

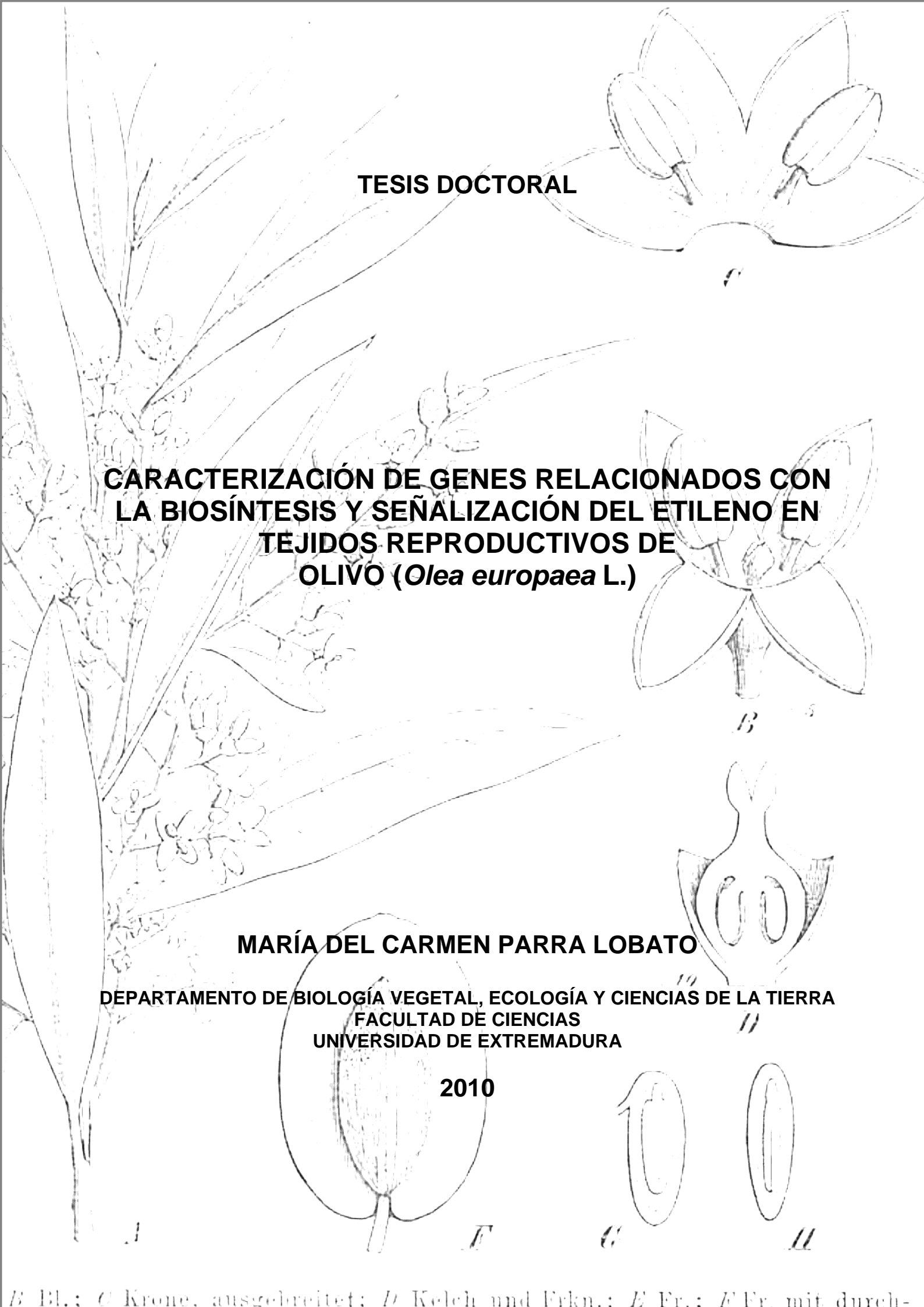
TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DEL ETILENO EN
TEJIDOS REPRODUCTIVOS DE
OLIVO (*Olea europaea* L.)**

MARÍA DEL CARMEN PARRA LOBATO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, ECOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA TIERRA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

2010



B Bl.; *C* Krone, ausgebreitet; *D* Kelch und Frkn.; *E* Fr.; *F* Fr. mit durch-

TESIS DOCTORAL

Caracterización de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno en tejidos reproductivos de olivo (*Olea europaea* L.)

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fdo: María del Carmen Parra Lobato

Badajoz, 2010

Vº Bº
DIRECTOR DEL TRABAJO

Fdo: Dra. María del Carmen Gómez Jiménez
Profesora Titular de Universidad
Dpto. de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra
Facultad de Ciencias
Universidad de Extremadura



Dra. M^a del Carmen Gómez Jiménez, Profesora Titular de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra de la Universidad de Extremadura.

Certifica:

Que Dña. **M^a del Carmen Parra Lobato**, licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "**Caracterización de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno en tejidos reproductivos de olivo (*Olea europaea* L.)**", que presenta para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Badajoz a 14 de junio de 2010.

Fdo: Dra. M^a del Carmen Gómez Jiménez

El trabajo que se presenta en esta Memoria ha sido financiado por el Proyecto **BFU2007-62566** del Ministerio de Ciencia e Innovación titulado 'ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LA MADURACIÓN Y LA ABSCISIÓN DEL FRUTO EN EL OLIVO: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ZONA DE ABSCISIÓN' y ha sido realizado en el Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura.

Edita: Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones
ISBN: 978-84-697-4486-4

Agradecimientos

En primer lugar y de forma especial, quiero agradecer esta Tesis a mi directora, la **Dra. María del Carmen Gómez Jiménez**, por su esfuerzo, dedicación, paciencia y comprensión. Sus conocimientos, orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Ella me transmitió la importancia del rigor y la seriedad en la investigación. Como directora, se ha ganado mi lealtad y admiración, consiguiendo siempre las metas que se propone.

También quiero agradecer esta tesis:

A mi compañero de laboratorio **Ldo. Francisco José Delgado**, por su participación en la localización y caracterización molecular de las variedades de olivo en Extremadura.

Al **Dr. Miguel A. Paredes** por su colaboración en la recolección del material y por su apoyo y ánimo dentro y fuera del laboratorio. Al **Dr. José Sánchez** por su ayuda en la preparación de las figuras de esta Memoria.

A la **Dra. Isabel M^a Sánchez** de la Universidad de Granada por su ayuda, sus valiosas correcciones y sugerencias en la Memoria.

A la **Dra. Mercedes Gallardo** de la Universidad de Vigo por poner a nuestra disposición todo lo necesario para cuantificar la producción de etileno y el contenido de ACC/MACC.

A los **alumnos de la Facultad de Ciencias y agricultores de la región**, que aportaron desinteresadamente parte del material vegetal utilizado en este trabajo, así como a las Cooperativas que ofrecieron su colaboración. En especial, a **D. José Luís Grosson**, por su incondicional ayuda.

A todos, gracias de corazón.

