. 15. 31–37.

Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P. 1996. Genetic variation in the Olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. Euphytica. 91. 9–20.

Paran I, Michelmores RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistente genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85. 985-993.

Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. 1995. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology. 4. 249-252.

Perrier X, Flori A, Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann J C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier.pp 43 - 76.

Pontikis CA , Loukas M, Kousounis G. 1980. The use of biochemical markers to distinguish Olive cultivars. Journal of Horticultural Science. 55. 333–343.

Rafalski JA, Tingey SV. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Trends Genet. 9. 275–280.

Rallo P, Dorado G, Martín A. 2000. Development of simple sequence repeats in olive tree (*Olea europaea* L.). Theor. Appl. Genet. 101.984-989.

Rallo P, Tenzer I, Gessler C, Baldón L, Dorado G, Martín A. 2003. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor Appl Genet.* 107. 940-946.

Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Editores). 2005. *Varietades de olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Rohlf FJ. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Exeter Software, Setauket, NY.

Rotondi A, Magli M, Ricciolini C, Baldoni L. 2003. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica* 132. 129–137.

Sanz-Cortés F, Badenes ML, Paz S, Iñiguez A and Llácer G. 2001. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126.1. 7-12.

Sanz-Cortés F, Parfitt DE, Remero C, Struss D, Llácer G, Badenes ML. 2003. Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Plant Breeding.* 122. 173–177.

Sarri V, Baldoni L, Porceddu A, Cultrera NGM, Contento A, Frediani M, Belaj A, Trujillo I, Cionini PG. 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome.* 49. 1606-1615.

Sefc KM, Lopes MS, Mendonça D, Dos Santos M.Rodrigues, Laimer Da Câmara Machado M, Da Câmara Machado A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea L.*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular.Ecology.* 9.1171-1193.

Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco, CA. WH Friedman and Co. MathSciNet. 573.

Soltis DE, Soltis PS. 1989. Isozymes in plant Biology. En: Soltis DE, Soltis PS (eds). Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Summers K, Amos W. 1997. Behavioral, ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. Behavioral Ecology. 8. 260-267.

Tous J, Romero A. 1993. Variedades del olivo. Fundación “La Caixa”, Barcelona, España.

Trigui A. 1990. L’olivier en Tunisie: histoire et rôle civilisationnel et économique. (En arabe). Encyclopedie de la Tunisie. Ed. Fondation Nationale “Beit El Hikmah”, Premier cahier. 102-111.

Trigui A, Msallem M. 1995. Pollinisation croisée des variétés tunisienne d’olivier Chemleli de Sfax et Meski. Résultats préliminaires. Olivae. 57. 12-15.

Trigui A. 1996. L’amélioration quantitative y qualitative de la production oléicole en Tunisie : l’incontournable nécessité et les perspective de l’identification et de l’amélioration génétique de l’olivier. Olivae. Spécial Tunisie. 61. 34-40.

Trigui A, Msallem M, Yengui A, Belguith H, Khecherem J, Meliène A, Malek S, Bousselmi A, Samet A, Trabelsi EB. 2002 Oliviers de Tunisie, vol. 1. Ministère de l’Agriculture IRESA, Institut de l’Olivier, République Tunisienne.

Trigui A, Yengui A, Belguith H. 2006. Olive germplasm in Tunisia. Olea. 25. 19-23.

Trujillo I, L. Rallo L, Carbonell EA, Asins MJ. 1990. Isoenzymatic variability of olive cultivars according to their origin. Acta Horticulturae. 286. 137-140.

Trujillo I, Rallo L, Arus P. 1995. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120. 318-324.

Trujillo I, Barranco D. 1999. Identificación Varietal en Olivo. Consejo Oleícola Internacional. Seminario Internacional sobre innovaciones científicas y su aplicación en la olivicultura y la elaiotecnia. Florencia 1999. 1-10.

Trujillo I, Morales A, Belaj A, Valpuesta V, Botella MA, Rallo P, Martín A, Dorado G. 2005. Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. En *Variedades de olivo en España* (Libro III: Mejora y Biotecnología). Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Trujillo I, Ojeda MA, Baldoni L, Belaj A. 2006. Olive cultivar identification by means of microsatellites (SSR). *Olea*. 25. 24-26.

Valière N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol Ecol Notes*. 2. 377–379

Waits LP, Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*. 10. 249-256.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18. 6531–6535.

Xu H, Bakalinsky AT. 1996. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *HortScience*. 31. 267-268.

Zohary D. 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Hort*. 365. 62-65.

COI, 2007: Consejo Oleícola Internacional: <http://www.internationaloliveoil.org/>

FAO, 2006: Food and Agriculture Organization: <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv/>

INS, 2007: Institut National de la Statistique (Tunisie): <http://www.ins>

