

Diversidad intravarietal del cv. Manzanilla de olivo (*Olea europaea* L.) y genotipos selectos relacionados de la colección INTA Catamarca y huertos de Cruz del Eje, Córdoba (Argentina)

Costero, B., Teich, I., Taborda, R. J., Toro, A., Prenol, L. y Torres, L.

DOI: 10.31047/1668.298x.v38.n2.30288

RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L.) presenta un complejo panorama varietal aún no caracterizado e identificado totalmente. En este trabajo se estudió material con incertidumbre identitaria: se analizaron seis loci microsatélites de 13 accesiones relacionadas al cultivar Manzanilla de la colección del INTA Catamarca y de dos genotipos de huertos comerciales del departamento Cruz del Eje, Córdoba. Para confirmar la identidad de cultivares y la predominante base germoplásmica en genotipos de origen incierto, se compararon sus perfiles alélicos con los nueve cultivares referentes depositados en la colección del EEA INTA Junín (Mendoza), en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (Córdoba, España) y con información disponible en *OLEA databases*. Con la composición alélica obtenida se generó una matriz de distancia genética que permitió estimar parámetros de diversidad y realizar análisis multivariados de ordenación y agrupamiento. Los resultados permitieron conocer la base genética de genotipos nativos, constatándose un elevado nivel de heterocigocidad. Se confirmó la identidad de la accesión Carmona y de dos variantes alélicas (Imperial y 4So.CE). Se detectó una posible sinonimia entre las accesiones Israeli y Fina y una homonimia para el cv. Española. Estos resultados contribuyen a la valorización y uso eficiente de recursos genéticos del olivo.

Palabras clave: caracterización genética, microsatélites, homonimias, sinonimias, recursos genéticos

Costero, B., Teich, I., Taborda, R. J., Toro, A., Prenol, L. and Torres, L., 2021. Intravarietal diversity of Manzanilla Olive cultivar (*Olea europaea* L.) and related selected genotypes from the INTA Catamarca collection and orchards of Cruz del Eje, Córdoba (Argentina). *Agriscientia* 38 (2): 75-88

SUMMARY

The olive tree (*Olea europaea* L.) presents a complex of varieties that have not been fully characterized and identified yet. In this work, material with uncertain identity was analyzed: six loci SSRs (simple sequence repeats) of thirteen accessions related to the Manzanilla cultivar from the INTA Catamarca collection and of two commercial genotypes from orchards of Cruz del Eje, Córdoba. To confirm the identity of cultivars and the predominant genetic base of the selected genotypes, their allelic profiles were compared with nine cultivars from INTA Mendoza and from the BMGO (Córdoba, Spain) as well as with reference data from the *OLEA* databases. With the allelic frequency data obtained, a genetic distance matrix was generated, which made it possible to estimate diversity parameters and perform multivariate ordination and clustering analysis. The predominant genetic base of native genotypes was characterized and a high level of heterozygosity was found. In addition, the identity of the Carmona accession and of two allelic variants (Imperial and 4So. CE) was verified possible synonymy for cvs. Israeli and Fina, and homonymy for cv. Spanish accessions were detected. These results contribute to the valorization and efficient use of olive tree genetic resources.

Key words: genetic characterization, microsatellite markers, homonymy, synonymy, genetic resources

Costero, B. del P. (ORCID: 0000-0002-3722-4775) : Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Félix Marrone 746, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina. Cátedra de Genética, Laboratorio de Calidad Genética . Teich, I. (ORCID: 0000-0002-7305-2923): Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Avenida Armada Argentina 3555 (X5016DHK). Córdoba, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-CONICET. Camino 60 cuadras, Km 5 1/2, (X5020ICA) Córdoba, Argentina. Tabora, R. J. (ORCID: 0000-0001-8420-6054) y Torres, L. (ORCID: 0000-0002-9675-4100): Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Félix Marrone 746, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina. Toro, A. (ORCID: 0000-0003-3155-0227): Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. Ruta Nacional 14, Km 836 (3313), Cerro Azul, Misiones, Argentina. Prenol, L. (ORCID: 0000-0001-5631-5624): INTA Estación Experimental Agropecuaria San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca, Argentina. Correspondencia a: lautorresm@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) es una de las especies frutales perennes de clima templado más antigua, cuya domesticación comenzó en el Medio Oriente hace unos 6000 años. El comercio y las migraciones lo llevaron hacia el oeste a través de la Cuenca del Mediterráneo generando un extenso legado de cultivares, fruto de la selección empírica y multiplicación clonal de árboles superiores (Trujillo et al., 2014). Con la colonización española el olivo fue introducido en América mediante plantas procedentes de Sevilla, España, que llegaron

primero a las Antillas y en 1520 al continente, pasando luego de México a California. Alrededor del año 1550 ingresaron plantas procedentes de Sevilla a Perú y de allí a Chile desde donde se introdujeron los primeros ejemplares a la Argentina entre 1556 y 1558. Inicialmente estos materiales se ubicaron en Londres (Catamarca), Santiago del Estero y La Rioja encontrando en la región de Arauco de esta provincia, las mejores condiciones para su adaptación (Chiesa Molinari y Nicoletta, 1947). La riqueza del germoplasma de olivo a nivel mundial está representada por más de 1200 cultivares con más de 3000 sinónimos, además de variantes moleculares intracultivar (Cipriani et al.,

2002) y ecotipos aún no identificados (Muzzalupo et al., 2014). Parte de ese patrimonio se encuentra preservado en casi 100 colecciones distribuidas en 54 países, entre ellos Argentina (El Bakkali et al., 2019).

Varios eventos contribuyeron al origen de la diversidad genética intraespecífica, tales como las pequeñas variaciones alélicas probablemente generadas durante el proceso de propagación clonal masiva (El Bakkali et al., 2019). La acción antrópica de continua selección de genotipos de valor agronómico superior y su perpetuación mediante propagación asexual, generaron los primeros cultivares y materiales autóctonos de olivo (Cavagnaro et al., 2001).

Este acervo germoplásmico de la especie se vio enriquecido, además, por eventos naturales de mutación somaclonal, con o sin impacto, en la expresión fenotípica (Rallo, 1995; Trujillo et al., 2014), y por la aparición de genotipos nativos adaptados a las condiciones edafoclimáticas regionales que recibieron denominaciones locales. Éstos, si bien presentan un fenotipo similar al de variedades tradicionales bien definidas, poseen un comportamiento productivo diferente y estable a lo largo del tiempo (Pratavia, 1998; Diez et al., 2012). Este complejo panorama varietal, dificulta la caracterización e identificación indubitable de los cultivares y materiales nativos e impone para su clasificación un abordaje que considere aspectos tanto morfológicos como moleculares (Trujillo et al., 2014; Gago et al., 2019) para dilucidar además, los frecuentes casos de homonimia (mismo nombre varietal en genotipos diferentes) (Barranco et al., 2005) o sinonimia (diferentes nombres para genotipos idénticos) (Barranco, Trujillo y Rallo, 2000). El olivo es un ejemplo único dentro de la fruticultura debido a que su caracterización, identificación y discriminación entre variedades aún no ha sido totalmente esclarecida (Torkzaban et al., 2015). Esta incertidumbre identitaria y autenticidad varietal cobra particular relevancia en los bancos y colecciones de germoplasma que preservan *ex situ* el patrimonio genético de la especie.