DEDICATORIA

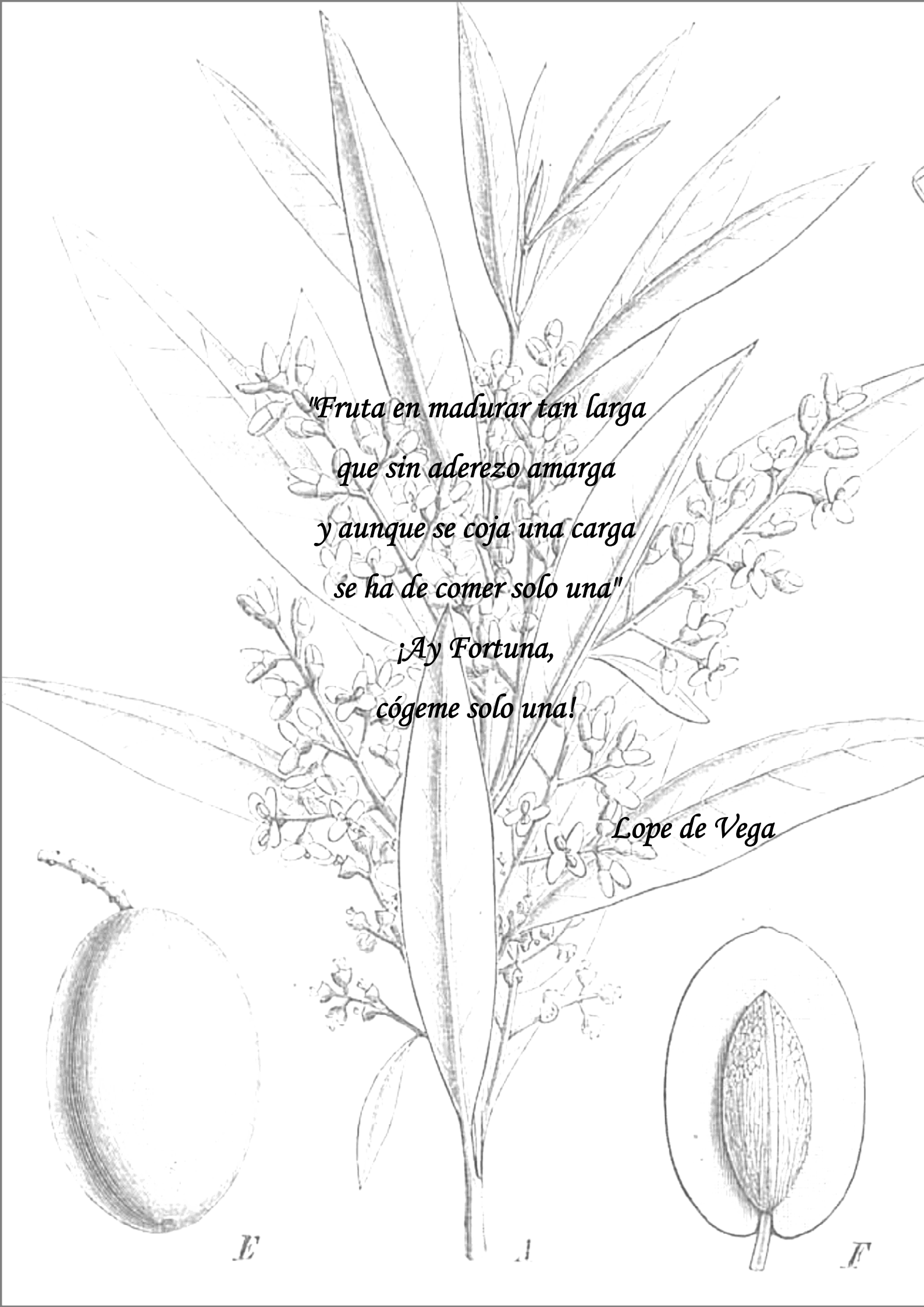
A lo largo de todos estos años, son muchas las personas a las que quiero dedicar esta Tesis.

*En primer lugar, a mis padres **Antonio y María**, por su apoyo, comprensión y cariño incondicional. Por haberme dado todo lo que soy como persona; mis valores y principios. Por haberme educado en la perseverancia y el esfuerzo y porque nunca han dejado de entenderme con tan sólo escuchar el tono de mi voz.*

*A mis hermanos **Antonio y Ana**, con los que he podido contar incondicionalmente. Y que a pesar de la distancia que nos separa los llevaré siempre en mi corazón.*

*A mi marido, **Terence**, que no ha dudado en apostar por este trabajo, y ha permanecido a mi lado, invirtiendo su tiempo y solventando cada problema y dificultades surgidas, poniendo todo su sentido del humor y alegría, con el que consigue transmitir toda la fuerza y empuje, que a veces, necesitamos para seguir adelante. Y por todas las demostraciones de amor que me ha regalado.*

*Y a mi hija **Celia**, que habiendo llegado en mitad de esta aventura, se ha convertido en la protagonista, respetando mis ausencias y con una fe ciega, digna de la mayor lección de lealtad que he recibido jamás. Por repetir conmigo fragmentos de esta tesis y hacerme reír en todo momento, con su desparpajo e inocencia. A ella se la dedico en esencia, deseándole salud y felicidad para el resto de su vida.*



*"Fruta en madurar tan larga
que sin aderezo amarga
y aunque se coja una carga
se ha de comer solo una"*

*¡Ay Fortuna,
cógeme solo una!*

Lope de Vega

E

J

F



E

A

F

Abreviaturas

A : absorbancia
aa: aminoácidos
ABA: ácido abscísico
ACC: ácido l-aminocidopropano-l-carboxílico
ACCMT: ACC-malonil transferasa
ACO: ACC oxidasa
ACS: ACC sintasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
AdoMet: S-adenosilmetionina
AFLP: polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AIB: a-amino-isobutírico
Amp: ampicilina
AOA: ácido aminooxiacético
APS: persulfato de amonio
ARN: ácido ribonucleico
ATP: adenosín trifosfato
AVG: aminoetoxivinilglicina
BE: butoxi-etanol
Br: breaker
CDTA: ácido cidohexano-diamino-tetraacético
CG: cromatógrafo de gases
CH: cidohexamida
CHA: ciclohexilamonio
CK: citokinina
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
CoCl₂ : cloruro de cobalto
CTAB: bromuro de N-cetil-trietilamina
CTNA: solución con CTAB y NaCl
CTR: triple respuesta constitutiva
DE: desviación estándar
DEPC: dietilpirocarbonato

Abreviaturas

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

DPA: días de post-antesis

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno-diamino-tetraácido

EFE: enzima formadora de etileno

EIL: semejante a EIN

EIN: insensible a etileno

EREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a etileno

ERF: factor de respuesta a etileno

ERS: sensor de la respuesta a etileno

Eto: superproductor de etileno

ETR: receptor de etileno

FA: flor abierta

FC: flor cerrada

GAs: giberelinas

GTP: guanosín trifosfato

h: hora

has: hectáreas

HEPES: ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'2-etanosulfónico

HP: Hewlett Packard

IPTG: isopropil tio-D-galactósido

kDa: kilodalton

Kb: kilobases

L: litro

LS: lámina de separación

M: molar

MACC: N-malonil ACC

Abreviaturas

MAPK: proteína kinasa activada por mitógeno

MAPKK: MAPK kinasa

MAPKKK: MAPKK kinasa

min: minutos

MGBG: metilgloxal-bis-guanilhidrazona

mL: mililitro

mM: milimolar

MOPS: ácido 3-morfolinopropanosulfónico

MTA: 5'-metil-tioadenosina

MTR: 5'-metiltioribosa

ND: no determinado

nL: nanolitros

nm: nanómetro

NO: noroeste

Nor: mutante que no madura

Nr: mutante que no madura

p/v: peso/volumen

PAs: poliaminas

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilen glicol

PF: peso fresco

pfu: unidades formadoras de fago

PK: proteína kinasa pI: punto isoeléctrico

PLP: piridoxal-5'-fosfato

poly-A': restos de adenosina unidos a OH-3'del RNAm

Put: putrescina

PVP: polivinilpirrolidona

PVPP: polívinilpolipirrolidona

RAPD: ADN polimórfico amplificado

RE: retículo endoplasmático

Abreviaturas

rin: mutante en el proceso de maduración

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

RNA_r: ácido ribonucleico ribosómico

RNA_s: ribonucleasa

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: transcripción inversa y PCR

SAM: S-adenosilmetionina

SDS: dodecil sulfato sódico

s: segundo

SNP: polimorfismo de un nucleótido simple

Spd: espermidina

Spm: espermina

SSR: repetición de secuencia simple

STS: sitios de secuencia etiquetada

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBE: Tris Borato EDTA

TE: tampón tris-EDTA

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilen-diamina

Tris: tris (hidroxirnetil)aminometano

U: unidades de enzima

v/v: relación volumen/volumen

var.: variedad

μL: microlitro

μM: micromolar

w/v: relación peso/volumen

Resumen

El objetivo de esta tesis ha consistido en buscar marcadores moleculares de la maduración del fruto de olivo, en particular, los asociados a la biosíntesis y señalización del etileno, para su utilización en la mejora de las calidades organolépticas de este fruto. Este trabajo se ha desarrollado esencialmente a nivel molecular (aislamiento y caracterización de genes), en apoyo a los estudios físico-químicos y genéticos que permitieron elegir los modelos de este estudio y determinar los criterios físicos-químicos más discriminantes de los diferentes estados de maduración. En este trabajo, se ha presentado la regulación de los perfiles de expresión de los genes que codifican a las enzimas de la ruta de biosíntesis y señalización del etileno durante el desarrollo floral y la maduración del fruto en dos variedades de olivo. Para ello, se han aislado del fruto cinco genes relacionados con el etileno (*OeACS*, *OeACO*, *OeCTR*, *OeERS* y *OeEIL*), se ha analizado su expresión en varios órganos de olivo y durante el desarrollo, y se ha determinado la interacción entre el etileno y la inducción de la expresión de estos genes.

Abstract

The objective of this thesis is to find molecular markers for ripening in the olive, in particular those associated with biosynthesis and the signalling of ethylene, for use in the improvement of the organoleptic qualities of this fruit. This work was performed essentially at the molecular level (gene isolation and characterization), in support of physico-chemical and genetic studies that would enable the choice of study models as well as the determination of the most discriminating physico-chemical criteria for the ripening states. This work presents the regulation of gene-expression profiles that codify enzymes of the biosynthesis and signalling pathway of ethylene during flower development and fruit ripening in two olive cultivars. For this, five genes related to ethylene (*OeACS*, *OeACO*, *OeCTR*, *OeERS*, and *OeEIL*) have been isolated in the fruit. Their expression has been analysed in several organs of the olive tree as well as during fruit development, and the relationship has been determined between ethylene and the induction of the expression of these genes.

