

## Identificación y relaciones genéticas de variedades de olivo en España mediante el uso de marcadores EST-SNPs.

Francisco Jesús Gómez Gálvez<sup>1</sup>, Juan Cano Rodríguez<sup>2</sup>, Sergio Paz Compañ<sup>3</sup>, Javier Ugarte-Andreva<sup>4</sup>, Javier Alfonso García Rubio<sup>4</sup>, Isis Pinilla Aragón<sup>4</sup>, Antonia Ninot<sup>5</sup>, Raúl De la Rosa Navarro<sup>1</sup>, Angelina Belaj<sup>1</sup>

1 IFAPA, Centro Alameda del Obispo, Córdoba.

2 IFAPA, Centro Venta del Llano, Mengíbar, Jaén.

3 IVIA, Moncada, Valencia

4 Finca La Grajera, Logroño, La Rioja

5 IRTA, Mas de Bover, Constantí, Tarragona

**Autor para correspondencia:** [fran.gomez.galvez@gmail.com](mailto:fran.gomez.galvez@gmail.com)

**Palabras clave:** Caracterización genética · *Olea europaea* · EST-SNPs · Colección de variedades

### Resumen

En España existe una gran riqueza varietal de olivo (*Olea europaea* subsp. *europaea* var *europaea*) que ha sido ampliamente caracterizada y evaluada. Aun así, varios estudios recientes han evidenciado la presencia de variedades locales de olivo desconocidas, poniendo de manifiesto la necesidad de profundizar en trabajos de prospección, conservación y caracterización varietal. Por ello, en los últimos años, se están llevando a cabo trabajos de prospección en diferentes puntos del país (Andalucía, Aragón, Cataluña y La Rioja). Dichos trabajos han permitido la localización de 290 olivos cultivados de interés y recogida de material vegetal para su posterior identificación. Dicho material ha sido discriminado mediante un conjunto de 96 EST-SNPs recientemente desarrollado en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo del IFAPA (BGMO, Córdoba). El empleo de los marcadores EST-SNPs permitió la identificación de un total de 154 nuevas variedades en las cuatro regiones prospectadas y la detección de casos de sinonimias y homonimias. Además, los marcadores empleados pusieron en evidencia la presencia de una variabilidad relativamente amplia con unos rangos de heterocigosidad esperada y observada de 0,31-0,5 y 0,29-0,81, y valores medios de 0,46 y 0,53, respectivamente. El estudio de las relaciones genéticas entre las variedades prospectadas y el conjunto de variedades nacionales conservadas en el BGMO reveló una clara agrupación de variedades andaluzas y variedades del norte de España, indicando de esta manera una posible selección local de variedades de olivo en nuestro país. En concordancia con estudios anteriores en olivo, estos resultados ponen de manifiesto la eficiencia del conjunto de 96 EST-SNPs para la identificación varietal en olivo y su utilidad para mejorar el manejo de colecciones de recursos genéticos del cultivo.

### INTRODUCCIÓN

La olivicultura moderna tiende a una escasa diversificación varietal, lo que conduce a una erosión genética del cultivo: variedades más precoces, más productivas, y más adaptadas a la mecanización actual van desplazando a variedades antiguas y locales que pierden el beneplácito del agricultor en aras de la rentabilidad. Esta erosión genética pone en riesgo el legado de diversidad tejido a lo largo de generaciones de olivicultores, el valor añadido de

exclusividad que aportan las variedades locales en los productos del olivar, y, lo más importante, la existencia y el uso de una reserva estratégica potencialmente útil para la mejora genética y para afrontar futuros escenarios desfavorables (cambio climático, amenazas fitosanitarias, nuevas tecnologías, nuevas tendencias y demandas de mercado, etc.).

El Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BGMO, Córdoba) trata de hacer frente a esta problemática mediante la conservación de recursos genéticos del cultivo. España, como país líder en número de olivos cultivados, posee una importante diversidad genética. Hasta ahora dicha diversidad venía representada por un total de 272 variedades nacionales catalogadas, fruto de diferentes prospecciones regionales llevadas a cabo a finales del siglo XX (Barranco *et al.*, 2005). Sin embargo, varios estudios locales llevados a cabo con posterioridad en diferentes zonas del país ponen de manifiesto que aún podría haber bastante diversidad por recopilar, conservar y estudiar (Íñiguez *et al.*, 2001; Viñuales-Andreu, 2007; Diez *et al.*, 2011; Ninot *et al.*, 2018).