En el olivo, para estudios de diversidad, análisis de su genoma, caracterización, identificación y relación genética de cultivares, se han empleado tanto marcadores de tipo morfológicos, como los descriptores propuestos para las variedades españolas por Barranco, Cimato, et al. (2000), como así también los bioquímicos basados en el análisis de las isoenzimas (Trujillo y Rallo, 1995; Corpas et al., 2006) y los moleculares a nivel del ADN. Entre las numerosas técnicas de análisis del ADN, los microsatélites (SSR por su nombre en

inglés, *simple sequence repeats*) de naturaleza codominante y altamente reproducibles, son los más utilizados permitiendo la resolución de los frecuentes problemas de denominación varietal incierta en el olivo cultivado (Rallo et al., 2000; Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Doveri et al., 2008; Baldoni et al., 2009; M. R. Torres et al., 2014; El Bakkali et al., 2019). M. R. Torres et al. (2014) mediante 4 microsatélites de la serie DCA lograron la caracterización de 21 genotipos de 11 cultivares difundidos en la provincia de Mendoza, Argentina y comprobaron el alto poder discriminatorio de éstos. La capacidad discriminatoria de solo 5 marcadores moleculares SSR pertenecientes a la serie IAS Oli ha sido previamente comprobada en un grupo de 46 cultivares de olivo (Rallo et al., 2000; Rallo et al., 2002) y los mismos permitieron corroborar que Oblonga y Frantoio son, probablemente, el mismo cultivar tal lo propuesto por Barranco, Trujillo y Rallo (2000). En el mismo sentido, do Val et al. (2012) caracterizaron 60 accesiones de olivo y dilucidaron casos de sinonimia en Brasil mediante el análisis con seis microsatélites de las series GAPU y UDO.

En Europa, a partir del año 2007, se dispone de una base de datos moleculares para el olivo (OLEA databases) generada con doce microsatélites de las series DCA (Sefc et al. 2000), GAPU (Carriero et al., 2002) y UDO (Cipriani et al., 2002) en la cual se puede consultar el perfil de un cultivar específico o indagar sobre la identidad de un cultivar cuando se dispone de su perfil (<http://www.oleadb.it>).

El análisis de marcadores moleculares junto al de caracteres morfológicos estructurados a partir de los descriptores cuantitativos y cualitativos del árbol, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpo, han sido de gran utilidad para catalogar los cultivares de olivo depositados en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO), sito en Córdoba, España y para la descripción y caracterización de genotipos nativos con denominación incierta o desconocida y de larga persistencia en el tiempo en las principales regiones olivícolas (Barranco et al., 2005; Gago et al., 2019).

El cultivar Manzanilla, originario de las regiones de Sevilla y Badajoz (España), está ampliamente distribuido, principalmente por su producción de aceituna de mesa (Barranco y Rallo, 2000). Representa un caso de interés respecto a la denominación varietal dado que para éste cultivar, Barranco et al. (2005) reportaron 16 homonimias y Gómez-Escalonilla Sanchez-Herederó y Vidal Hernandez (2006) citan Manzanilla de Sevilla, Villalonga, Verdial de Badajoz, Manzanilla Común, Manzanilla de Carmona, Manzanilla de Dos Hermanas, Manzanillo Fino, Manzanilla Prieta,

Manzanilla Basta, Manzanilla Serrana, Manzanillo Cordobí, Manzanillo Real, como las principales sinonimias según características de inflorescencia, porte del árbol, hojas, fruto y endocarpo.

En Argentina, Trentacoste y Puertas (2011) definieron 12 grupos para las 61 accesiones de olivo implantadas en la Colección de Variedades de Olivo de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA) de Junín, en la provincia de Mendoza (región oeste de Argentina), según características morfológicas y agronómicas y por comparación con otras colecciones y bases de datos existentes. Dentro del complejo panorama varietal del germoplasma de Manzanillas, el cv. Española quedó incluido en el grupo IX; en tanto que en el grupo XII, un subgrupo relacionó a Carmona y Dos Hermanas y el otro subgrupo, vinculó a los cultivares Imperial y Aceitera. La accesión registrada como Sevillana Fina, fue propuesta como perteneciente al cv Picual. Previamente, Cavagnaro y Masuelli (2002) citaron al menos seis genotipos de diferentes Manzanillas reales y algunas otras mejoradas.

La Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA) de la localidad de Sumalao, provincia de Catamarca (28° 33' 07,7" S, 65° 43' 40,3" O), en la región noroeste de Argentina (NOA), posee una colección de olivos que preserva entre otros materiales, clones derivados de plantas de identidad varietal reconocida pertenecientes al Banco de Germoplasma de la EEA-INTA Junín y genotipos autóctonos con aptitud agroecológica superior respecto a algunos caracteres tales como precocidad, vecería y tamaño de frutos, pero de origen genético incierto.

En Argentina es escasa o nula la información disponible sobre la caracterización e identificación molecular de materiales tradicionales, así como las características genéticas de los genotipos nativos con relación al germoplasma de cultivares tradicionales originarios de las principales regiones productoras de la cuenca del Mediterráneo. Contar con dicha información facilitaría la preservación y manejo eficiente del germoplasma local de olivo en programas de mejoramiento, además de dar respuesta al requerimiento de productores y viveristas respecto de la certidumbre identitaria y autenticidad varietal de los materiales que comercializan (García et al., 2008; Trentacoste y Puertas, 2011; El Bakkali et al., 2019). La identificación sistemática e inequívoca referida a la identidad de las plantas, representa un paso clave para la evaluación, caracterización y explotación del germoplasma local de olivo y para la gestión

eficiente del patrimonio genético en programas de mejoramiento (Hmam et al., 2018). Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar mediante marcadores microsatélites, accesiones de la colección EEA-INTA Catamarca (Argentina) y genotipos de parcelas comerciales de Cruz del Eje en la provincia de Córdoba (Argentina) y determinar su similitud genética respecto de plantas consideradas referentes, preservadas en la colección de la EEA-INTA Junín en la provincia de Mendoza (Argentina), en el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO) y datos moleculares disponibles en *Olea databases*, como así también detectar la presencia de posibles homonimias y/o sinonimias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron 24 muestras de ADN correspondientes a plantas de olivo (*O. europaea* L.) procedentes de diferentes regiones olivícolas de Argentina y del BMGO. De los materiales preservados en la Colección de Olivo de la EEA-INTA Catamarca, se analizaron nueve individuos correspondientes a genotipos selectos de identidad incierta cuyas plantas madres procedían de diferentes áreas geográficas del centro y oeste de la provincia y cuatro plantas con denominación varietal tradicional. Dos plantas correspondieron a genotipos comerciales selectos por su comportamiento agroecológico superior, ubicadas en parcelas de huertos tradicionales de olivo, del Departamento Cruz del Eje (.CE) al noroeste de la provincia de Córdoba, Argentina. Como referentes varietales se utilizaron ocho plantas que integran la colección de olivos de la EEA-INTA Junín en Mendoza (.M) y el ADN correspondiente al cv. Manzanilla del BMGO, enviado desde el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía centro Alameda del Obispo, Córdoba, España (Tabla 1 y Figura 1).