Caracterización de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno en tejidos reproductivos de olivo (*Olea europaea* L.)

La **calidad del fruto** se trata de un criterio complejo con múltiples caracteres (aspecto externo e interno del fruto, sabores, aromas, textura), influenciados por las condiciones ambientales y con frecuentes relaciones antagónicas (ej. calidad y cantidad). En concreto, la calidad organoléptica del fruto está generalmente relacionada a su maduración. Por consiguiente, las investigaciones sobre la maduración de frutos tienen gran importancia para ayudar a definir las condiciones óptimas de la calidad.

El **olivo** es bien conocido por su interés agronómico, económico y además por una gran diversidad morfológica, ecofisiológica y genética. Sin embargo, pocos trabajos moleculares de calidad y maduración de frutos han sido realizados en esta especie. Por otra parte, aparte de su interés agronómico y económico, el cultivo del olivo en regiones como Extremadura tiene también gran interés ecológico, ya que es una especie que se adapta muy bien a diferentes ecosistemas mediterráneos, donde juega un importante papel en la protección del suelo de la erosión y el mantenimiento de la humedad. Debido a sus características climáticas y orográficas, Extremadura presenta microclimas muy diversos que han permitido el desarrollo de multitud de variedades autóctonas distintas.

El **objetivo general** de esta tesis fue obtener información sobre el desarrollo y la maduración del fruto en olivo. Este estudio sobre el olivo, sobre todo desde el punto de vista de las reacciones fisiológicas y moleculares de la planta que promueven la maduración del fruto, constituye un importante aporte al conocimiento básico de un proceso, muy poco estudiado en esta especie, y permite desarrollar las herramientas moleculares para mejorar los cultivos de olivo, prestando atención específica a los aspectos relevantes de la calidad del fruto para aderezo y aceite de oliva.

Para ello, en esta tesis se ha planteado el estudio de componentes de calidad implicados en la maduración del fruto del olivo (**Capítulo 2: Identificación y análisis de la expresión de genes de la biosíntesis y señalización del etileno durante el desarrollo y maduración del fruto en olivo**) y como paso previo fue abordado el estudio de la biodiversidad del olivo en la región (**Capítulo 1: Caracterización morfológica y molecular de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura**).

Caracterización de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno en tejidos reproductivos de olivo (*Olea europaea* L.)

Capítulo 1:

Caracterización morfológica y molecular de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura

Capítulo 2:

Identificación y análisis de la expresión de genes de la biosíntesis y señalización del etileno durante el desarrollo y maduración del fruto en olivo

Capítulo 1



Capítulo 1:

Caracterización morfológica y molecular de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura

Índice

Capítulo 1: Caracterización morfológica y molecular de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura.

1. 1. INTRODUCCION	1
1.1.1. EL OLIVO	1
1.1.1.1. Localización botánica y origen de <i>Olea europaea</i> L.	
1.1.1.2. El olivo en España	
1.1.1.3. El olivo en Extremadura	
1.1.2. LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL	13
1.1.2.1. Marcadores morfológicos	
1.1.2.2. Marcadores moleculares	
1.1.3. LA IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIEDADES DE OLIVO	26
1. 2. OBJETIVOS	31
1. 3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
1.3.1. MATERIAL VEGETAL	34
1.3. 2. MÉTODOS	35
1.3.2.1. Metodología adoptada para la caracterización morfológica de las variedades de olivo.	
1.3.2.2. Extracción de ADN genómico de olivo	
1.3.2.3. Obtención de marcadores ADN microsatélites	
1.3.2.4. Análisis de los datos	
1. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DEL OLIVO EN EXTREMADURA	49
1.4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA IDE LAS VARIEDADES DE OLIVO CULTIVADAS EN EXTREMADURA	53
1.4.2.1. Monografía de las variedades autóctonas de olivo de Extremadura	
1.4.2.2. Establecimiento de semejanzas y sinonimias a partir de la caracterización morfológica	
1.4.3. IDENTIFICACIÓN VARIETAL: APLICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES A VARIEDADES AUTÓCTONAS DE OLIVO DE EXTREMADURA	122
1.4.4. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OLIVO EN EXTREMADURA	130
1. 5. CONCLUSIONES	141
1. 6. BIBLIOGRAFÍA	143
1. 7. ANEXOS	157



1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. EL OLIVO

El olivo es un árbol perennifolio con hoja en forma lanceolada de 5 a 8 cm de longitud por 1 o 2 cm de anchura, cuyo color es verde azulado, algo ceniciento en el haz y plateado en el envés. La inflorescencia forma racimos que salen de las axilas de las hojas de los ramos fructíferos (ramos de un año de edad). Las flores son gamopétalas con cuatro pétalos blancos y dos anteras. El ovario posee cuatro óvulos y el estilo muy corto. En las semanas posteriores a la floración tiene lugar la caída de flores sueltas ó en pequeños grupos, de forma que el cuajado es finalmente del 1-2 %. El fruto es una drupa jugosa que contiene cantidades crecientes de aceite a medida que madura. Su forma es ovoide y llega a medir 3,5 cm de longitud; su tamaño y forma dependen de la variedad específica. El olivo es famoso por su longevidad; es una planta muy rústica capaz de adaptarse a casi todos los tipos de suelos y a climas extremadamente áridos. En terrenos fértiles y zonas con adecuada pluviometría tiene altas producciones, pero su potencial fructífero sigue siendo bajo (Lavee, 1994; Barranco et al., 2008). El desarrollo vegetativo (altura y vigor) del árbol depende, fundamentalmente, de la variedad y del medio (suelo y clima) en el que se desarrolla, pero su altura siempre está limitada artificialmente por las técnicas de cultivo (poda), que facilitan su utilización agrícola (Rodrigues, 1999; Gomez-Jimenez et al., 2006; Barranco et al., 2008).

Aunque el olivo presenta una gran plasticidad en su capacidad de adaptación, los mejores suelos para el cultivo del olivo son aquellos donde las raíces no tienen dificultad para desarrollarse en profundidad; además, es muy sensible al encharcamiento, no soportando los suelos con mal drenaje. Se adapta mejor

a suelos con pH entre 6,0 y 7,5 pero también a los ácidos y a los suelos calcáreos (Rodrigues, 1999; Barranco et al., 2008). Según Feio (1991), el olivo es el cultivo más característico del clima mediterráneo aunque en él se puedan delimitar las siguientes zonas:

- Límite debido a la humedad estival
- Límite debido al frío invernal
- Límite debido a la combinación de la humedad estival y del frío invernal
- Límite debido a la sequía
- Límite debido a la combinación del frío y a la sequía.

En la distribución del olivo se observa que las temperaturas medias del mes más cálido están comprendidas entre 22° y 30° C, y la temperatura del mes más frío es superior a 4° C. Los límites geográficos que corresponden a estas temperaturas extremas están situados en los 44° de latitud norte y una altitud de 600 metros. La temperatura durante la floración debe estar entre 21-22° C, observándose una reducción en la producción cuando aquella sobrepasa los 30° C. A temperaturas inferiores a los 0° C, el olivo empieza a presentar lesiones, las cuales son graves a -6° C y muy graves a -10° C. La floración suele ocurrir entre mayo y junio según el cultivar, luego los problemas con heladas tardías de primavera son poco probables. El olivo necesita de un cierto número de horas de frío (400-700 horas) para que ocurra la diferenciación floral (Rodrigues, 1999), pero es sensible a temperaturas demasiado bajas, como hemos indicado. El límite inferior de la precipitación según Rodrigues (1999) queda en 300-400 mm, y cerca del litoral (temperaturas suaves y elevada humedad relativa) se admite que el límite pueda bajar a los 200-250 mm. En términos generales, en regiones con precipitaciones anuales inferiores a 500 mm, uno o más riegos en el período crítico (julio-septiembre) son muy útiles para la producción. La precipitación óptima es de 800 mm anuales y valores muy por encima de este límite son desfavorables, principalmente si ocurren durante la floración (Rallo et al., 2005; Barranco et al., 2008). En resumen, el hábitat del olivo está situado entre las latitudes 30° y 45°, en el hemisferio norte y sur, en regiones climáticas del tipo mediterráneo, caracterizadas por un verano seco y caluroso e inviernos suaves.