Una labor importante dentro de los bancos de germoplasma es la correcta identificación de las variedades (Atienza *et al.*, 2013; Trujillo *et al.*, 2014; El Bakkali *et al.*, 2019). En el BGMO se ha llevado a cabo una importante labor de identificación varietal en las últimas décadas, primero mediante el uso de descriptores morfológicos (Barranco *et al.* 2000; Belaj *et al.*, 2002; Atienza *et al.*, 2013; Trujillo *et al.*, 2014) y, posteriormente, mediante el uso de diferentes marcadores moleculares, principalmente microsatélites (Belaj *et al.*, 2012; Trujillo *et al.*, 2014). Recientemente se ha empezado a trabajar con marcadores de alto rendimiento, marcadores de secuencia expresada que marcan polimorfismo de un único nucleótido, los marcadores EST-SNP (Belaj *et al.*, 2018). Estos marcadores están ganando protagonismo en los últimos años por presentar mayor rapidez y resolución, por ser más simples, fáciles y económicos de analizar, y por tener una mayor reproducibilidad entre laboratorios.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la utilización de un conjunto de 96 marcadores EST-SNP para la identificación de variedades nacionales de olivo presentes en la colección, así como de variedades nacionales procedentes de trabajos de prospección, y para el estudio de su diversidad y relaciones genéticas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

El presente trabajo representa, hasta la fecha, el estudio más amplio de identificación de material cultivado de olivo en España. Se ha trabajado con hasta 570 accesiones o entradas. De ellas, 280 corresponden a accesiones introducidas y plantadas previamente en la colección, mientras que el resto (290) procede de diferentes colaboraciones y prospecciones llevadas a cabo en la última década, principalmente en Andalucía, la Rioja, Aragón, Cataluña y Valencia.

### **Métodos analíticos**

De todo el material vegetal incluido en el estudio se tomaron muestras de hojas sanas y se realizó una extracción de ADN siguiendo el método CTAB de De la Rosa *et al.*, 2002. La calidad y concentración de cada muestra de ADN fueron comprobadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 C UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El genotipado de las accesiones incluidas en el estudio se llevó a cabo en el Servicio General de Genómica, Unidad de Secuenciación y Genotipado, de la Universidad del País Vasco,

siguiendo la metodología de Fluidigm. Para ello se utilizaró un conjunto de 96 marcadores EST-SNPs seleccionados a partir de un estudio previo en el que ya se trabajó con multitud de este tipo de marcadores en la colección, y prestando especial atención a su capacidad de discriminación y precisión de amplificación (Belaj *et al.*, 2018).

Una vez obtenidos los perfiles alélicos EST-SNP de las muestras, se realizaron comparaciones pareadas para la identificación de variedades y se analizó de manera preliminar la diversidad y relaciones genéticas de las variedades diferentes. Para ello se trabajó con el software GeneAlex con el conjunto total de variedades nacionales y realizando también una agrupación por origen de la variedad, de manera similar a lo realizado en trabajos anteriores de identificación varietal en España (Belaj *et al.*, 2010; Díez *et al.*, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación dos a dos de los perfiles alélicos EST-SNP permitió discriminar de manera eficiente las variedades, revelando los marcadores utilizados un alto nivel de repetitividad y fiabilidad (Fig. 1). El 99,83% de las comparaciones arrojaron un número de entre 21 y 80 diferencias, reflejando una diferenciación intervarietal fiable. El 0,17% de comparaciones restantes arrojaron de 0 a 4 diferencias, representando los casos de un mismo perfil entre árboles diferentes de una misma accesión y/o diferentes accesiones de la misma variedad. Además, en consonancia con estudios anteriores en olivo (Biton *et al.*, 2015; Belaj *et al.*, 2018), se observó una clara diferenciación de los casos de posible variabilidad intravarietal (comparaciones que arrojaron de 1-4 diferencias alélicas), indicando la utilidad de estos marcadores para estudios de identificación varietal en olivo.

