

Identificación genética de la variedad de olivo (*Olea europaea* L.) Sevillana y su relación con variedades productivas existentes en la provincia del Huasco

*Genetic identification of Sevillana olive tree (*Olea europaea* L.) and their
relationship with olive productive varieties in the province of Huasco*

Roberto Contreras¹ y Francisco Tapia²

RESUMEN

El propósito del estudio fue caracterizar mediante marcadores ISSR algunas variedades españolas de olivo comercializadas en Chile, entre ellas una variedad de importancia económica regional en Atacama, la variedad Sevillana (Azapa). Se evaluó un protocolo de CTAB que fue modificado y adecuado para la extracción de ADN en drupas y hojas de olivos, sin la utilización de nitrógeno líquido. Se testearon 15 cebadores ISSR en siete variedades de olivo pertenecientes al Banco de Germoplasma de Olivos del INIA (Huasco-Chile) con los cuales se obtuvieron 153 bandas reproducibles y 130 bandas polimórficas (87%). A partir de 9 cebadores ISSR se pueden distinguir los siete cultivares en estudio. Con los cebadores UBC807, UBC814 y UBC850 se detectaron tres bandas exclusivas en la variedad Sevillana. Los análisis de relación filogenética realizados, evidencian que existe una mayor cercanía entre las variedades locales Sevillana y Picuda que con la variedad Gordal Sevillana, de origen española. En este estudio se utiliza un método de identificación molecular mediante marcadores ISSR con la finalidad de discriminar Sevillana de otras variedades de olivos de mesa comercializadas en el país.

Palabras clave: olivo, ADN, marcador molecular ISSR, Sevillana, Azapa.

ABSTRACT

*The purpose of this study was characterized by ISSR markers some Spanish olive cultivars marketed in Chile, among them a Chilean cultivar of economic importance named Sevillana (Azapa). A modified and suitable CTAB protocol for DNA extraction for drupes and leaves tissue, without the use of liquid nitrogen was evaluated. Seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars from INIA Germplasm Bank, located in Atacama Region, were screened using inter-simple sequence repeats (ISSRs) markers. Fifteen selected ISSR primers that produced 153 reproducible amplification bands and 130 polymorphic bands (87%) were evaluated. The combinations of nine ISSR primers were able to distinguish all cultivars in study. With UBC807, UBC814 and UBC850 primers we detect three exclusive bands in Sevillana cultivar. Phylogenetic analysis relationship shows that there is a greater closeness between Sevillana and Picuda local cultivars instead the spanish origin Gordal Sevillana. In this study, a molecular identification method is proposed in order to discriminate Sevillana of other table olive cultivars that are marketed in the country.*

Key words: olive, DNA, ISSR molecular marker, Sevillana, Azapa.

Introducción

El olivo (*Olea europaea* L.) es una de las especies frutales más antiguas cultivadas en la cuenca del Mediterráneo. Su introducción en Chile desde mediados del siglo XVI ha tenido gran relevancia en la producción frutícola del norte del país. Los primeros olivos introducidos en Chile llegaron desde Sevilla

vía Lima (Perú) con los colonizadores españoles, estableciéndose inicialmente en el valle de Azapa, para difundirse luego hacia el sur, en el valle del Huasco (región de Atacama). El establecimiento y posterior multiplicación por semillas dio como resultado la aparición de variedades híbridas autóctonas (Tapia, 2014). De estas variedades locales, la más apreciada en el norte de Chile es la variedad denominada Sevillana,

¹ Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama, CRIDESAT, Universidad de Atacama, Copayapu 485, Copiapó, Chile.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, Colina San Joaquín s/n, Apartado Postal 36 B, La Serena, Chile.

* Autor por correspondencia: roberto.contreras@uda.cl.

conocida también como Azapa en el norte de Chile, caracterizada por su gran tamaño, consistencia en el sabor, comportamiento estable en la industrialización (Tapia y Arancibia, 2001) y con apropiada producción en sistemas agrícolas intensivos en zonas desérticas y semidesérticas (Mora *et al.*, 2008).

La industria de aceituna de mesa en el país, tanto para la producción primaria y procesamiento, se desarrolla principalmente entre las regiones de Arica y Parinacota hasta Atacama; sin embargo, la mayoría de las empresas elaboradoras de aceituna de mesa están en la Región Metropolitana (Tapia, 2014; Schwartz *et al.*, 2016). Por otro lado, en relación a ODEPA, con base a catastros frutícolas, la superficie de olivos en el país creció a 18.307 hectáreas en 2013, estimándose que 5 mil hectáreas se destinaron a la producción de aceituna de mesa y alrededor de 13 mil hectáreas a la producción de aceite, concentrándose la producción de aceite en las regiones de O'Higgins, Maule y Coquimbo.