La introducción del cultivo en otras áreas geográficas se ha visto condicionada principalmente por la existencia de condiciones climáticas similares a las mediterráneas (Barranco et al., 2008). En el Nuevo Mundo se introdujo por los misioneros en el siglo XVI, junto con la viña, y su difusión estuvo ligada a la expansión de la iglesia cristiana. No obstante, a diferencia de la vid que enseguida se extendió y proliferó en los territorios donde se introdujo, el olivo quedó confinado en zonas limitadas (Fiorino y Nizzi-Grifi,

1992). Perú y Méjico fueron las primeras zonas donde se introdujo el cultivo. Desde Perú se expandió posteriormente a otras zonas como Chile o Argentina (Prataviera, 1999). En el último tercio del siglo XIX se extendieron las plantaciones de olivos en California. Aunque se llevaron muchas variedades desde las orillas del Mediterráneo para probarlas, pocas de ellas llegaron a plantarse comercialmente. En el final del siglo XIX y empezando el XX, el cultivo del olivo se extendió a otros países y continentes: África del Sur, Australia, China, India, Japón, Paquistán, Nueva Zelanda, Nepal y Tailandia (Caballero y del Rio, 1999). En particular, en Australia se inicia la olivicultura en el siglo XIX con la introducción de más de 60 variedades de olivo (Spennemamm, 1999). Desde entonces la olivicultura australiana ha pasado por diversas etapas de más o menos éxito hasta que en los últimos años se ha hecho una fuerte apuesta por el sector.

1.1.1.1. Localización botánica y origen de *Olea europaea* L.

El olivo, *Olea europaea* L., pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, de la división Magnoliófitos, clase Magnoliatas, subclase Astéridas. Las plantas de esta familia son mayormente árboles y arbustos, a veces trepadores. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre. Esta familia está compuesta por unos 29 géneros, de los cuales muchos poseen interés agronómico como *Fraxinus* (fresno), *Jasminum* (jazmín), *Ligustrum* (aligustre), *Phillyrea* (agracejo), *Syringa* (lilo) y sobre todo *Olea* que comprende aproximadamente 600 especies (Heywood, 1978; Rallo et al., 2005; Barranco et al., 2008).

El género *Olea* engloba unas 35 especies, incluida la especie *Olea europaea* L. Dentro de esta última se encuentran todos los olivos cultivados y también los acebuches u olivos silvestres. Hay diferencias de opinión sobre cómo subclasificarlos dentro de la especie, pero generalmente se considera que los olivos cultivados pertenecen a la subespecie *sativa* y los olivos silvestres a la subespecie *sylvestris*. Por tanto, no sería semánticamente correcto denominar “variedades” a los distintos tipos de olivos cultivados sino que debería usarse el término “cultivares” (variedades obtenidas por cultivo y selección), aunque durante esta memoria se utilizaran ambos términos (Rapoport, 2001; Rallo et al., 2005; Gómez-Jiménez et al., 2006).

La especie *Olea europaea* L. a la que pertenece el olivo es una angiosperma dicotiledónea y la única especie de la familia *Oleaceae* con fruto comestible. Esta especie tiene origen híbrido; en efecto, la gran diversidad existente dentro de la especie y los estudios citogenéticos parecen indicar un origen

alopoliploide (Rallo et al., 2005; Barranco et al., 2008), es decir, pueden haberse producido cruces naturales y reorganizaciones cromosómicas entre especies afines del género *Olea*.

Existen dos hipótesis sobre el origen del olivo, una que postula que proviene de las costas de Siria, Líbano e Israel y otra que lo considera originario de Asia Menor. Se cree que ese primer olivo debió tener una forma muy parecida a la forma salvaje conocida como acebuche y cuyo nombre científico es *Olea europaea* subespecie *oleaster* (Zohary, 1994). Los restos más antiguos de olivo encontrados en España son los de “El Garcel” (Almería), que datan del Neolítico (5000 a.C.). Se cree que la domesticación del olivo y su consiguiente explotación se produjo aproximadamente a principios del Neolítico, hacia el 6000-5000 a.C., no estando la zona de origen claramente definida. Por lo que respecta al inicio del cultivo, la evidencia arqueológica más antigua se ha localizado en el yacimiento de Teleitat Ghassul, al norte del mar Muerto, durante el periodo Calcolítico (4000-3500 años a.C.). Se cree que los restos de endocarpo encontrados en los primitivos molinos de estas excavaciones (junto con granos de cereales, dátiles y leguminosas) corresponden a olivos cultivados, ya que evidencian la presencia de un fruto mayor que las aceitunas silvestres (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Además, esta región es demasiado seca como para permitir el crecimiento de olivos silvestres, por lo que dichos olivos debieron ser cultivados en condiciones de riego. Otros autores señalan que la expansión del cultivo del olivo no se produjo hasta el principio de la Edad de Bronce (2000-2600 años a.C.) (Liphschitz et al., 1991). Este estudio se basa en el examen de restos de polen, huesos y madera de olivo, junto con otros hallazgos como vajillas cerámicas, lámparas de aceite e instalaciones aceiteras encontradas en Israel. El periodo Calcolítico parece, por tanto, representar el final de un largo periodo caracterizado por la recolección de aceitunas de olivos silvestres, mientras que es sólo al principio de la Edad de Bronce cuando se inició la expansión del cultivo del olivo.

El cultivo del olivo no surgió hasta el aprendizaje de la clonación, es decir, de la multiplicación asexual o vegetativa. El olivo, junto con la vid, la higuera, la palmera datilera y el granado forman la primera oleada de domesticación de árboles frutales (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). En el caso del olivo, algunos de estos métodos de propagación (estaca, plantón, aislamiento de zuecas, garrote) han llegado a nuestros días (Caballero y del Río, 1999; Rallo et al., 2005).

Posiblemente a principios del primer milenio a. C. el olivo fue introducido en la Península Ibérica por griegos y fenicios; los romanos expandieron su cultivo y mejoraron las técnicas de producción de aceite (Zohary y Hopf, 1994). Así, en Andalucía la introducción del cultivo del olivo se produce hacia el siglo X a. C., a raíz de que los fenicios establecieran sus primeras factorías cerca de la desembocadura del

Guadalquivir (Angles, 1999). Hacia el siglo II d. C., el cultivo del olivo alcanza su mayor esplendor dentro del Imperio romano. En la época romana el sur de España fue una zona de gran producción y comercio del aceite de oliva, situación que continuó durante la dominación islámica (Comet, 1996). El reflejo de este origen se encuentra en la etimología de las palabras relacionadas con el mundo del olivo y el aceite: el vocablo “olivo” deriva del latín “olivum”, un derivado de “olea” que a su vez deriva del vocablo griego “elaia” (=grasa, aceite). Por su parte, aceite y aceituna derivan del árabe “az-zait” (jugo de aceituna) y “zaitum” que provienen del hebreo “zait” (aceituna).

1.1.1.2. El olivo en España

El olivo representa un elemento fundamental en la Historia de las civilizaciones mediterráneas. Posee una gran importancia económica, esencialmente debida a sus frutos de los cuales se extrae el aceite, y a su madera. Hoy la superficie mundial dedicada al cultivo del olivo es de 7,5 millones de has, de las cuales 3,5 corresponden a Europa (FAO, 2005).

En España se dedica 2,28 millones de has al cultivo del olivo (Barranco et al., 2008); lo que supone el 39% de la producción mundial de aceite de oliva y el 30% de la producción mundial de aceituna de mesa, siendo el primer país productor del mundo de aceite de oliva y aceituna de mesa. Al igual que en otros muchos países olivareros, el material vegetal del olivo cultivado en España está constituido por un gran número de variedades, todas ellas muy antiguas y cuya difusión está restringida en torno a su posible lugar de origen. Además, estas variedades aparecen con denominaciones diferentes en las distintas zonas donde se cultivan y, en ocasiones, se aplica la misma denominación a variedades distintas. Este confusionismo representa la mayor dificultad de los trabajos de catalogación varietal, por lo que es necesario disponer de algún sistema de identificación para establecer las sinonimias, las homonimias y delimitar el área de cultivo real de cada variedad.

a) *Las principales variedades de olivo*

A nivel mundial se han encontrado más de 1275 variedades de olivo cultivadas; la mayoría las cuales se han identificado en países europeos meridionales, incluyendo 538 en Italia, 88 en Francia, y 52 en Grecia (Sarri et al., 2006; Ipec et al., 2009). En España se han encontrado 272 variedades cultivadas de olivo (Rallo et al., 2005; Barranco et al., 2008). De las cuales 24 son consideradas como principales,

entendiendo por variedades principales aquéllas que son base de plantaciones y su superficie plantada es la dominante en alguna comarca teniendo importancia a nivel nacional.

Tabla 1.1. Destino, importancia y difusión de las principales variedades de olivo cultivadas en España. (*) 1000 has. Fuente: Barranco et al. (2008).