Extracción de ADN, selección de microsatélites y reacción de amplificación

La recolección del material vegetal de las colecciones de Mendoza y Catamarca, se realizó en primavera y principio de verano a fin de obtener ramas del año con hojas nuevas. Las brindillas se etiquetaron, embolsaron y conservaron en frío durante su traslado. Las muestras de Cruz del Eje se recolectaron en huertos comerciales de conformación tradicional durante la prospección

Tabla 1. Código de identificación y características de los sitios de origen de accesiones y genotipos relacionados al cv. Manzanilla de olivo de la colección EEA-INTA Catamarca, huertos de Cruz del Eje y referentes del banco de germoplasma de la EEAINTA Junín y BMGO

Cultivar/ Genotipo	Código Cv/ Genotipo	Área de origen/ Muestreo	Latitud S/ Longitud O	Altitud msnm	Clima Köppen-Geiger (1,2)	PP mm (2,3)
Común	Co55.C	Andalgalá	27° 36' 16,05" S	1007	Semiárido frío BSk	294
Dennet	De56.C	Catamarca	66° 18' 43,52" O			
Clon Hechiza	CH106.C	Pomán.	28° 24' 20,05" S	1132	Árido cálido BWWh	506
Gudimar Pomán	GuPo107.C	Catamarca	66° 13' 14,86" O			
Salado	Sa102.C	Salado Tinogasta Catamarca	28° 17' 58,05" S 67° 15' 27,27" O	999	Árido cálido BWWh	182
Cerro Negro	CN111.C	Cerro Negro Tinogasta Catamarca	28° 15' 40,51" S 67° 08' 07,69" O	945		
Fina Israelí	Fi62.C Is61.C	Valle Viejo Catamarca	28° 33' 07,64" S 65° 45' 03,38" O	490	Semiárido cálido BSH	312
Selección Carmona	x4INTA112.C Ca58.C					
Española Imperial	Es59.C Im57.C	Luján de Cuyo Mendoza	33° 00' 10,20" S 68° 52' 00,30" O	924	Árido frío BWk	223
Selección N°1.74 4Soles	N°1.74.C 4So.CE	Camino Paso Viejo	30° 48' 39,97" S 65° 06' 07,80" O	487	Semiárido cálido BSH	
Gigante 4 Soles 2 Hermanas	Mg4So.CE 2He.M	Cruz del Eje				536
Aceitera Carmona	Ac.M Ca.M					
Española Imperial	Es.M Im.M	INTA EEA INTA Junín	33° 06' 57,50" S 68° 29' 04,00" O	665	Árido frío BWk	188
Israelí Sevilla	Is.M Se.M					
Sevillana Fina Sevilla *	SevF.M Se.BMGO	Córdoba, España	--	--	--	--

*ADN del cv. Manzanilla de Sevilla perteneciente al Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO), España. Fuentes de información de la tabla: ⁽¹⁾ Beck et al., 2018 ⁽²⁾ <https://www.weatherbase.com>; ⁽³⁾ <https://es.climate-data.org>.

de plantas selectas de comportamiento agronómico superior y estable en el tiempo. Todo el material se mantuvo a 4 °C durante 24 o 48 h hasta su procesamiento y el excedente se conservó a (-80)°C. La obtención de ADN se realizó según el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) con doble pasaje por una solución de cloroformo y alcohol-isoamílico (24:1). La calidad y concentración de ADN óptimas (10-20 ng/μl) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se determinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y buffer TAE 1X a 100V (voltaje constante) durante 30 min. La visualización del ADN se realizó bajo luz UV, previa tinción con bromuro de etidio (1mg/ml). La concentración se determinó visualmente en el gel por comparación con ADN de concentración conocida (100 ng/ul) y por espectrofotometría según lectura a 260 nm

y la pureza se determinó por el valor de relación 260/280.

La caracterización e identificación de los genotipos en estudio, se realizó utilizando seis marcadores microsatélites de las series IAS-OLI26 (Díaz et al., 2006), GAPU 101, 103 y 71B (Carriero et al., 2002), DCA9 (Sefc et al., 2000), UDO43 (Cipriani et al., 2002). Todos los marcadores mencionados resultaron informativos por su polimorfismo según trabajos previos (Baldoni et al., 2009; L. E. Torres et al., 2014). La mezcla de la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 μl con 10-20 ng/μl de ADN molde, 0,2 mM dNTP, 1 μM de cada uno de los iniciadores, 1 U/μl enzima *Taq* polimerasa de Promega, 1X buffer de *Taq* polimerasa. Para los microsatélites Oli26, GAPU101, 103, 71B y UDO43 las condiciones de ciclado fueron las propuestas

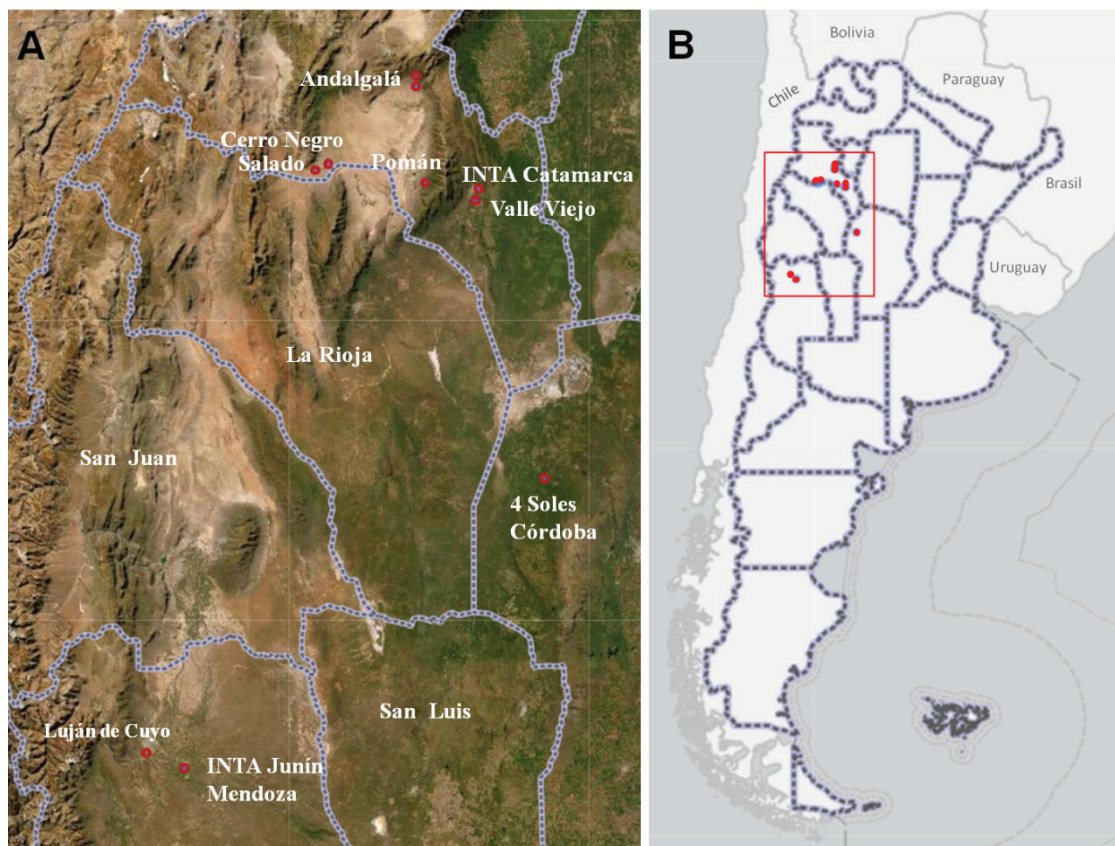


Figura 1. A: Sitios de origen de genotipos de olivo seleccionados y localización de las Estaciones Experimentales Agropecuarias del INTA Junín (Mendoza) y Catamarca, sedes de colecciones y genotipos nativos. **B:** Ubicación del área ampliada en el mapa de la porción continental sudamericana de Argentina