La identificación de la variedad de olivo es un tema de gran importancia económica, especialmente cuando el cultivo se está expandiendo y existe un creciente interés comercial por productos de calidad (Busconi, 2006). Las aceitunas de mesa elaboradas en España, EE.UU. y Argentina son de alto costo, sobre todo rellenas o deshuesadas. La producción chilena se basa en la variedad Sevillana, cuya zona de producción se sitúa en el norte del país, proporcionando la materia prima para la elaboración de aceitunas de mesa. Diversas empresas situadas en zonas diferentes a la de producción industrializan y comercializan aceitunas de mesa, siendo uno de sus productos más destacados etiquetados como Aceituna de Azapa. El abastecimiento de materia prima de estas empresas proviene además de las producidas en el norte de Chile, de importaciones de Perú y Argentina, existiendo heterogeneidad en la calidad del producto (tamaño, sabor, consistencia), pues no todas ellas corresponderían a una sola variedad (Tapia, 2014).

Tradicionalmente para distinguir entre diferentes especies y cultivos los descriptores morfológicos son los más usados; sin embargo, estos descriptores tienen la desventaja de estar influenciados por el ambiente, por interacciones epistáticas y por efectos pleiotrópicos, entre otros (Ye *et al.*, 2008; Busconi, 2006). La aplicación de la Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR, Polymerase Chain Reaction, Mullis y Faloona, 1987) y el desarrollo de la huella dactilar genética ha dado la posibilidad de identificar

de manera precisa un cultivar o un clon específico (Busconi, 2006).

Los ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) son productos de PCR obtenidos usando un único cebador compuesto por repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Los fragmentos amplificados proceden de regiones del genoma situadas entre dos microsatélites sucesivos orientados inversamente. Suelen ser marcadores dialélicos, el polimorfismo que detectan suele deberse a la presencia o ausencia de producto de amplificación y su herencia es habitualmente dominante. Estos han sido utilizados para la detección de variabilidad genética en patata (Prevost y Wilkinson, 1999), arándano (Carvalho *et al.*, 2014) y olivo (Pasqualone *et al.*, 2001; Linos *et al.*, 2014).

Hasta la fecha no existe ningún estudio de análisis molecular que incluya la variedad de olivo Sevillana (Azapa). En este trabajo se pretende hacer una aproximación de parentesco entre esta variedad con variedades auténticas españolas, que son cultivadas en la zona norte de Chile, todo ello a partir de marcador ISSR.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Durante los meses de diciembre de 2015 y enero de 2016 se obtuvieron frutos y hojas tiernas, provenientes de árboles de *Olea europaea* L. de cinco variedades de origen español: Arbequina, Empeltre, Picual, Gordal Sevillana y Manzanilla de Sevilla, y dos de origen local: Sevillana (Azapa) y Picuda, todos donadas por el Banco de Germoplasma del INIA ubicado en el Centro Experimental Huasco (−28°34'S, 70°47'W), comuna de Vallenar; además se colectó material vegetal de dos árboles centenarios de la variedad Sevillana presentes en una hacienda denominada "La Quijada" (−28°27'50"S, 71°11'10"W) ubicado en la comuna de Huasco. El material vegetal (hojas y drupas) fue colectado de tres árboles distintos por variedad.

Extracción de ADN

Los análisis moleculares fueron realizados en el laboratorio del CRIDESAT (Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama) de la Universidad de Atacama. La extracción de ADN