Variedad	Destino	Superficie*	Difusión
“Picual”	Aceite	860	Jaén,Córdoba,Granada, resto España
“Cornicabra”	Aceite	269	Ciudad Real, Toledo
“Hojiblanca”	Aceite-Mesa	217	Córdoba,Málaga,Sevilla
“Manzanilla de Sevilla”	Mesa	85	Sevilla,Badajoz,resto España
“Arbequina”	Aceite	71	Lérida,Tarragona,resto España
“Morisca”	Aceite	74	Badajoz
“Empeltre”	Aceite	72	Zaragoza, Teruel, Baleares
“Manzanilla Cacereña”	Aceite-Mesa	64	Cáceres, Salamanca
“Lechín de Sevilla”	Aceite	105	Sevilla, Cádiz
“Picudo”	Aceite	60	Córdoba, Granada
“Lechín de Granada”	Aceite	36	Granada,Almería,Murcia
“Verdial de Badajoz”	Aceite	29	Badajoz, Cáceres
“Morut”	Aceite	28	Tarragona, Castellón
“Sevillenca”	Aceite	25	Tarragona, Castellón
“Villalonga”	Aceite	24	Valencia
“Castellana”	Aceite	22	Guadalajara, Cuenca
“Farga”	Aceite	45	Castellón, Tarragona
“Verdial de Huelva”	Aceite	34	Huelva, Sevilla
“Blanqueta”	Aceite	17	Alicante, Valencia
“Gordal Sevillana”	Mesa	30	Sevilla
“Verdial de Vélez-Málaga”	Aceite	20	Málaga
“Aloreña”	Aceite-Mesa	17	Málaga
“Chaglot Real”	Aceite	5	Valencia
“Alfajara”	Aceite	4	Valencia, Albacete
Otras	---	67	---
Total España	---	2.280	---

La Tabla 1.1 recoge el destino, la importancia superficial y las provincias donde se difunden las 24 variedades principales cultivadas en España. Además 24 variedades han alcanzado la categoría de variedad secundaria (aquella que es base de plantaciones regulares pero no llega a ser dominante en ninguna comarca y no tiene importancia a nivel nacional), 50 de variedad difundida (aquella localizada en varias comarcas, pero con escasa importancia superficial) y 174 se incluyen en la categoría de variedades locales (Rallo et al., 2005). La Fig. 1.1 representa la distribución geográfica de las variedades de olivo dominantes en España.

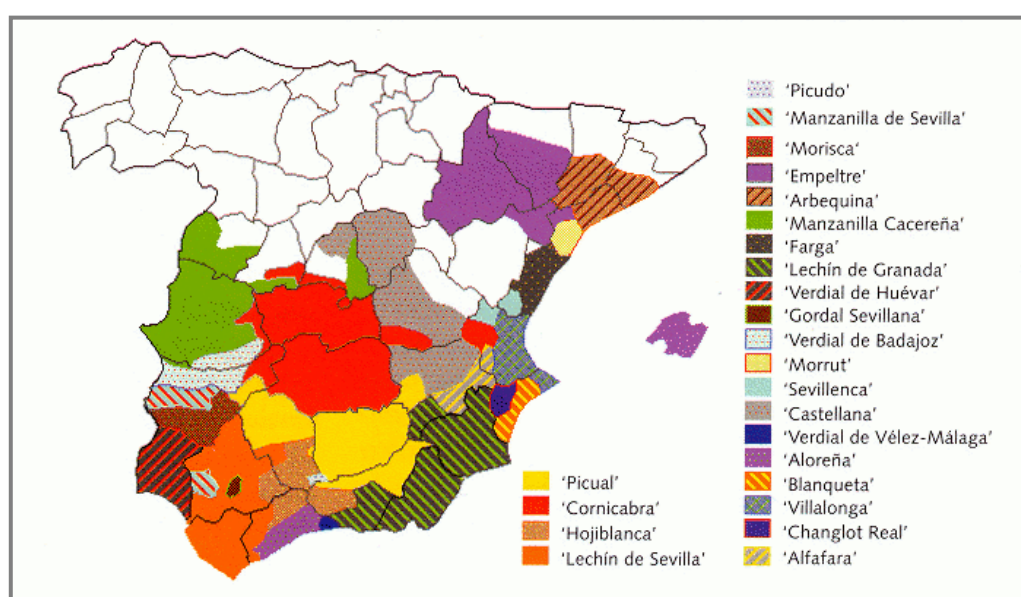


Fig. 1.1. Distribución geográfica de las variedades de olivo dominantes en España. Fuente: Rallo et al. (2005).

Esta diversidad se debe probablemente al origen autóctono de las variedades, surgida de la probable selección de materiales diferentes en cada zona y de su restringida difusión en torno a la misma. La antigüedad de las variedades de olivo actuales se remonta al inicio del cultivo en nuestro país y otra característica del material vegetal es el confinamiento de las variedades.

Normalmente, incluso las variedades con mayor extensión superficial, presentan una zona de mayor concentración a partir de la cual su influencia decae rápidamente, desapareciendo su cultivo en comarcas relativamente próximas. Por otro lado, un gran número de variedades no se han extendido fuera de los límites de una comarca.

b) *El aceite de oliva*

El aceite de oliva es importante para disfrutar de una dieta saludable, y este reconocimiento de sus grandes valores nutricionales ha hecho posible que aumente la comercialización del mismo en todo el mundo.

La calidad del aceite de oliva es un parámetro difícil de valorar, ya que existe una gran cantidad de factores que le afectan, empezando por el tratamiento que reciben las aceitunas, desde la recolección y selección del fruto, hasta el método de extracción y las condiciones de almacenamiento de los aceites obtenidos. Ni la poda, ni la fertilización ejercen un papel importante sobre la calidad de los aceites obtenidos. El riego, que no tiene un papel importante sobre los índices físico-químicos de la calidad reglamentada del aceite, sí incide en el contenido en polifenoles de los aceites. Un alto contenido en compuestos fenólicos origina aceites con un sabor más amargo; por esta razón los aceites procedentes de secano, al poseer mayor contenido en polifenoles, son más amargos que los aceites de regadío. Los tratamientos fitosanitarios son decisivos para la obtención de aceites de calidad evitando diversas infecciones que podrían atacar al fruto disminuyendo sus características organolépticas y aumentando su acidez final. Así, el hongo *Gloesporium olivarum* Alm., conocido como aceituna jabonosa, actúa directamente en la calidad. El efecto principal de este hongo sobre el olivo es la podredumbre de las aceitunas, asociada con una notable pérdida de peso y su caída prematura, lo que origina aceitunas de elevada acidez y muy baja calidad ("aceites rojizos") (Trapero y Blanco, 1998). La recolección de la aceituna tiene una gran importancia en los costes de producción y, consecuentemente, en la economía de la explotación olivarera. Pero además, ejerce un papel muy importante sobre la calidad del aceite obtenido. En lo que respecta a la recolección, tres son los aspectos a considerar para obtener un aceite de buena calidad: la época del año, la procedencia del fruto y la forma de recolectarlo para que el fruto no sufra ningún tipo de desperfecto. La época de recolección tiene una marcada influencia en la composición de los aceites y en las características sensoriales de los mismos. Así, a lo largo del proceso de maduración, una vez acabada la lipogénesis o proceso de formación del aceite, se producen cambios en la composición de ácidos grasos. Estos cambios consisten, en líneas generales, en un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados, concretamente un aumento del ácido graso linoleico, manteniendo el contenido en ácido oleico. También se produce una disminución del porcentaje de ácidos grasos saturados. Todo ello conduce a una disminución en la relación ácido graso mono-insaturado/ácido graso poli-insaturado (Uceda et al., 1994). El contenido en polifenoles también cambia a lo largo de la maduración, llegando a un máximo que generalmente coincide con el momento en que se alcanza la máxima cantidad de aceite en el fruto. Este máximo tiene lugar aproximadamente en la misma fecha en

cultivares distintos, aunque corresponde a estados de madurez diferentes en los mismos. Las modificaciones en el contenido en polifenoles totales inciden, además de sobre la estabilidad del aceite, sobre las características sensoriales de los aceites que tienen aromas cada vez más apagados y dulzones. Un retraso en la época de recolección da lugar a aceites menos fragantes, más apagados, menos amargos y con sensación de mayor suavidad, siempre que el fruto procesado esté sano y proceda del árbol (Uceda y Hermoso, 1998). Un hecho inherente al retraso de la recolección es la aparición de caída natural del fruto, más o menos acusada según la variedad. El fruto en el suelo sufre una serie de alteraciones, esencialmente la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres de los triglicéridos, que deterioran la calidad de los aceites obtenidos al aumentar los ácidos grasos libres y el contenido de glicerol. Así, se ha observado reiteradamente una mayor acidez al retrasar la fecha de recolección y aumentar la proporción de frutos caídos y su periodo de permanencia en el suelo.