La identificación de las 570 accesiones incluidas en el estudio permitió la discriminación de 338 variedades distintas. Entre las variedades identificadas, 154 corresponden a variedades locales y desconocidas que se están incluyendo progresivamente en la colección, contribuyendo a un enriquecimiento significativo (+55%) de la colección de variedades nacionales del BGMO. Además, es destacable que, de estas 154 nuevas variedades, 41 provienen de los trabajos de prospección realizados en Andalucía, región ampliamente explorada históricamente, y que, sin embargo, aún sigue albergando diversidad por rescatar y conservar. Algunos ejemplos de nuevas variedades procedentes de diferentes municipios andaluces e incorporadas recientemente a la colección son la variedad ‘Vacía’, (Huelva), ‘Picuilla Morisca’ y ‘Nevadillo de la Axarquía’ (Málaga), ‘Ombligón’ (Cádiz) y la variedad ‘Alfredico’ (Granada).

El empleo de los 96 marcadores ET-SNP permitió además detectar de manera eficiente los casos de redundancias. Alrededor del 23% de las accesiones analizadas (132 570) fueron redundantes, correspondiendo a casos de sinonimias (la misma variedad entra bajo diferentes denominaciones), redundancias de prospección, y, en menor medida, a posibles errores de manejo del material vegetal. También se corroboraron y detectaron casos de homonimias entre las accesiones, es decir, material que entró con una misma denominación pero que constituyen variedades diferentes.

Los análisis preliminares de diversidad y relaciones genéticas pusieron de manifiesto la presencia de una variabilidad nacional relativamente amplia, algo ya observado en trabajos anteriores en olivo (Belaj *et al.*, 2004, 2010; 2018; Trujillo *et al.*, 2014). Los valores medios de heterocigosidad, considerando tanto el total de la muestra, como separando por regiones, estuvieron siempre en torno a 0,5, valor que representa el máximo de diversidad posible cuando trabajamos con marcadores bialélicos codominantes como son los marcadores EST-SNP. También es de destacar que el parámetro de contenido de información del

polimorfismo (PIC, por sus siglas en inglés) siempre estuviera por encima de 0,25, valor umbral a partir del cual se considera que el marcador es informativo de la diversidad (Tabla 1).

En cuanto a las relaciones genéticas de las variedades, el dendrograma y el análisis de coordenadas principales (Fig. 2) mostraron una clara separación de la mayoría de las variedades del sur de España con respecto al resto de variedades del norte y del levante del país. Esto está en concordancia con estudios anteriores de diversidad en los que se ha observado una agrupación similar y que apuntan a una posible selección local independiente en regiones del sur y del noreste de la península (Belaj *et al.*, 2010).

### Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto CRF20190004 y posible gracias a colaboradores, Oficinas Comarcales Agrarias, ayuntamientos, cooperativas, almazaras y amigos del olivo.

### Referencias

- Atienza, S. G., de la Rosa, R., Domínguez-García, M. C., Martín, A., Kilian, A., Belaj, A., 2013. Use of DArT markers as a means of better management of the diversity of olive cultivars. *Food Res. Int.* 54, 2045–2053. doi: 10.1016/j.foodres. 2013.08.015
- Bakkali, A. El, Essalouh, L., Tollon, C., Rivallan, R., Mournet, P., Moukhli, A., Zaher, H., Mekkaoui, A., Hadidou, A., Sikaoui, L., Khadari, B., 2019. Characterization of worldwide olive germplasm banks of Marrakech (Morocco) and Córdoba (Spain): Towards management and use of olive germplasm in breeding programs. *PLoS ONE*, 14(10), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223716>
- Barranco, D., Rallo, L., 2000. Olive cultivars in Spain. *Hort. Technology* 10:107–110
- Barranco, D., Caballero, J.M., Martín, A., Rallo, L., Del Río, C., Tous, J., Trujillo, I., 2005. Variedades de olivo en España. Mundiprensa, Madrid, Spain. 478 pp.
- Belaj A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I., 2002. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 105:638–644.
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I., 2004. Genetic relationships and partition of variability of Spanish olive cultivars by means of RAPD markers. *HortScience* 39, 948–951.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Satovic, Z., Barranco, D., 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae*, 124(3), 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.010>
- Belaj, A., Dominguez-Garcia, M.C., Atienza, S.G., Martin Urdiruz, N., De la Rosa, R., Satovic, Z., Martin, A., Kilian, A., Trujillo, I., Valpuesta, V., del Río, C., 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genet Genomes* 8: 365-378. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0447-6>
- Belaj, A., de la Rosa, R., Lorite, I. J., Mariotti, R., Cultrera, N. G. M., Beuzón, C. R., González-Plaza, J. J., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., Baldoni, L., 2018. Usefulness of a new large set of high-throughput est-snp markers as a tool for olive germplasm collection management. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01320>
- Biton, I., Doron-Faigenboim, A., Jamwal, M., Mani, Y., Eshed, R., Rosen, A., Sherman, A., Ophir, R., Lavee, S., Avidan, B., and Ben-Ari, G., 2015. Development of a large set of SNP markers for assessing phylogenetic relationships between the olive cultivars composing the Israeli olive germplasm collection. *Mol. Breed.* 35 (4), 107–120 <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0304-7>