se realizó con modificaciones de acuerdo al método de CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1987). Antes de proceder a la preparación de las muestras se efectuó un pretratamiento de lavado de hojas y frutos frescos con agua y detergente para eliminar polvo y agentes contaminantes, luego se mantuvieron durante dos días a 4 °C. Para comenzar se pesó 2 gramos de mesocarpio de frutos (u hojas de brotes) de cada variedad y se dejaron a -80 °C en Ultra Freezer (Sanyo) durante 6 horas, específicamente en morteros (7 cm Ø; esterilizado) colocados un día antes. Luego, con guante protector antiácido, se retiró el mortero, pistilo y tejido del congelador y se procedió de manera inmediata a homogenizar presionando fuertemente el tejido hasta dejar un polvo fino. Se traspasó el homogenizado, con espátula de metal (esterilizada), a un tubo de microcentrifuga de 2 mL llenando hasta la mitad (dependiendo del tejido, el peso del homogenizado fue de 0,4 a 0,6 gramos), después se mezcló con 700 µL de CTAB precalentado a 65°C por 15 min (100 mM Tris-HCl pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB) y 2 µL de β-mercaptoetanol. Los tubos fueron agitados en vortex (Scilogex) durante 8 segundos a máxima velocidad y luego fueron incubados en baño térmico a 65 °C por 60 min, mezclando, de vez en vez, invirtiendo los tubos cada 20 min. Se agregó 700 µL de solución cloroformo:isoamílico (24:1) y se mezcló invirtiendo suavemente los tubos por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó (Centrifuga 5424, Eppendorf) a 13.000 g por 10 min y luego se recuperó la fase superior (500 µL aprox.), tratando de no perturbar la fase inferior del tubo y se trasvasó a un tubo nuevo. Al volumen recuperado se le añadió 5 µL de 10 mg/mL de RNAsa (Thermo Scientific) incubándose a 37 °C por 30 min. Se agregó 2/3 de isopropanol a -20 °C (por ejemplo para 500 µL de solución recuperada se agregó 333 µL de isopropanol) y se mezcló invirtiendo 30 veces los tubos suavemente a temperatura ambiente; posteriormente los tubos se colocaron en hielo durante 40 min. Se centrifugó a 13.000 g por 10 min y posteriormente se descartó todo el sobrenadante para quedarse solo con el pellet. En la etapa de lavado se agregó 700 µL de etanol 70% con 10 mM de NH₄OAc a -20 °C y se golpeó ligeramente el tubo hasta despegar el pellet del fondo, luego se centrifugó a 13.000 g por 2 min y nuevamente se descartó el sobrenadante quedándonos solo con el pellet. El procedimiento de lavado se repitió dos veces. Luego de los lavados, con la finalidad de secar el pellet, se dejó el tubo con la tapa abierta a

temperatura ambiente; es importante realizar un buen secado tratando de eliminar todo el etanol debido a que este puede interferir en la reacción de PCR. El pellet fue resuspendido en 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM EDTA) y se colocó a 4 °C por la noche para rehidratar mejor el pellet. El ADN resuspendido se conservó a -20 °C.

En total se realizaron 21 extracciones de ADN de variedades del Campo Experimental de INIA (Vallenar) y 2 extracciones de ADN de muestras colectadas en la hacienda “La Quijada” (Huasco). Se extrajo el ADN de tres individuos por variedad. Para evaluar la integridad del ADN se corrió por electroforesis 5 µL de extracción de ADN con 2,5 µL de buffer bromofenol en 1,2% de gel de agarosa (Cleaver Scientific), y para evaluar la cantidad de ADN se chequeó la intensidad en gel de agarosa usando una muestra de ADN con cantidad conocida la cual fue medida en espectrofotómetro.

Amplificación de ISSRs

Para la amplificación de ISSRs se seleccionaron 12 marcadores UBC (University of British Columbia) descritos por Martins-Lopes *et al.* (2007) que proporcionaban mayor número de bandas de PCR y mayor reproducibilidad en olivos, y por otro lado se utilizaron tres cebadores ISSR-1 (Saleh *et al.*, 2015), ISSR-2 (Jabbarzadeh *et al.*, 2010) e ISSR-3 (no descrito) sintetizados en Sigma-Aldrich (ver Tabla 1). La reacción de PCR de 24 µL consistió en: 12 µL Master Mix DreamTaq PCR 2X (Thermo

Tabla 1. Nombre de los cebadores ISSRs utilizados y su secuencia.

Nº	Cebador	Secuencia (5'-3')
1	ISSR-1	(GA) ₆ CC
2	ISSR-2	(GT) ₆ CC
3	UBC807	(AG) ₈ T
4	UBC810	(GA) ₈ T
5	UBC811	(GA) ₈ C
6	UBC814	(CT) ₈ A
7	UBC815	(CT) ₈ G
8	UBC817	(CA) ₈ A
9	UBC823	(TC) ₈ C
10	UBC825	(AC) ₈ T
11	UBC826	(AC) ₈ C
12	UBC834	(AG) ₈ YT
13	UBC850	(GT) ₈ TYT
14	ISSR-3	(GCAGA) ₃
15	UBC880	(GGAGA) ₃

Y = (C,T).