por sus autores, en tanto que para el marcador DCA09, se probaron diferentes temperaturas de hibridación y cantidad de ciclos para evitar la aparición de bandas inespecíficas. Todas las amplificaciones se realizaron en un equipo de termociclado Eppendorf Mastercycler Gradient y se repitieron al menos dos veces a partir de diferentes eventos de extracción de ADN. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis vertical en geles discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE) con una concentración final de 15% para el gel resolutivo y 5% para el gel de apilamiento, en buffer Tris glicina 1X a 100 V (voltaje constante) durante 16 h. El ADN amplificado se visualizó bajo luz UV, previa tinción con bromuro de etidio (1mg/ml), y los resultados se documentaron mediante un sistema *DigiDoc-It* (UVP) de captura de imagen con cámara Cannon PC 1130 incorporada.

Determinación de perfiles alélicos

Los perfiles alélicos de cada individuo bajo

estudio se determinaron utilizando el software libre *GelAnalyzer* (Lazar y Lazar, 2010), de acuerdo a los siguientes criterios: i) la función que se utilizó para calibrar la imagen correspondió al valor de R^2 más cercano a uno; ii) el tamaño de las bandas en pares de bases (pb) de los loci analizados, fue estimado en relación a estándares de peso molecular, verificando que presentaran el mismo valor o el más próximo a los disponibles en <http://www.oleadb.it/>, y dentro del rango esperado para cada microsatélite según los publicados; iii) las bandas únicas que se encontraban en el rango esperado se consideraron como genotipos con estado alélico homocigota.

Análisis estadístico

Caracterización genética mediante microsatélites

El análisis de seis loci microsatélites se realizó para caracterizar y determinar la similitud genética de accesiones preservadas en la colección del INTA Catamarca y de dos plantas selectas de

la localidad de Cruz del Eje, con respecto de plantas consideradas referentes (Tabla 1). Para confirmar la denominación varietal se estableció el criterio de total correspondencia de los patrones electroforéticos con los obtenidos para las plantas de denominación varietal tradicional.

La información genotípica brindada por los marcadores genéticos permite la clasificación de entidades biológicas a partir del ordenamiento de datos en una tabla de doble entrada con la composición alélica (pb) de cada genotipo para cada loci (Balzarini et al., 2010). En el presente estudio la diversidad genética del complejo de accesiones relacionadas a cultivares de Manzanilla de la colección de Catamarca fue estimada considerando los datos de su constitución alélica en cada locus microsatélite, mediante los parámetros estadísticos intrapoblacionales: número de alelos por locus, heterocigosis observada (H_o), heterocigosis insesgada de Nei (H_e) (probabilidad de diferencias alélicas en cualquier loci, escogido al azar en la población [De Vicente y Fulton, 2004]) y el contenido de información polimórfico (PIC), como indicador de la calidad informativa de un marcador en estudios de diversidad genética (El Bakkali et al., 2019). Las relaciones genéticas entre genotipos de Catamarca y Cruz del Eje respecto a los materiales de referencia de Mendoza y BMGO se evaluaron mediante un análisis de coordenadas principales (ACoordP) y se generó un dendrograma según un agrupamiento jerárquico de pares no ponderados sobre la base del promedio aritmético, UPGMA (según siglas en inglés), ambos a partir de una matriz de distancia euclídea, entre los pares de variables o alelos de los 24 genotipos de olivo, incluido el cv. Manzanilla de Sevilla del BMGO. Este modelo de distancia es una de las métricas apropiadas para el análisis de datos provistos por marcadores microsatélites, asumiendo una correspondencia lineal entre cada par de datos alélicos. También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) relativo a la

información que brinda cada marcador. El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue contar con información relativa a la diversidad, caracterización e identificación genética molecular de trece accesiones de la colección de olivo del INTA Catamarca y dos genotipos selectos de la localidad de Cruz del Eje, con relación a cultivares de Manzanilla de referencia pertenecientes al banco de germoplasma del INTA, Mendoza y BMGO. A tal fin, se utilizaron seis marcadores moleculares microsatélites que por trabajos previos resultaron ser altamente reproducibles, polimórficos y de fácil interpretación.

A partir del ADN correspondiente a cada uno de los 24 individuos analizados, los microsatélites amplificaron bandas de tamaño igual o dentro del rango esperado según lo propuesto por la bibliografía y a datos publicados en la base de datos *Olea databases*. Todos los individuos presentaron perfiles electroforéticos representativos de los 6 loci microsatélites, que permitieron la caracterización del germoplasma de 11 genotipos selectos, pero de base genética incierta y la identidad de 2 accesiones que responden a variedades tradicionales, pertenecientes a la colección de Catamarca y huertos de Cruz del Eje.

Los resultados de las medidas de resumen que explican la variabilidad genética, mostraron la presencia de 41 alelos con un rango de variación de cinco (GAPU71) a nueve (GAPU101 y UDO43) alelos por locus; y un promedio de 6,83 alelos por locus (Tabla 2). Los loci microsatélites GAPU101, GAPU103, GAPU71B, DCA09 y UDO43 presentaron los alelos con menores valores de frecuencia (0,21), en tanto que en los microsatélites OLI26,

Tabla 2. Variabilidad de seis loci microsatélites de accesiones de olivo de la colección del INTA Catamarca, genotipos comerciales de Cruz del Eje y referentes del banco de germoplasma del INTA Junín y BMGO

Locus	Motivo repetido	Rango (pb)	Na	Ho	H_e Nei	PIC
GAPU101	(AG) ₃₋₂₁	176-225	9	1	0,884	0,835
GAPU103A	(TCTTTCATGGTGGATCAGACG)0-1 (TC) ₈₋₃₂	136-180	5	1	0,735	0,653
GAPU71B	(AG)7-8 (AAG) ₅₋₁₂	121-144	5	1	0,704	0,621
DCA9	(GA) ₇₋₂₉	153-196	7	1	0,741	0,673
UDO43	(GT) ₁₂₋₁₈	164-219	9	0,857	0,884	0,836
OLI26	(GA) ₁₄	180-204	6	1	0,733	0,669
Media			6,83	0,98	0,78	0,71
Total			41			

Medidas de resumen: (Na) Número de alelos por locus, H_o (heterocigosis observada), H_e (heterocigosis esperada) y PIC (contenido de información polimórfica).

UDO43 y GAPIU71B se observaron los alelos con mayores valores de frecuencia (0,43). Respecto al número de alelos por locus, los microsatélites UDO43, DCA09 y GAPIU71B mostraron similar comportamiento al observado por El Bakkali et al. (2019) quienes utilizaron, excepto el loci OLI26, los restantes cinco marcadores para el análisis de accesiones de los bancos de germoplasma de Córdoba (España) y de Marruecos. Sin embargo, en los materiales analizados en el presente trabajo, el loci GAPIU101 resultó más polimórfico que GAPIU103A, siendo éste un comportamiento inverso al presentado por dichos autores. DCA09 y UDO43 también resultaron con alta capacidad discriminatoria, tal como lo reportado por Gago et al. (2019) en el análisis del germoplasma nativo de la región NO de España y por Trujillo et al. (2014) para las accesiones de la colección del BGMO sito en Córdoba, España.