De la Rosa, R., James, C., Tobutt, K.R., 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleacea*. Primer note. Mol. Ecol. Notes 2, 265–267.

Díez, C.M., Trujillo, I., Barrio, E., Belaj, A., Barranco, D., Rallo, L., 2011. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. Ann Bot 108:797–807

Iñiguez Monterde, A., Paz Compañ, S. and Illa Gomez, F.J., 2001. Variedades de olivo cultivadas en la Comunidad Valenciana. Serie Divulgacio Técnica. Generalitat Valenciana. Valencia.

Ninot, A., Howad, W., Aranzana, M. J., Senar, R., Romero, A., Mariotti, R., Baldoni, L., Belaj, A., 2018. Survey of over 4, 500 monumental olive trees preserved on-farm in the northeast Iberian Peninsula, their genotyping and characterization. Scientia Horticulturae, 231, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.025>

Viñuales-Andreu, J., 2007. Variedades de olivo del Somontano. Área de Desarrollo de la Diputación de Huesca; Instituto de Estudios Altoaragoneses, 162 pp.

Tabla 1 Diversidad genética de variedades españolas identificadas mediante el uso de marcadores EST-SNPs

	España	Norte	Levante	Sur	P-value
<i>n</i>	338	53	126	159	
<i>N<sub>a</sub></i>	2.00	2.00	2.00	2.00	
<i>H<sub>o</sub></i>	0.53	0.49 b	0.51 b	0.57 a	***
( <i>min-max</i> )	(0.29-0.81)	(0.04-0.87)	(0.27-0.68)	(0.10-0.91)	
<i>H<sub>e</sub></i>	0.46	0.41 b	0.45 a	0.45 a	***
( <i>min-max</i> )	(0.31-0.50)	(0.07-0.50)	(0.27-0.50)	(0.12-0.50)	
<i>PIC</i>	0.53	-	-	-	
( <i>min-max</i> )	(0.29-0.81)				

*n* — tamaño de muestra; *N<sub>a</sub>* — número medio de alelos; *H<sub>o</sub>* — Heterocigosidad observada; *H<sub>e</sub>* — Heterocigosidad esperada; Niveles de significancia del P-value: \* 0.05 < P < 0.01, \*\*\* P < 0.001. Letras diferentes en la misma fila indicant diferencias significativas entre valores a P < 0.05.