Scientific), 5 μ L de cebador ISSR (5 μ M) y 7 μ L de ADN genómico (4 ng/ μ L). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Swift Max Pro (ESCO) bajo las siguientes condiciones: un paso inicial 5 min a 94 °C, 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 seg a 52 °C y 2 min a 72 °C, seguido por un paso final de extensión de 6 min a 72 °C. Antes de comenzar el estudio se hicieron pruebas de los patrones generados por cada cebador ISSR, por duplicado, en muestras compuestas de tres individuos y muestras independientes, con el fin de observar su reproducibilidad y consistencia en cada variedad de olivo. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa a 1,2%, en TAE 1X durante 50 min a 100V y teñido con 4 μ L de Bromuro de Etidio (100 mg/mL). El gel fue puesto en un transiluminador UV (Vilber Lourmat) y fotografiado con una cámara digital (Canon, SX160 IS) para realizar posteriormente los análisis.

Análisis estadísticos

Los fragmentos de PCR fueron analizados como presencia (1) y ausencia (0) en bandas de igual tamaño evaluándose por duplicado cada una de las muestras colectadas. Solo se consideraron los fragmentos que tuvieran bandas reproducibles. Para cada cebador de ISSR se estimó el número total de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas, porcentaje de bandas polimórficas, número de genotipos diferentes, número de bandas exclusivas y el poder de resolución ($PR = \sum Ib$, donde $Ib = 1 - [2 \times (0,5 - p)]$, p = proporción de genotipos que contiene la banda; Prevost y Wilkinson (1999). El valor PIC para los ISSRs se calculó usando la siguiente formula: $PIC = 2 \times Pi \times (1 - Pi)$, donde Pi es la frecuencia de fragmentos amplificados (banda presente) y $1 - Pi$ es la frecuencia de los fragmentos no amplificados (banda ausente) (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). A partir de la matriz de presencia-ausencia de bandas se calculó el índice de similitud entre los distintos individuos con distintos coeficientes, SM (Simple Matching coefficient, Sokal y Michener, 1958); DICE (1945) y Jaccard (1908), utilizando el paquete estadístico NTSYSpc versión 2.01b. Los valores de índices de similitud entre líneas se emplearon para la construcción de un dendrograma, aplicando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average) y los valores de “bootstrap” se obtuvieron con el programa Winboot.

Resultados y Discusión

Actualmente existen muchos estudios moleculares de ADN en aceituna y aceite de oliva, desarrollados mayoritariamente por grupos de investigación de países de la cuenca del Mediterráneo. La variedad Sevillana al tener diferente origen a la zona mediterránea, no es considerada en estudios de filogenia ni de huella genética. Varios autores mencionan que esta variedad tiene origen en España; sin embargo, realmente no hay estudios de parentesco con variedades españolas. Una de las principales razones de comenzar este estudio fue la necesidad de diseñar un método para identificar (Fingerprinting) la Sevillana del resto de variedades presentes en el espectro productivo nacional.

La integridad en las extracciones de ADN fue aceptable en hojas y frutos, no observando fragmentación y mínima degradación. En cuanto a la cantidad de ADN extraído este fue similar en los dos tejidos, siendo mayor levemente la cantidad de ADN del mesocarpio de frutos que de hojas tiernas (Figura 1).

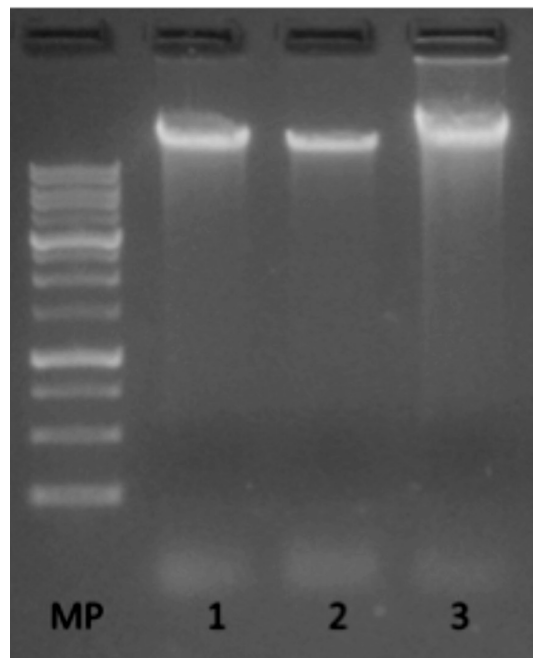


Figura 1. Evaluación de la integridad de ADN genómico por electroforesis en gel de agarosa a 1,2%. Muestras: drupa de Sevillana del Huasco (1), hoja de Sevillana del Huasco (2) y drupa de Manzanilla de Sevilla (3). MP: marcador de peso molecular de 1Kb.