La H_o varió entre 0,857 y 1 correspondiendo el menor valor al locus UDO43 y 0,98 como valor promedio y la H_e arrojó valores entre 0,704 (GAPIU71B) y 0,884 (GAPIU101 y UDO43) y valor promedio de 0,78 (Tabla 2). El olivo por ser una planta predominantemente alógama, presenta un elevado nivel de heterocigocidad y variabilidad en el germoplasma representado en diferentes cultivares (Doveri et al., 2008; Hmnam et al., 2018). El elevado valor de H_o respecto a la H_e , detectado en los materiales analizados es consistente con los observados en estudios previos sobre el germoplasma de olivo, confirmando la capacidad de los microsatélites para detectar con fidelidad el estado de homocigosis respecto de la presencia de un alelo nulo para ese locus e indicaría un alto nivel de variabilidad dentro de la población (Trujillo et al., 2014; El Bakkali et al., 2019). Los seis loci analizados resultaron altamente informativos ($PIC > 0,5$) y el polimorfismo detectado varió entre 0,621 y 0,836 (locus GAPIU71B y UDO43) respectivamente (Tabla 2). El valor de polimorfismo (PIC) detectado para los seis loci microsatélites analizados en este estudio, mayor a 0,5, resulta muy informativo ya que valores de este estadístico menores a 0,25 o entre 0,25 y 0,5, serían poco o medianamente informativos (Ruiz Erazo, 2014). Este resultado permitió confirmar que los seis loci analizados fueron significativamente variables, informativos y adecuados tanto para la identificación de cultivares como para discriminar todos los genotipos selectos de la colección de Catamarca y Cruz del Eje.

A partir de una matriz de datos de composición alélica de cada material analizado, previo al análisis de agrupamiento, se realizó el análisis de coordenadas principales (ACoordP) y

componentes principales (ACP). Las dos primeras coordenadas principales (CPO1 y CPO2) del gráfico de dispersión explicaron el 55,6% de la variabilidad existente y las relaciones genéticas entre genotipos y referentes varietales. Los valores cercanos a cero refieren a menor distancia genética y mayor similitud entre los individuos. En la Figura 2, los individuos que comparten el mismo punto tienen distancia genética igual a cero, tal el caso observado para la accesión Carmona (Ca58.C) de Catamarca con su referente varietal Carmona (Ca.M), de la accesión Israelí (Is61.C) con los cultivares referentes Israelí (Is.M) y Sevilla (Se.M), y de la accesión Fina (Fi62.C) con el cultivar Española (Es.M) de Mendoza. En la distribución espacial de las accesiones con identidad incierta dado su origen espontáneo o acción antrópica desconocida y originalmente seleccionados en olivares tradicionales de la zona oeste y valle central de Catamarca (Figura 1), a nivel de los loci analizados, no se observó asociación entre los genotipos y sus respectivas zonas de origen cuyas condiciones climáticas se registran en la Tabla 1.

En el análisis de componentes principales los ejes correspondientes a CP1 y CP2, explicaron el 38,3% de la variabilidad genética total y la importancia relativa de las variables de clasificación (Figura 3). Los autovectores de la CP1 (22,7%), que presentaron mayor valor absoluto fueron los correspondientes a los alelos 184 y 193 de los marcadores DCA09 y Oli26 respectivamente. Estos componentes permitieron

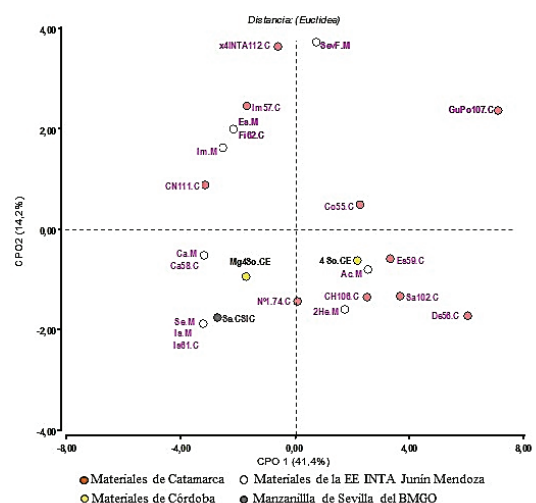


Figura 2. Gráfico de dispersión. Análisis de coordenadas principales (ACoordP) de accesiones de olivo de la colección del INTA Catamarca, genotipos comerciales de Cruz del Eje y referentes del banco de germoplasma de INTA Junin y BMGO

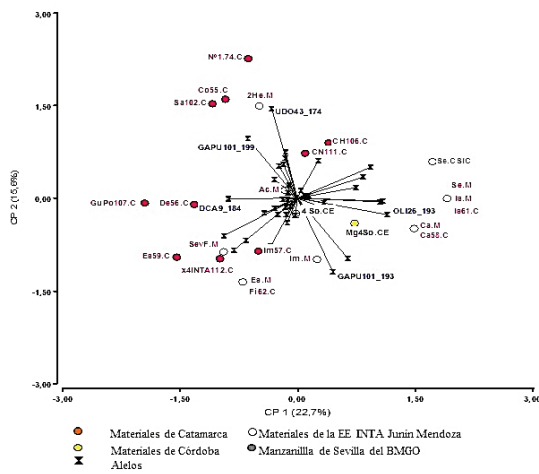


Figura 3. Distribución bidimensional del análisis de componentes principales (ACP) de accesiones de olivo de la colección INTA Catamarca, genotipos comerciales de Cruz del Eje y referentes del banco de germoplasma de INTA Junín y BMGO

definir dos grupos representados en 2D y en concordancia con el agrupamiento jerárquico presentado en el dendrograma correspondiente: un grupo conformado mayoritariamente por accesiones de Catamarca correspondientes a los genotipos locales Gudimar Pomán (GuPo107.C), Salado (Sa102.C), Española (Es59.C), Selección (N°1.74.C), Imperial (Im57.C), Selección x4INTA112.C, Sevillana Fina (SevFi.M), Fina (Fi62.C), Española (Es.M), Común (Co55.C), Aceitera (Ac.M), 4Soles (4So.CE), Dennet (De56.C), Dos Hermanas (2He.C) y otro grupo que incluye a las accesiones Clon Hechiza (CH106.C), Sevilla (Se.BMGO y Se.M), Israelí (Is61.C), Israelí (Is.M), Cerro Negro (CN111.C), Carmona (Ca58.C), Carmona (Ca.M), Imperial (Im.M) y Manzanilla Gigante (Mg4So.CE).

La CP2 con el menor valor (15,6%) mostró que los alelos 174 (loci UDO43) y 193 (loci GAPU101) fueron los más relevantes para relacionar los materiales en estudio (Figura 3). Banilas et al. (2003) en un estudio similar con marcadores RAPD (por su nombre en inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*)

RAPD para evaluar la diversidad genética y discriminar entre 26 accesiones pertenecientes a un antiguo cultivar local de Chipre denominado genéricamente Ladolia, observaron que en el ACP el 33,9% de la variabilidad genética total estaba representada por la PC1 (18,3%) y la PC2 (15,6%).