Las características edafoclimáticas tienen una incidencia en general pequeña sobre la composición ácida de los aceites de un mismo cultivar. Sin embargo, estas mismas características presentan una clara influencia sobre la fracción insaponificable, sobre todo en el contenido en polifenoles, obteniéndose aceites con características sensoriales diferentes ya que los polifenoles son, en parte, responsables del amargor de estos (Uceda y Hermoso, 1998). Los polifenoles intervienen de forma significativa en la estabilidad y calidad del aceite de oliva virgen, habiéndose observado una correlación entre el contenido de éstos y la estabilidad (Vázquez Roncero et al., 1975; Gutiérrez González-Quijano et al., 1977; Vergari et al., 1996). Algunos autores (Tous y Romero, 1993) han utilizado los parámetros de variación de la composición ácida y de la variación del contenido en polifenoles para identificar varietalmente algunos aceites, como por ejemplo los aceites procedentes de la variedad picual. Esta variedad produce aceites muy estables debido a su alto contenido en compuestos fenólicos; su alto contenido en ácidos oleico y bajo contenido en ácido linolénico hace que sean aceites muy resistentes a la oxidación, sin embargo todas estas cualidades se ven mermadas debido a que su alto porcentaje de polifenoles produce aceites muy amargos.

Desde la década de los ochenta se ha avanzado progresiva y continuamente en España en el conocimiento de las características oleotécnicas de las variedades. La variabilidad existente se realiza atendiendo a diversas medidas relativas al rendimiento graso, a la composición y a la caracterización sensorial de los aceites varietales correspondientes. La composición en ácidos grasos es factor clave de la calidad nutricional del aceite de oliva, por su elevado contenido en ácido oleico, como por su equilibrio entre ácidos grasos mono y poliinsaturados. Ambas características confieren al aceite de oliva la

capacidad de controlar el nivel de colesterol total y aumentar la proporción del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad), lo que resulta fundamental en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

La evaluación de las características agronómicas y oleotécnicas de las variedades de olivo evidencia el gran legado de variabilidad que ha proporcionado la selección empírica llevada a cabo por el agricultor. La conservación de las variedades y su valoración mediante una evaluación sistemática en las colecciones existentes en el mundo debe proporcionar una información imprescindible y valiosísima. Este conocimiento contribuirá a superar las limitaciones actuales en la estructura varietal del olivo, tanto por la generalización de ensayos comparativos en las distintas regiones oleícolas, como por el establecimiento de programas de mejora genética en los principales países productores.

1.1.1.3. El olivo en Extremadura

En Extremadura, la superficie real estimada es de \approx 238 000 has (76 000 has en Cáceres y 162 000 has en Badajoz), que supone casi el 12% de la superficie nacional de olivar, siendo la tercera Comunidad Autónoma en orden a su superficie de olivar y superada sólo por Andalucía y Castilla la Mancha. La densidad media de las plantaciones extremeñas en producción, según se deriva de las declaraciones de olivar, es de 107,4 olivos/ha. La gran superficie ocupada por el olivar, un cultivo que tradicionalmente ha recibido escasos tratamientos fitosanitarios y fertilizantes, es suficiente para comprender el valor ecológico del cultivo. Es especialmente importante su presencia en terrenos con pendiente, y otros de escasa calidad cuyo aprovechamiento sería difícil si no fuera por medio de los olivos ya implantados en él (Fig. 1.2).



Fig. 1.2. Árboles de olivo en Extremadura. Olivar en Badajoz (a la izquierda) y en Cáceres (a la derecha).

Muchos olivos, especialmente los serranos, vienen constituyendo casi un paisaje natural por su antigüedad e integración en el medio, un verdadero ejemplo de cultivo tradicional que conforma un agroecosistema estable. Por otra parte, en multitud de parajes el olivar se haya limitado por antiguas separaciones de cercados en piedra, así como implantado sobre terrazas y pequeños bancales sostenidos, en ocasiones, por imponentes muros de piedra o albarradas de gran belleza. Todo ello confiere a estos olivares un verdadero valor artístico que forma parte del patrimonio cultural del campo extremeño.

En Extremadura, si se considera en su conjunto todas las dimensiones del subsector agroindustrial olivarero, se concluye que estamos ante un cultivo de capital importancia dentro de la agricultura de esta región, convirtiéndose en el segundo cultivo que mayores ingresos aporta después del tabaco. Extremadura tiene una producción de aceite y aceituna de mesa importante basada principalmente en los cultivos de 8 variedades:

- “Carrasqueña”, “Morisca”, “Cornicabra o Cornezuelo”, “Manzanilla”, “Verdial” y “Pico Limón” en la provincia de Badajoz;
- “Manzanilla Cacereña”, “Cornicabra o Cornezuelo”, “Verdial” y “Cordovíl”, en la provincia de Cáceres.

a) *Comarcas olivareras*

En los Inventarios agronómicos del olivar se dividió el olivar regional en 12 Comarcas oleícolas u olivareras, 7 en Badajoz y 5 en Cáceres (Figs. 1.3, 1.4). En Badajoz se atendió a peculiaridades del clima, suelo, geología, que influyen también en el olivar, junto con las costumbres y tradiciones de la comarca. En Cáceres, por su parte, se optó por una división geográfica, atendiendo a la importancia del cultivo del olivo en las mismas. Sin embargo, por razones agronómicas y ecológicas, algunas de ellas se han subdividido en subcomarcas.

La provincia de Badajoz se divide en las comarcas de Alburquerque, Los Barros (dividida en las subcomarcas Barros y Olivenza), Llerena, Jerez, La Serena, La Siberia y Vegas del Guadiana. Por su parte en Cáceres se encuentran las comarcas de La Vera (engloba tres subcomarcas: Valle del Ambroz, Valle del Jerte y La Vera), Gata-Hurdes, Ibores, Montánchez-Guadalupe (con las subcomarcas Montánchez, Miajadas-Madrigalejo, Montánchez-Guadalupe y Guadalupe) y Resto de Cáceres.

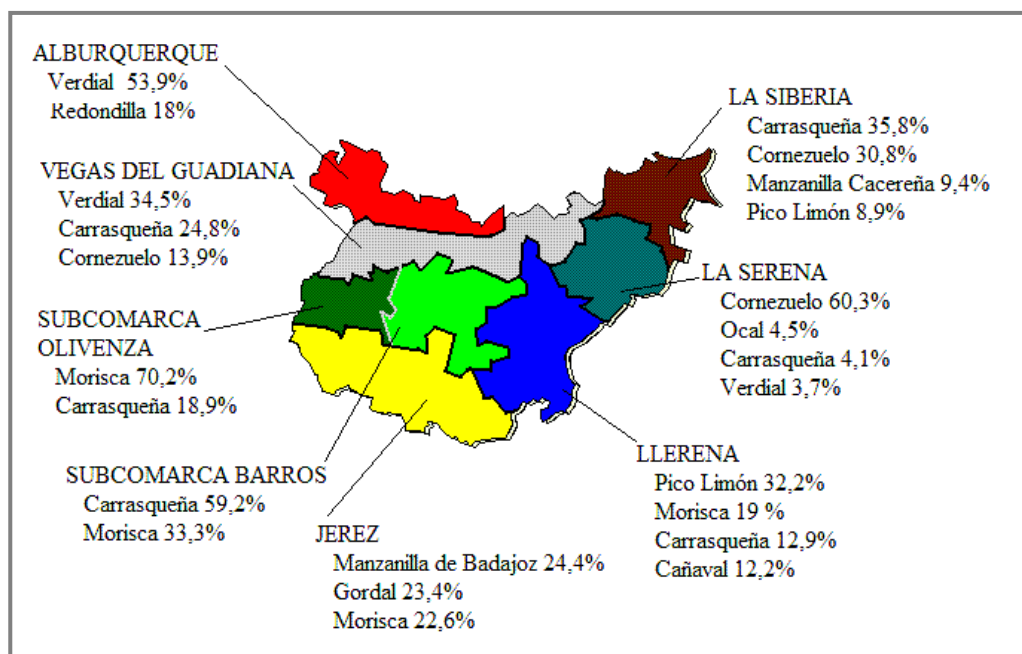


Fig. 1.3. Variedades predominantes de las comarcas y subcomarcas olivareras de Badajoz. Fuente: Informe sobre el sector del olivar, del aceite de oliva y de la aceituna de mesa en Extremadura. Consejería de Agricultura y Comercio de la Junta de Extremadura.