Se obtuvieron amplificaciones reproducibles y consistentes con iguales patrones electroforéticos en la misma variedad en drupas y hojas. Por ejemplo, con el cebador ISSR-807 se observaron perfiles reproducibles tanto en hojas y frutos de la variedad Sevillana de tres árboles distintos, visualizando diferencias de perfil comparado con la variedad Manzanilla de Sevilla (Figura 2).

En la Tabla 2 se observa por cada cebador ISSR el número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentaje de bandas polimórficas (P%), número de genotipos (NG), poder de resolución (Pr), número de bandas exclusivas (NBE) y el contenido de información polimórfica (PIC). El número total de productos amplificados fue de 153, con un promedio de 10,2 bandas por primer. El cebador ISSR-1 produjo mayor número de bandas (15) y los cebadores UBC815-823-826-834-850 produjeron menor número de bandas (8). El tamaño de las bandas polimórficas varió de 200 a 3.000 pb que fueron evaluadas de 130 bandas polimórficas (87%). El cebador ISSR-1 mostró 15 bandas polimórficas mientras que el cebador UBC-834 mostró 5 bandas polimórficas. El poder de resolución de los 15 cebadores ISSR varió de 2,857 con el cebador UBC-850 hasta 8,285 con el cebador UBC-001. El valor PIC promedio obtenido con todos los cebadores ISSR fue de 0,324. El mayor valor PIC fue observado en los cebadores ISSR-1 (0,376), UBC826 (0,378) y ISSR-3 (0,377), y el menor valor PIC fue observado en el cebador UBC811

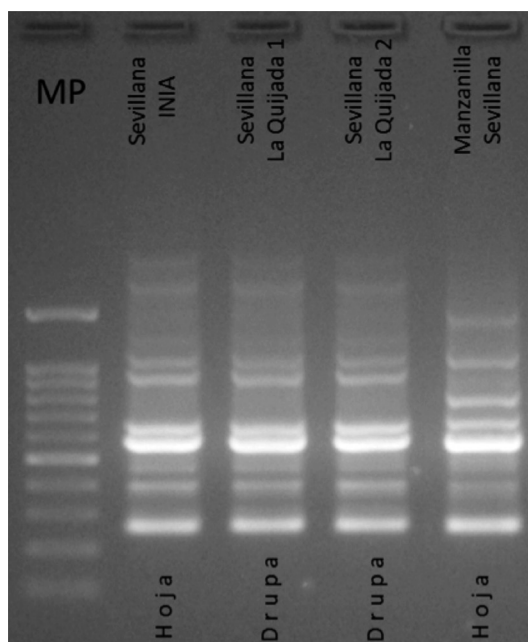


Figura 2. Perfil de amplificación de PCR con el cebador UBC-807 en dos variedades de olivos. Las muestras son: hoja de Sevillana del Huasco (Banco de Germoplasma INIA), drupa de Sevillana del Huasco (Hacienda “La Quijada”) individuo 1, drupa de Sevillana del Huasco (Hacienda “La Quijada”) individuo 2 y drupa de Manzanilla de Sevilla (Banco de Germoplasma INIA). MP: marcador de peso molecular de 100 bp.

(0,238). Según la Tabla 3, se detectó 17 fragmentos específicos de 130 fragmentos polimórficos y 22 fragmentos ausentes, estos son fragmentos perdidos

Tabla 2. Cebadores ISSRs utilizados para evaluar número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentaje de bandas polimórficas (P%), número de genotipos (NG), poder de resolución (Pr), número de bandas exclusivas y contenido de información polimórfica (PIC).

Nº	Cebador	NTB	NBP	P% (99%)	NG	Pr	NBE	PIC
1	ISSR-1	15	15	100	7	8,285	3	0,376
2	ISSR-2	10	10	100	7	5,428	3	0,306
3	UBC807	11	9	82	7	5,142	1	0,319
4	UBC810	9	9	100	7	5,714	0	0,334
5	UBC811	12	9	75	5	3,714	3	0,238
6	UBC814	10	9	90	7	5,142	1	0,351
7	UBC815	8	6	75	6	4,285	1	0,327
8	UBC817	10	9	90	7	5,428	0	0,359
9	UBC823	8	7	88	7	4,000	0	0,347
10	UBC825	10	8	80	7	4,285	2	0,294
11	UBC826	8	8	100	6	4,571	0	0,378
12	UBC834	8	5	63	6	2,857	1	0,245
13	UBC850	8	6	75	6	2,857	1	0,255
14	ISSR-3	13	12	92	6	7,714	1	0,377
15	UBC880	9	8	89	7	5,142	0	0,363
Total		153	130	—	—	—	17	—
promedio		10,2	—	87	6,5	4,971	—	0,324

Tabla 3. Combinación de diferentes marcadores ISSR usados para identificar siete variedades de olivo.