El estudio exploratorio de datos moleculares permitió generar un agrupamiento jerárquico de individuos relacionados genéticamente (UPGMA)

a partir de una matriz de distancia euclídea, cuyo coeficiente de correlación cofenética fue de 0,91 confirmando la bondad de ajuste entre matrices que determinan las relaciones entre los individuos y que se visualizan en la Figura 4. Balzarini et al. (2010) señalan que este valor, por ser una medida de proximidad, al medir la magnitud de la asociación lineal entre dos variables, cuanto más próximo está de la unidad, indica que las matrices en comparación son proporcionales y confirma una adecuada representación de la misma en el dendrograma (Figura 4). Un valor similar (0,96) fue observado por Costero (2017) en el análisis genético de siete loci microsatélites en tres genotipos locales selectos de la localidad de Cruz del Eje y relacionados según caracteres fenotípicos y productivos a siete variedades tradicionales de Manzanilla preservadas en el banco de germoplasma del INTA Junín, y utilizadas como referentes. En el análisis de 14 cultivares de olivo del noreste de Algeria, región del Maghreb (norte de África) mediante 10 marcadores microsatélites de las series DCA, GAPU, UDO y EMO, Dominguez García et al., en el año 2012, obtuvieron un valor de correlación cofenética de 0,74 que, si bien menor, resultó significativo.

Los perfiles alélicos de los materiales de la colección de Catamarca y Cruz del Eje se compararon con aquellos obtenidos para cultivares de reconocida denominación varietal del BMGO

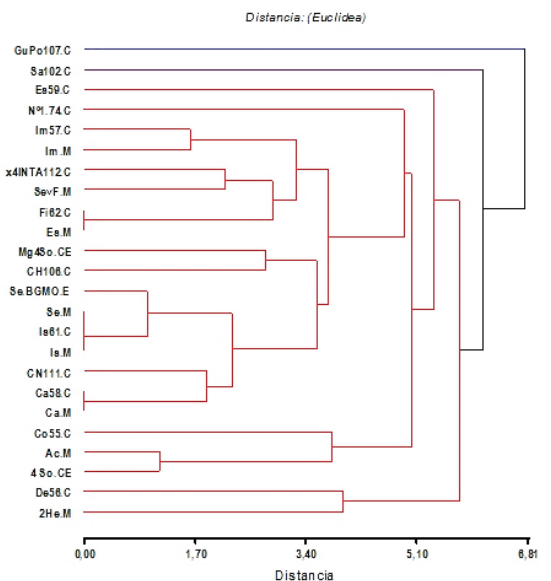


Figura 4. Dendrograma basado en el método UPGMA según estimación de distancia genética euclídeana, de accesiones de olivo de la colección INTA Catamarca, genotipos comerciales de Cruz del Eje y referentes del banco de germoplasma de INTA Junín y BMGO

y de la colección de olivos del INTA Junín. La correspondencia en la conformación genotípica de los individuos permitió constatar diferentes situaciones respecto a la identidad varietal y/o conformación germoplásmica predominante en las plantas seleccionadas con base genética incierta de Catamarca y Córdoba:

i) Plantas de igual denominación que presentaron un único perfil alélico no compartido con otros materiales bajo análisis, tal el caso observado para la accesión Carmona (Ca.C), de Catamarca, con su referente Carmona (Ca.M). En especies frutales, sin descartar la relevancia de los caracteres fenotípicos, con la información aportada por los marcadores microsatélites es posible caracterizar y asignar diferentes genotipos a cultivares. (Rallo et al., 2000 y 2002; do Val et al., 2012; Torres et al., 2014; Trujillo et al., 2014). La certeza identitaria observada en el presente trabajo para el cv. Carmona (Ca.C) de la colección de Catamarca, resulta consistente dado que el referente Carmona de Mendoza (Ca.M) fue homologado respecto al ejemplar de igual denominación depositado en el BMGO de España, por Cavagnaro et al. en el año 2001, según análisis de caracteres morfológicos y moleculares de tipo RAPD.

ii) Plantas con diferente denominación, pero mismo perfil alélico como lo observado para los cultivares Israelí (Is.C) de Catamarca, Israelí (Is.M) y Sevilla (Se.M) de Mendoza, como así también y en el mismo sentido, entre la accesión Manzanilla Fina (Fi62.C) de Catamarca y el cv. Española (Es.M).

iii) Materiales con composición genética propia que no se correspondía según lo esperado, con la obtenida para los cultivares referentes de igual denominación, tal el caso observado para las accesiones de Catamarca registradas como var. Española (Es59.C) e Imperial (Im57.C). La accesión Española (Es59.C) presentó la menor distancia (4,93) con el cv. Sevillana Fina de Mendoza (SevF.M) en tanto que Imperial (Im57.C) registró un valor de 1,64 con su referente Imperial (Im.M). Las diferencias observadas entre la accesión Imperial (Im.C) de Catamarca, respecto de su referente el cv. Imperial (Im.M), podrían atribuirse a pequeñas variaciones alélicas generadas por la propia conformación del marcador microsatélite con secuencias de dinucleótidos y ricas en repeticiones del motivo GA, consideradas sitios susceptibles de ocurrencia de mutaciones y deslizamientos durante la replicación (El Bakkari et al., 2019). La misma situación se presentó en la caracterización del genotipo comercial 4So.CE, respecto del cv. Aceitera (Ac.M). Si bien, la ausencia de efecto

ambiental sobre los marcadores microsatélites les confiere el doble de capacidad discriminante que la proporcionada por la variabilidad de los descriptores del endocarpo, su uso resultaría especialmente informativo en casos como éste donde la diferencia molecular resulta pequeña (Trujillo et al., 2014) por cuanto, dentro de los caracteres morfológicos, es el más discriminante y estable (Barranco et al., 2005). De igual manera, este carácter morfológico, así como otras variables botánicas cualitativas como las propuestas por Gago et al. (2019) aportaría información para el esclarecimiento de la posible sinonimia entre las accesiones Israelí de Catamarca y Mendoza con el cv. Sevilla de Mendoza, todos los cuales presentaron idéntico perfil de microsatélites. El cultivar Israelí tendría un origen clonal a partir del cv. Sevilla introducido en Israel, y desde allí, posteriormente ingresado a la Argentina por productores originarios de aquel país de Medio Oriente (Toro, A., comunicación personal). Una situación similar que involucra al cv. Manzanilla de Sevilla originario de España, fue resuelta por Trujillo et al. (2014) quienes determinaron su sinonimia con la accesión Hamed (COR000722) originaria de Egipto y depositada en el BMGO.