La particularidad de las comarcas olivareras, localizadas dentro de un espacio geográfico relativamente pequeño, confiere al olivar de la región una riqueza especialmente aprovechable. Riqueza sobresaliente sobre todo en lo relativo a la diversidad del material vegetal, con múltiples variedades aceiteras y, especialmente, por la importante superficie de las tres variedades españolas de mejor calidad para el aderezo: la “Carrasqueña”, “Gordal” y “Manzanilla Cacereña”. También destacar la calidad de otras variedades, como la “Morisca”, para la obtención de “aceitunas machadas” aderezadas tradicionalmente.

b) *Variedades predominantes*

En Extremadura se han declarado un total de 91 denominaciones, aunque el número de variedades es menor por la multitud de sinonimias y homonimias existentes. En cuanto a las variedades, son mayoritarias las autóctonas: “Verdial de Badajoz” y “Morisca” en Badajoz y “Manzanilla Cacereña” en Cáceres. Junto a éstas, son de destacar variedades más típicas de otras regiones en zonas olivareras

extremeñas próximas a las mismas, así: “Cornezuelo” (sinonimia de “Cornicabra” y “Corniche”) en Ibores (Cáceres) y La Siberia (Badajoz), “Carrasqueña” en Barros (Badajoz), “Picual” en La Serena (Badajoz), “Pico Limón” en Llerena y “Gordal” en Jerez (Badajoz). En las Figs. 1.3 y 1.4 se muestran las variedades predominantes de olivo en las provincias de Badajoz y Cáceres. En resumen, las variedades predominantes en Badajoz, ordenadas de mayor a menor número, son “Carrasqueña”, “Morisca”, “Cornezuelo”, “Verdial” y “Pico Limón” (Fig. 1.3). Por otra parte, en Cáceres tenemos como variedades principales: “Manzanilla Cacereña”, “Cornezuelo”, “Verdial” y “Cordovil” (Fig. 1.4).

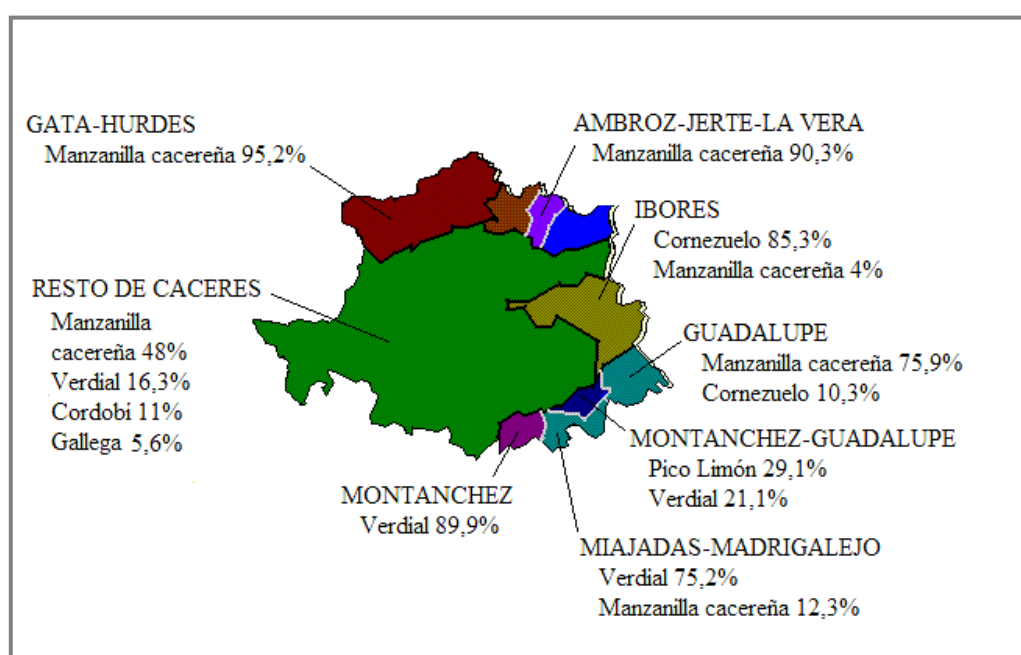


Fig. 1.4. Variedades predominantes de las comarcas y subcomarcas olivereras de Cáceres. Fuente: Informe sobre el sector del olivar, del aceite de oliva y de la aceituna de mesa en Extremadura. Consejería de Agricultura y Comercio de la Junta de Extremadura.

1.1.2. LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL

El conocimiento del patrimonio varietal es indispensable para la mejora de las especies puesto que representa su materia prima. Para poder obtener una nueva variedad a partir de cruces entre cultivares se debe arrancar de su punto de partida: la biodiversidad existente. Por tanto, la conservación y el estudio de los recursos genéticos son necesarios no sólo para salvaguardar el patrimonio genético, sino también

para llevar a cabo estudios de mejora y selección varietal. Esta necesidad de estudiar y conservar los recursos genéticos del olivo ha sido ampliamente señalada por diferentes autores (Rallo, 1986; Fontanazza y Baldoni, 1990; Lavee, 1990; Barranco et al., 2008). Esta variabilidad, o "polimorfismo" genético, ocurre de forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos sirve entonces como una "etiqueta" o "marcador genético" que se convertirá en un rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos.

Los marcadores más antiguos, y más ampliamente utilizados, son aquellos basados en caracteres morfológicos. En el caso particular de las plantas, los marcadores morfológicos heredables se han empleado desde que el hombre practica la agricultura y ha seleccionado individuos con las características que forman la base de la fitomejora de una variedad en base a una propiedad agronómica específica.

Para la identificación, ha de tenerse en cuenta que una variedad puede considerarse como tal, siempre que reúna las tres características que se engloba en el "test DUE" (*DUS test*), es decir, que sea Distinta, con diferencias definidas y concretas que pueden observarse de uno u otro modo; Uniforme, con una homogeneidad tal que los distintos individuos se puedan considerar como pertenecientes a ella; y Estable, es decir que las características que posee se transmitan a los descendientes sin variación.

Según Belaj (1998) podemos usar como marcador:

- un carácter fenotípico heredable, que es el efecto directo de un gen fácilmente observable en los individuos. Estos marcadores son genéricamente conocidos como caracteres morfológicos,
- marcadores moleculares: marcadores bioquímicos (isoenzimas) que pueden extraerse y observarse con facilidad, generalmente tras un fraccionamiento mediante electroforesis, y marcadores de ADN que pueden obtenerse o identificarse por toda una serie de técnicas moleculares.

Interesa que los marcadores moleculares reúnan, en la medida de lo posible, una serie de características que les haga útiles para el objetivo que se pretende. Se señalan como más importantes las siguientes: alto polimorfismo, codominancia, amplia distribución en el genoma, comportamiento neutro, sencillez, objetividad y repetitividad (Nuez y Carrillo, 2000). Las dos últimas características señaladas, en la medida en que se cumplan, harán que los resultados de distintos laboratorios sean compatibles, que es uno de

los fines que se pretenden en los estudios de identificación varietal. Los marcadores moleculares, especialmente aquellos basados en el ADN, son los únicos que cumplen con todas estas características.

1.1.2.1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos o fenotípicos corresponden a rasgos visuales, encontrándose de forma natural o como resultado de un proceso de mutagénesis. Fueron los primeros marcadores que se usaron en la mejora genética vegetal (Sfax, 1923) ya que su detección es rápida y sencilla, y además no precisan de tecnologías complejas ni equipamientos complicados. Se utilizan preferentemente caracteres que, controlados por un solo gen, mostraran un fenotipo constante en diferentes ambientes.

Los marcadores morfológicos pueden ser de naturaleza dominante o recesiva, por lo que se expresan en forma de presencia/ausencia (Lefebvre y Chèvre, 1995). Aunque a primera vista parecen tener un gran potencial y ser de utilidad, su empleo se ve limitado por diversas razones. En primer lugar, el número de marcadores morfológicos que se han encontrado en las especies cultivadas es reducido (Kelly, 1995; Tatineni et al., 1996), y a menudo se ven influenciados por factores ambientales, por el estado de desarrollo de la planta (Pillay y Kenny, 1996) y por interacciones epistáticas o pleiotrópicas (Kumar, 1999). Además, los marcadores morfológicos pueden corresponder a genes con efectos deletéreos y presentar dificultades para seleccionar múltiples rasgos morfológicos mutados dentro de una población segregante (Kelly, 1995; Staub y cols., 1997).