Variedad	Fragmento exclusivo	Fragmento ausente
Sevillana del Huasco	UBC807-2000; UBC814-1980; UBC850-650	
Picuda	UBC811-620; UBC817-380; ICCR3-780	UBC810-1380; UBC880-450
Manzanilla de Sevilla	UBC811-800; UBC811-340	UBC811-850; UBC811-720; UBC826-600; UBC826-380
Arbequina	ISSR2-2400; ISSR2-2000; UBC825-430	UBC814-1200; UBC826-550
Empeltre		UBC807-400; UBC817-580; UBC850-550
Picual	ISSR1-500; ISSR1-220; ISSR2-1450	ISSR2-1200; UBC823-1470; UBC850-2100
Gordal Sevillana	ISSR1-1100; UBC815-550; UBC825-610	ISSR1-2200; ISSR1-1400; UBC810-500; UBC825-700; UBC834-440; ICCR3-410; ISSR3-480; UBC880-1300
Total	17	22

en un individuo pero que están presentes en los demás individuos. Los 39 marcadores permiten distinguir las siete variedades estudiadas.

El análisis de relación filogenética de las siete variedades se presenta en la Figura 3. En él se puede observar una agrupación principal de seis variedades y un individuo fuera de grupo que corresponde a la variedad Gordal Sevillana, separados con un nivel de bootstrap bajo (27). El agrupamiento principal se separa en dos grupos que tiene también un nivel de bootstrap bajo (35). Luego se distinguen tres subgrupos, el primero (A) contiene las variedades Sevillana y Picuda con un valor de bootstrap relativamente aceptable (52); después un segundo subgrupo (B) en el cual se encuentra la variedad Arbequina y Empeltre y, finalmente, un tercer subgrupo (C) con la variedad Manzanilla de Sevilla y Picual con un alto valor de bootstrap (96). El bajo número de individuos analizados se apoya en la uniformidad de propagación existente en la zona estudiada, cuya metodología ha sido por multiplicación asexual de individuos de origen

conocido, lo que no interferiría la representatividad de los agrupamientos. Sin embargo, habría que hacer estudios más acuciosos de variabilidad intraespecífica en Sevillana.

La variedad Sevillana se puede identificar a partir de tres bandas exclusivas distinguiéndola del resto de las variedades en estudio. Como se puede observar en la Figura 4, se indican con flecha tres bandas exclusivas de la variedad Sevillana, con los marcadores UBC807, UBC814 y UBC850. Inclusive con el marcador UBC807 se pueden distinguir las siete variedades en estudio. Estas bandas exclusivas pueden ser convertidas en SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), para una mejor identificación de la especie.

Las técnicas de marcadores moleculares han sido exitosas en definir variedades propias de una región, utilizándose en diferentes zonas geográficas como en el norte de Italia (Rotondia *et al.*, 2011) y en Sicilia, lo que coincide con la metodología empleada en este estudio. Ello ha permitido definir cercanías varietales mediante la confección de dendrogramas genéticos (Salimontia, 2013; Raieta *et al.*, 2015).

Distinguir entre variedades para aclarar sinonimias y homonimias es de gran importancia para solucionar problemas de etiquetado incorrecto en viveros y, sobre todo productos comercializados, como el caso de la variedad Sevillana. El dendrograma presentado en la Figura 3, muestra a la variedad Gordal Sevillana muy lejana al resto de las variedades en estudio. Si bien el valor de bootstraps que los separa es bajo, la relación filogenética expuesta puede ser la esperada debido a que estos mismos agrupamientos se observa con SSR en un trabajo descrito por Trujillo *et al.* (2014) para las variedades

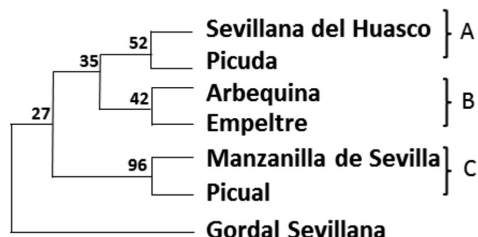


Figura 3. Dendrograma de ISSRs obtenido con el índice de Similitud SM y el método de agrupamiento UPGMA para 7 variedades de olivo obtenido mediante ISSRs. Se indican los valores bootstrap.