La diferente denominación para un mismo genotipo, tal el caso observado para la accesión Fina (Fi62.C) y el cv. Española (Es.M), y misma denominación, pero diferente genotipo, como resultaron Española de Catamarca (Es.C) y su referente de Mendoza (Es.M), podría explicarse como un error accidental en el etiquetado durante el proceso de propagación y/o establecimiento de plantas o una situación de sinonimia y homonimia respectivamente. No obstante, se destaca que, según la topología del agrupamiento presentado en el dendrograma (Figura 4), la accesión denominada Española (Es.C) posee un genotipo claramente diferente respecto de las variedades de referencia, ocupando una posición relativa respecto de éstas, similar a la observada por Tentracoste y Puertas (2011) para Manzanilla Española de la colección de INTA Junín. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, también brindan información relevante sobre la base germoplásmica predominante en accesiones de la colección de Catamarca, que son selecciones promisorias cuyo origen es desconocido. En la Tabla 3 se presentan valores máximos y mínimos de distancia genética registrados para las selecciones locales, respecto de cultivares tradicionales de Manzanillas, a fin de aportar información referida a su conformación germoplásmica. Siendo que la mayor similitud entre entidades se corresponde con valores de distancia genética cercanos a

Tabla 3. Distancia genética, máxima y mínima, de accesiones de la colección de olivo de la EEA INTA Catamarca y de genotipos de Cruz del Eje respecto de cultivares referentes de Manzanilla de denominación tradicional

Selecciones Locales	Referentes								
	Dos Hermanas (2He.M)	Aceitera (Ac.M)	Imperial (Im.M)	Sevilla (Se. BMGO)	Sevilla (Se.M)	Sevillana fina (SevF.M)	Carmona (Ca.M)	Israelí (Is.M)	Española (Es.M)
4 So.CE	6,2	1,15							
Mg4So.CE		5,13			2,86				
CH106.C	5,39				3,72				
CN111.C		5,01	1,85				1,89		
Co55.C		3,78		5,44					
De56.C	3,95	6,9							
GuPo107.C					7,63	4,1		7,63	6,05
Nº1.74.C	5,6			4,43					
Sa102.C		7,31	4,69						
x4INTA112.C	5,3					2,16			
Ca58.C		4,9					0		
Es59.C	6,53					4,93			
Fi62.C		5,42							0
Im57.C	4,78		1,64						
Is61.C		5,29			0			0	

* : en color el valor mínimo

cero, la selección Cerro Negro (CN111.C) tiene fuerte base genética tanto del cv. Carmona (Ca.M) como del cv. Imperial (Im.M); el germoplasma de este último, también resultó relevante en la composición genética de la selección Salado (Sa102.C). Las accesiones Selección x4INTA112.C y Gudimar Pomán (GuPo107.C) en tanto, están genéticamente más relacionados al cv. Sevillana Fina (SevF.M) y lo propio se observó para los genotipos Selección Nº 1.74.C y Clon Hechiza (CH106.C) con el cultivar Sevilla Se.BMGO y Se.M respectivamente, aunque con valores bajos de similitud. Sobre la conformación genética de las selecciones Manzanilla Común (Co55.C) y Dennet (De56.C), los cultivares Aceitera (Ac.M) y Dos Hermanas (2He.M) fueron los predominantes, respectivamente. Los genotipos selectos 4Soles (4So.CE) y Manzanilla gigante (Mg4So.CE) implantados en huertos de la localidad de Cruz del Eje presentaron el primero, la menor distancia genética con el cv. Aceitera (Ac.M) en tanto que el germoplasma del segundo, presentó más similitud con el cv. Sevilla (Se.M) de Mendoza. Los genotipos selectos presentes en la colección de Catamarca cuya base genética presentó bajos valores de filiación a un cultivar en particular, probablemente representen progenies putativas híbridas. Entre ellos Salado (Sa102.C) y Gudimar Poman (GuPo.C) resultan genotipos nativos novedosos y peculiares por su conformación genética significativamente diferente respecto de todos

los materiales analizados en el presente estudio y representan un valioso recurso de variabilidad genética disponible para planes de mejoramiento del olivo (Hmam et al., 2008). Siendo el olivo una especie principalmente autoincompatible, el análisis del linaje y la caracterización molecular de genotipos locales provenientes de semillas o de portainjertos de plantas que perdieron el injerto permiten orientar el sentido de los cruzamientos controlados del fitomejorador y detectar en la progenie posibles contaminaciones. Dilucidar la relación genética entre cultivares tradicionales y genotipos autóctonos de olivo, así como la variabilidad genética existente en el conjunto de materiales analizados, es un importante aporte para el fitomejorador y el punto de partida para orientar el diseño de cruzamientos controlados y asociar genomas con fines de mejoramiento (Diez et al., 2016).

CONCLUSIONES

Estos resultados constituyen un aporte para el ordenamiento identitario tanto del germoplasma tradicional, como de las recientes selecciones locales depositadas en la colección de olivos del INTA Catamarca y relacionadas a la denominación varietal Manzanilla. En este trabajo se presenta por primera vez la caracterización molecular de genotipos de identidad incierta conservados en la

EEA-INTA Catamarca y su relación genética con cultivares tradicionales. Se confirmó la identidad del cv. Carmona y se detectaron posibles casos de sinonimia para el cv. Israelí y Manzanilla Fina de Catamarca y de homonimia para la accesión registrada como Española. En el marco de la moderna tecnología alimentaria, la identidad varietal constituye un paso clave para certificar el origen y abordar la calidad de productos y subproductos diferenciados derivados del olivo, orientados a satisfacer la demanda de mercados cada vez más exigentes. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de la colección de olivo de la EEA INTA Catamarca como un reservorio de diversidad genética de materiales nativos con relevante aptitud agronómica. La multiplicación y distribución de material correctamente identificado desde estos reservorios, evitará incrementar la confusión entre denominaciones y cultivares existentes en bancos de germoplasma de referencia mundial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ing. Agr. Eduardo R. Trentacoste y al Ing. Agr. Carlos M. Puertas de la EEA INTA Mendoza, por la gentileza de proveer el material vegetal de la Colección de Olivos de la EEA Mendoza, como así también al Dr. Antonio Martín y la Dra. Aurora Díaz del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) de Córdoba, España, por el envío del ADN del cv. Manzanilla de Sevilla del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo Córdoba, España. El presente estudio fue parcialmente financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT, UNC) proyecto 05/G 507 y el Instituto de Tecnología Agropecuaria PNBIO 1131044- PRet- INTA- CATRI-1233103.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldoni, L., Cultrera, N. G., Mariotti, R., Ricciolini, C., Arcioni, S., Vendramin, G. G., Buonamici, A., Porceddu, A., Sarri, V., Ojeda, M. A., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A., Perri, E., Salimonti, A., Muzzalupo, I., Casagrande, A., Lain, O., Messina, R. y Testolin, R. (2009). A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding*, 24(3), 213-231. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9285-8>
- Balzarini, M. G. y Di Rienzo, J. A. InfoGen (versión 2014). [Software]. Córdoba. Argentina. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.info-gen.com.ar>
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I. y Di Rienzo, J. (2010). *Estadística en biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen* (1a ed.). Encuentro Grupo Editor.
- Banilas, G., Mina, J., Gregorius, C., Demoliou, C., Kourti, A. y Hatzopoulos, P. (2003). Genetic diversity among accessions of an ancient olive variety of Cyprus. *Genome* 46(3), 370-376. <https://doi.org/10.1139/g03-011>
- Barranco, D. y Rallo, L. (2000). Olive Cultivars in Spain. *HortTechnology*, 10 (1): 107-110. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.10.1.107>
- Barranco, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F. y Trujillo, I. (2000). *World Catalogue of Olive Cultivars*. International Olive Oil Council.
- Barranco, D., Trujillo, I y Rallo, P. (2000). ¿Are "Oblonga" and "Frantoio" olives the same cultivar? *Hortscience*, 35(7), 1323-1325.
- Barranco, D., Trujillo, I. y Rallo, L., (2005). Elaiografía Hispánica. En: L. Rallo, J. M. Caballero,, C. Del Río, A. Martín, J. Tous, I. Trujillo. (Eds.), *Varietades de olivo en España* (45-231). MAPA y Ediciones Mundi-Prensa.
- Beck, H. E., Zimmermann, N. E., McVicar, T. R., Vergopolan, N., Berg, A. y Wood, E. F. 2018. *Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1km resolution. Scientific Data*, 5, 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Carrero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. y Giorio, G., (2002). Identification of simple sequence repeats (SSR) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 104, 301-307. <https://doi.org/10.1007/s001220100691>
- Cavagnaro, P. y Masuelli, R. W. (2002). La homogeneidad varietal en viveros de olivo estudiada con marcadores moleculares. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 24(2), 17-28.
- Cavagnaro, P., Juárez, J., Bauza, M. y Masuelli, R. W. (2001). Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. *Agriscientia*, 18, 27-35.
- Chiesa Molinari, O. y Nicolea, H. G. (1947). *Tratado de olivicultura general*. El Ateneo.
- Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A. y Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 223-228. <https://doi.org/10.1007/s001220100685>
- Corpas, F. J., Fernández-Ocaña, A. Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F. J., Rodríguez-Serrano M., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Sandalio, L. M., del Río, L. A. y Barroso, J. B. (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant*