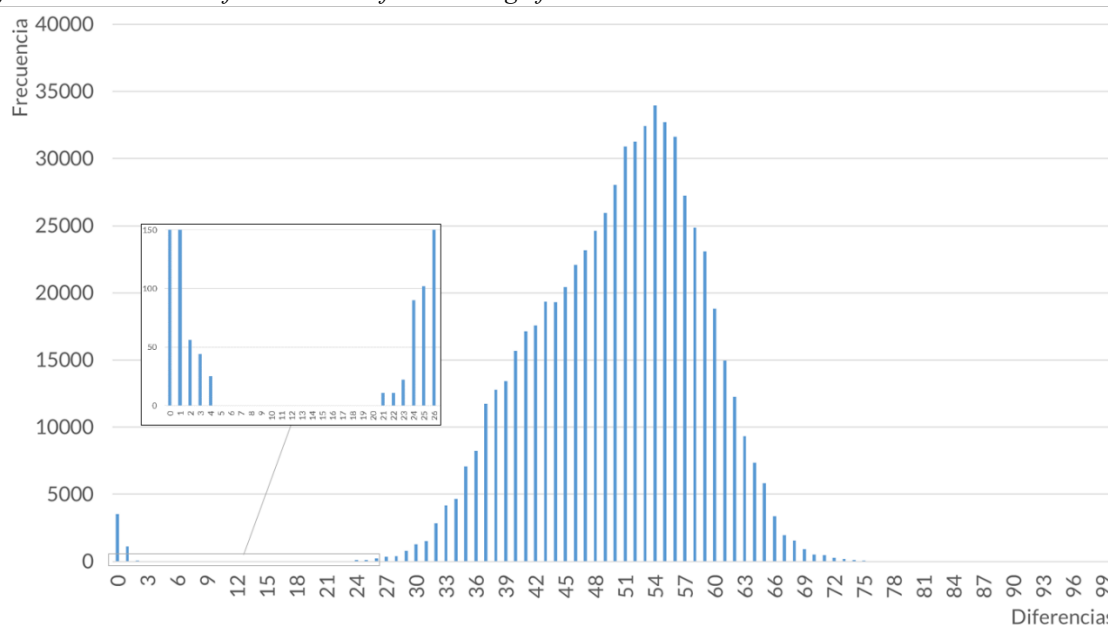


Fig. 1. Frecuencia del número de diferencias en las comparaciones pareadas de los perfiles alélicos EST-SNP.

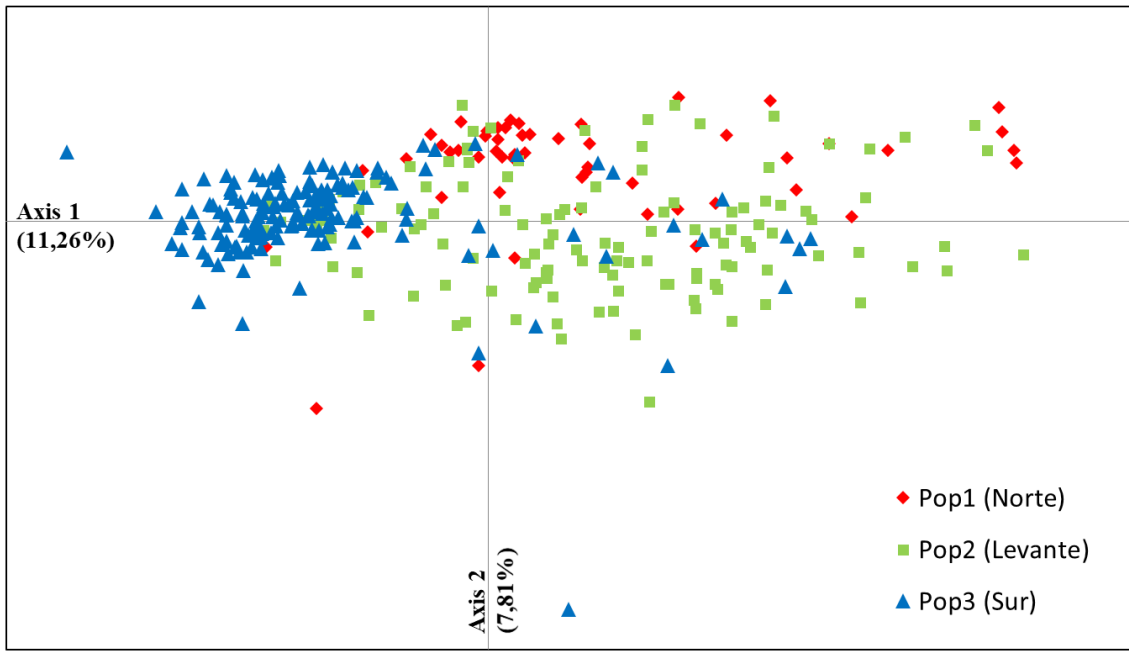


Fig. 2. Análisis de coordenadas principales vía distancias genéticas entre variedades identificadas mediante marcadores EST-SNPs.