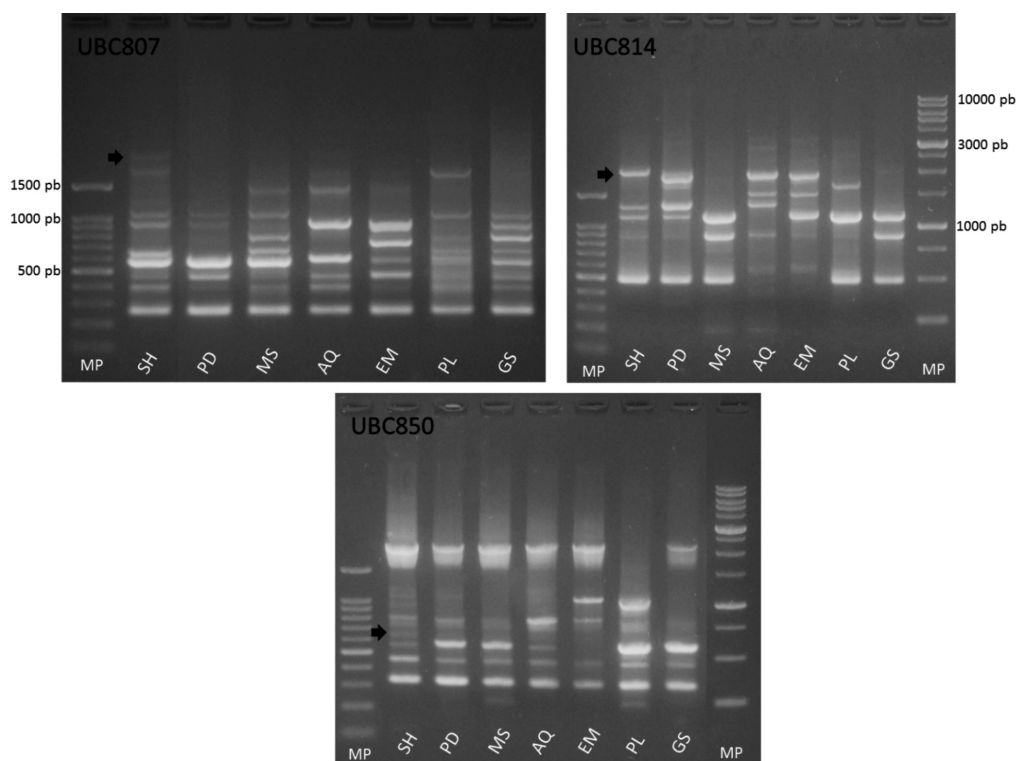


Figura 4. Geles de agarosa corridos por electroforesis horizontal y teñidos con bromuro de etidio, se observan los productos obtenidos con el marcador UBC807, UBC814 y UBC850 en siete variedades de olivo (SH=Sevillana del Huasco; PD=Picuda; MS=Manzanilla de Sevilla; AQ=Arbequina; EM=Empeltre; PL=Picual; GS=Gordal Sevillana). Se indica con flecha las bandas específicas de la variedad SH de alrededor de 2000 pb (UBC807), 1980 pb (UBC814) y 650 pb (UBC850). Se usó los marcadores de peso molecular de 100 pb y 1 kb.

españolas aquí estudiadas pero, excluyendo la variedad Sevillana la que no fue considerada. La variedad Sevillana fue llamada como tal por su semejanza con la variedad Gordal Sevillana que, según Kailis y Harris (2007), comúnmente se le llamaba “Sevillana”, lo mismo propone Fernández *et al.* (1997) que la “Sevillana” chilena proviene del cultivar español Gordal Sevillana; sin embargo, lo que se contradice a la luz de los resultados encontrados en la presente investigación, donde queda en evidencia que no hay correspondencia entre ambas variedades. Por el contrario, se encuentra mayor acercamiento filogenético de las variedades locales Sevillana y Picuda. El dendrograma muestra una gran cercanía entre las variedades Manzanilla de Sevilla y Picual, lo que se contrapone a lo presentado por Trujillo *et al.* (2014), donde se indica un distanciamiento entre ambas. Esto podría indicar que las variedades estudiadas en el Banco de Germoplasma de olivo de INIA, no serían las originales, lo que hace necesario hacer estudios de genuinidad varietal.

Conclusiones

La metodología utilizada de caracterización molecular es una herramienta precisa para definir identidad varietal en las variedades de olivo estudiadas. La variedad Sevillana puede ser definida como variedad auténtica, no existiendo relación directa con las variedades españolas en estudio; sin embargo, tiene un mayor acercamiento con la variedad local Picuda, la que puede significar que presentan el mismo origen. En conclusión, no se define la relación de parentesco entre las variedades estudiadas, siendo necesario para ello estudios de mayor detalle.