- and *Cell Physiology*, 47 (7), 984-994. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj071>
- Costero, B. (2017). Caracterización mediante marcadores microsatélites de germoplasma de olivo (*Olea europaea* L.) del departamento Cruz del Eje, Córdoba, Argentina. Tesis de Maestría no publicada. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- De Vicente, M. C. y Fulton, T. (2004). *Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje*. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_1_es.pdf
- Díaz, A., de la Rosa, R., Martín, A. y 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(3), 165-175. <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0041-5>
- Díaz, C. M., Imperato, A., Rallo, L., Barranco, D. y Trujillo, I. (2012). Worldwide core collection of olive cultivars based on simple sequence repeat and morphological markers. *Crop Science*, 52, 211-221. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.02.0110>
- Díaz, C. M., Moral, J., Barranco, D. y Rallo, L. (2016). Genetic Diversity and Conservation of Olive Genetic Resources. In: M. Ahuja, S. Jain (Eds.), *Genetic Diversity and Erosion in Plants. Sustainable Development and Biodiversity* vol. 8 (pp. 337-356). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25954-3_10
- do Val, A. D. B., Ferreira, J. L., Vieira Neto, J., Pasqual, M., de Oliveira, A. F., Borém, A. y Cançado, G. M. A. (2012). Genetic diversity of Brazilian and introduced olive germplasms based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 11(1), 556-571. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.March.8.4>
- Dominguez-García, M. C., Laib, M., De La Rosa, R. y Belaj, A. 2012. Characterisation and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 87(2) 95-100. <https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512837>
- Doveri, S., Sabino Gil, F., Díaz, A., Reale, S., Busconi, M., da Cámara Machado, A., Martín, A., Fogher, C., Donini, P. y Lee, D. (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*. 116(4), 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.02.005>
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- El Bakkali, A., Essalouh, L., Tollon, C., Rivallan, R., Mournet P., Moukhli, A., Zaher, H., Mekkaoui, A., Hadidou, A., Sikaoui, L. y Khadaril, 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): e0223716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223716>
- Gago, P., Santiago, J. L., Boso, S. y Martínez, M. C. (2019). The forgotten, ancient olive trees of the Spanish northwest: A first molecular and botanical analysis. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(2), e0702.
- García, E. E., Puertas, C., Trentacoste, E., Bolcato, L. y Ulanovsky, S. M. (2008). *Caracterización molecular de olivo (Olea europaea L.) del Banco de Germoplasma INTA Junín, Mendoza*. Documento presentado en XXXI Congreso Argentino de Horticultura, 27(64) (pp. 98). Mar del Plata, Argentina.
- Gomez-Escalonilla Sanchez - Heredero, M. y Vidal-Hernandez, J. (2006). *Varietades del olivar. Hojas Divulgadoras* (2117 HD). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_2006_2117.pdf
- Hmmam I., Mariotti, R., Ruperti B., Cultrera, N., Baldoni, L. y Barcaccia, G. (2018). Venetian olive (*Olea europaea* L.) germplasm: disclosing the genetic identity of locally grown cultivars suited for typical extra virgin oil productions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65, 1733-1750. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0650-5>
- Lazar, I. Jr., y Lazar, I. 2010. *GelAnalyzer* (versión 2010a) [Software]. Hungría. <http://www.gelanalyzer.com/>
- Muzzalupo, I., Vendramin, G. G., y Chiappetta, A. (2014). Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea* L.) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *The Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/296590>
- OLEA databases. The SSR marker database. Olea databases. Recuperado el 16 de marzo de 2017 de http://www.oleadb.it/SSRdca_search.php
- Prataviera, A. G. (1998). Olivo: el germoplasma argentino. *Olivae*, 70, 32-35.
- Rallo, L. (1995). Selección y Mejora Genética del Olivo en España. *Olivae*, 59, 46-53.
- Rallo, P., Dorado, G. y Martín, A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSR) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 984-989. <https://doi.org/10.1007/s001220051571>
- Rallo, P., Dorado, G., y Martín, A. (2002). Application of microsatellite markers in olive breeding. *Acta Horticulturae*, 586, 69-72. <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2002.586.5>
- Ruiz Erazo, X. A. (2014). *Diversidad genética de*

- cacao* (*Theobroma cacao* L.) *con marcadores moleculares microsatélites*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75268/7211504.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sefc, K. M., Lopes, M. S., Mendonça, D., Rodrigues Dos Santos, M., Laimer Da Câmara Machado, M. y 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*(8), 1171-1193. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00954.x>
- Torkzaban, B., Hossein Kayvanjoo, A., Ardalan, A., Mousavi, S., Mariotti, R., Baldoni, L., Ebrahimie, E., Ebrahimi, M. y Hosseini-Mazinani, M. (2015). Machine Learning Based Classification of Microsatellite Variation: An Effective Approach for Phylogeographic Characterization of Olive Populations. *PLoS ONE*: *10*(11): e0143465. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143465>
- Torres, L. E., Tabora, R. J., Costero, B., Degutis, L., Teich, I., Prenol, L.V. y Conci, L. (2014). Genetic relationships between olive (*Olea europaea* L.) cultivars and promissory genotypes in Catamarca, Argentina. *Acta Horticulturae*, *1057*, 495-499. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.62>
- Torres, M. R., Cornejo, P., Bertoldi, V., Ferrer, M. S. y Masuelli, R. W. (2014). Development of a microsatellite database for identification of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in Mendoza, Argentina. *Acta Horticulturae*, *1057*, 521-524. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1057.66>
- Trentacoste, E. R. y Puertas, C. M. (2011). Preliminary characterization and morpho-agronomic evaluation of the olive germplasm collection of the Mendoza province (Argentina). *Euphytica*, *177* (1), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0270-4>
- Trujillo, I., Rallo, L. y Arús, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *120*(2), 318-324. <https://doi.org/10.21273/JASHS.120.2.318>
- Trujillo, I., Ojeda, M.A., Urdiroz, N. M., Potter D., Barranco, D., Rallo, L. y Diez, C. M. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*. *10*, 141-155. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0671-3>