Agradecimientos

Se agradece la contribución de los profesionales del CRIDESAT, la donación de muestras vegetales procedentes del INIA y los aportes del proyecto DIUDA N° 22282 de la Universidad de Atacama.

Literatura Citada

- Busconi, M.; Sebastiana, L.; Fogher, C.
2006. Development of SCAR markers for germplasm characterization in olive tree (*Olea europaea* L.). *Molecular Breeding*, 17: 59-68.
- Carvalho, M.; Matos, M.; Carnide, V.
2014. Fingerprinting of *Vaccinium corymbosum* cultivars using DNA of fruits. *Hort Sci (Prague)*, 4: 175-184.
- Dice, L.R.
1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.
1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Fernández, A.G.; Adams, M.R.; Fernández-Diez, M.J.
1997. Table Olives: Production and processing. Chapman & Hall, 481 pp.
- Jabbarzadeh, Z.; Khosh-khui, M.; Salehi H. y Saberivand, A.
2010. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of rose species. *African Journal of Biotechnology*, 9 (37): 6091-6095.
- Jaccard, P.
1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 44: 223-270.
- Kailis, S.; Harris, D.
2007. Producing table olives. *Landlinks Press. CSIRO*, 322 pp.
- Linou, A.; Nikoloudakis, N.; Katsiotis, A.; Hagidimitriou, M.
2014. Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 175: 33-43.
- Martins-Lopes, P.; Lima-Brito, J.; Gomes, S.; Meirinhos, J.; Santos, L.; Guedes-Pinto, H.
2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Gen Res Crop Evolution*, 54: 117-128.
- Mora, F.; Tapia, F.; Ibacache, A.; Martins, E.N.; Scapim, C.A.
2008. Genetic evaluation of olive clones in the Atacama Desert, Chile. *Agrociencia*, 42: 777-786.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A.
1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol.*, 155: 335-350.
- Pasqualone, A.; Caponio, F.; Blanco, A.
2001. Inter-Simple Sequence Repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur Food Res Technol.*, 213: 240-243.
- Prevost, A.; Wilkinson, M.J.
1999. A new system of comparing PCR partidores applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Gen*, 98: 107-112.
- Raieta, K.; Muccillo, L.; Colantuoni, V.
2015. A novel reliable method of DNA extraction from olive oil suitable for molecular traceability. *Food Chemistry*, 172: 596-602.
- Roldán-Ruiz, I.; Dendauw, J.; Vanbockstaele, E.; Depicker, A.; De Loose, M.
2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp). *Mol Breed*, 6: 125-134.
- Rotondia, A.; Cultrerab, N.; Mariottib, R.; Baldonib, L.
2011. Genotyping and evaluation of local olive varieties of a climatically disfavoured region through molecular, morphological and oil quality parameters. *Scientia Horticulturae*, 130: 562-569.
- Saleh, O.; El Shony, A.; Fahmy, E.; Mansour, N. y Abdel-Tawab, F.
2015. Marker-assisted selection for yield and quality traits in some grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Egypt. J. Genet. Cytol.* 44: 165-188.
- Salimontia, A.; Simeone, V.; Cesaric, G.; Lamajb, F.; Cattivellid, L.; Perria, E.; Desideriod, F.; Fanizzie, P.; Del Cocof, L.; SZelasco, S.
2013. A first molecular investigation of monumental olive trees in Apulia región. *Scientia Horticulturae*, 162: 204-212.
- Schwartz, M.; Kern, W.; Marchant, R.
2016. Competitividad de Chile en el Mercado Internacional de Aceituna de Mesa. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/73/402/73402.pdf>. Consultado: 07/01/16.
- Sokal, R.R.; Michener, C.D.
1958. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin*, 38: 1409-1438.
- Tapia, B.
2014. Informe Técnico Aceituna de Mesa. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Santiago, Chile, 8 p.
- Tapia, F.; Arancibia, V.
2001. Preparación de Aceitunas. *INIA. Boletín Técnico N° 73*. ISSN 0717-4829, 32 pp.
- Trujillo, I.; Ojeda, M.; Urdiroz, N.; Potter, D.; Barranco, D.; Rallo, L.; Diez, C.
2014. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Cordoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10: 141-155.
- Ye, Y.M.; Zhang, J.W.; Ning, G.G.; Bao, M.Z.
2008. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 118: 1-7.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D.
1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat. (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.