A pesar de estas limitaciones podemos encontrar en la bibliografía algunos marcadores morfológicos ligados a genes de interés en la mejora genética vegetal (Robinson et al., 1970). En olivo, los descriptores primarios o morfológicos están basados esencialmente sobre la variabilidad de caracteres de hojas y de frutos. Los primeros olivicultores seleccionaron en los bosques de acebuche aquellos individuos que sobresalían por algunas de sus características. En el caso del olivo, los silvestres difieren de los cultivados principalmente por sus frutos más pequeños, menor proporción de mesocarpo y menor contenido graso (Zohary, 1994). Con la difusión del cultivo, la reiteración de este procedimiento debió originar las primeras variedades cultivadas a ambas orillas del Mediterráneo. Además, los primeros cultivares se fueron enriqueciendo con la aportación de nuevos genes (introgresión) de las poblaciones locales de acebuche, dada la interfertilidad conocida entre ambos. De esta manera se originó una gran diversidad de variedades autóctonas, productos del azar y de difusión generalmente restringida (Rallo, 1995; Barranco et al., 2008). Ya en tiempos de los romanos se hace mención de variedades de olivo que

presentaban caracteres agronómicos interesantes. Algunos autores como Plinio, Colmuela o Macrobio, citan entre 10 y 15 variedades diferentes (Prevost y Mostardini, 1999). No obstante es muy difícil establecer una correspondencia entre los antiguos cultivares y las que se cultivan actualmente, debido a la falta de precisión en las descripciones, la dificultad en identificar la denominación exacta de las variedades descritas en dialecto y la imprecisión en la correspondencia entre las actuales regiones con las mencionadas en las obras antiguas. Muchos autores introducen la biometría en algunos de los distintos caracteres morfológicos: caracteres de endocarpo, fruto y hoja (Ruby, 1917; Bobone, 1933), caracteres del porte del árbol, ramas principales, ramas secundarias, hoja, inflorescencia, fruto, endocarpo, semilla, relación pulpa/endocarpo y caracteres agronómicos, industriales y comerciales (Priego, 1935; Rallo et al., 2005), y también caracteres agronómicos, árbol, drupa, endocarpo y semilla (Frezzotti, 1928; Gomez-Jimenez et al., 2006). Las limitaciones de este método pueden resumirse en el elevado grado de fluctuación y en la escasa capacidad de discriminación de muchos de los caracteres utilizados (Baldini y Scaramuzzi, 1957).

En las variedades para aceituna de mesa es de especial importancia la selección de caracteres como el tamaño del fruto y la relación pulpa/endocarpo, además de muchos otros caracteres como el contenido de azúcares, textura de pulpa, resistencia a magulladuras, etc. (Garrido-Fernández y Romero-Barranco, 1999).

En la actualidad, la estructura varietal del olivo, en general en los principales productores, se caracteriza por un elevado número de variedades, normalmente muy antiguas y confinadas en torno a su presunta área de origen (Barranco y Rallo, 2000; Rallo et al., 2005; Gomez-Jimenez et al., 2006). Se han realizado estudios acerca de la estructura varietal de olivo en la mayoría de países olivareros, aunque todavía no se conoce con exactitud el número de variedades que se usan y su distribución. La denominación de las variedades añade un elemento más de confusión. La mayoría de las variedades, sobre todo las más importantes, se conocen con diferentes nombres según la zona de cultivo (sinonimias). En otros casos se da un mismo nombre a variedades que en realidad son diferentes (homonimias). En algunos casos se ha empleado el término 'variedad población' para designar fenotipos muy distintos que coinciden en el nombre. El empleo de este tipo de criterios ha conducido a una notable confusión de denominaciones (Rallo, et al., 2005). Una buena prueba de ello es la existencia en las actuales colecciones de olivo de unas 1200 variedades autóctonas con más de 3000 denominaciones (Bartolini et al., 1998; Rallo et al., 2005).

1.1.2.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares revelan polimorfismos a nivel de proteínas (marcadores bioquímicos), o de secuencias de ADN (marcadores de ADN). A diferencia de los marcadores morfológicos, su manifestación no depende del resultado de la interacción de un genotipo con un ambiente determinado (Lefebvre y Chevre, 1995; Kelly, 1995), sino que por el contrario son independientes de éste, especialmente los obtenidos utilizando como material el propio ADN. El número de marcadores moleculares que potencialmente se pueden detectar con las técnicas actuales, se encuentra tan sólo limitado por la cantidad de polimorfismos existentes en los genomas analizados (Young, 1999; García-Mas et al., 2000).

a) *Marcadores bioquímicos*

Como marcadores bioquímicos se consideran a las proteínas o formas isoenzimáticas procedentes de la expresión de los distintos alelos de uno o varios genes. Su detección normalmente requiere de electroforesis en geles de almidón o similares, para identificar los alelos. Las isoenzimas son proteínas que catalizan una misma reacción bioquímica específica y que muestran una migración electroforética diferente en función de su carga y peso molecular (Lefebvre y Chevre, 1995; Vázquez et al., 2000). Normalmente, se trata de marcadores de naturaleza codominante, lo cual resulta interesante aunque son pocas aquellas isoenzimas que se han encontrado ligadas a genes de importancia agronómica (Arús y Moreno-González, 1993; Lefebvre y de Chevre, 1995) tal vez porque están sujetas a modificaciones post-transcripcionales que a menudo restringen su utilidad (Staub y Serquen, 1996).

b) *Marcadores de ADN*

La aparición de los marcadores moleculares de ADN ha ayudado a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo (Claros et al., 2000). Los marcadores moleculares de ADN son biomoléculas del genoma que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas utilizadas como marcadores moleculares de ADN son genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida. Se dice que un marcador es monomórfico cuando es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, secuencia, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. Los avances en la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN,

consiguiendo estabilidad y claridad en la identificación de especies y variedades. Las ventajas de estos marcadores en relación con los morfológicos y isoenzimáticos son: detectan mayor variabilidad (con lo cual es más fácil encontrar diferencias), no son afectados por el ambiente, y es fácil extraer ADN de cualquier tejido.

Los marcadores de ADN pueden ser clasificados según la técnica bioquímica en la que se basan: hibridación o amplificación (PCR).

Marcadores de Hibridación

* *RFLP*:

Los marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* = Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) fueron los primeros marcadores de ADN (Botstein et al., 1980). Los RFLP o polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción representan marcadores moleculares que detectan variaciones en el tamaño de fragmentos de ADN motivados por cambios mutacionales en los sitios de restricción para endonucleasas (Botstein y col., 1980; Tanksley y col., 1989). Por tanto, con estos marcadores se detectan cambios en la secuencia nucleotídica de los genomas, lo que significa una mayor capacidad de observar alelos distintos. Además los RFLP se caracterizan por ser marcadores codominantes y muy estables molecularmente (Lefebvre y Chevre, 1995; García-Mas et al., 2000).

Las ventajas más importantes de este método son: dispone de un número ilimitado de marcadores, alto-medio polimorfismo codominante y alta repetitividad (Ortiz et al., 2000). Mientras que los inconvenientes son: técnica de complejidad elevada, que necesita personal cualificado y requiere trabajar con radioactividad, así como su elevado coste (Ortiz et al., 2000). Aún así, estos marcadores se han utilizado en multitud de trabajos, tanto para identificar ligamientos a genes de interés agronómico (Tanksley et al., 1989; Rojas-Barros y col., 2008), como el caso de marcadores ligados a genes que confieren resistencias a enfermedades o patógenos (Gebhardt et al., 1993), a genes relacionados con el tipo sexual (Salman-Mikov et al., 2008) en estudios de variabilidad genética (Dos Santos et al., 1994) y en la elaboración de mapas genéticos (Tanksley et al., 1989; Gonzalo et al., 2005).

Marcadores de Amplificación

***AFLP:**

Los marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* = Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción amplificados) pueden aplicarse a todo el genoma de las procariontas y eucariontas (Zabeau, 1993; Vos et al., 1995). La técnica consiste en la digestión del ADN genómico del individuo con dos enzimas de restricción, y el empleo de adaptadores específicos que se unen a los terminales de los fragmentos del ADN que ha sido digerido. Mediante PCR se amplifican estos fragmentos de ADN y se realiza la electroforesis en gel de alta resolución para la visualización de los fragmentos generados. La principal ventaja es el gran número de fragmentos que son generados y detectados en un único gel. Sin embargo, es una técnica de complejidad elevada y no son codominantes (Ortiz et al., 2000).

Estos marcadores han sido empleados en gran número de estudios, tanto para la detección de marcadores ligados a genes que confieren resistencias a enfermedades o patógenos (Nishi et al., 2003; De Giovanni et al., 2004), o que determinan el tipo sexual en plantas (Ke et al., 2005), como en la elaboración de mapas genéticos y en la determinación de relaciones genéticas entre genotipos de la misma o distintas especies (Althoff et al., 2007; van Berloo et al., 2008).

Similares a los AFLP son los marcadores SAMPL (*Selective Amplification of Polymorphic Loci* = Amplificación selectiva de loci polimórficos de microsátelites), en los cuales se realiza un proceso de digestión igual que en los AFLP, pero en las amplificaciones posteriores se usa un cebador complementario a uno de los adaptadores ligados y una secuencia complementaria a un microsátélite (Tseng y col., 2002).

***RAPD:**

Los marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* = ADN polimórfico amplificado al azar) se basan en el principio de la PCR utilizando cebadores arbitrarios o semiarbitrarios (Williams et al., 1990). Según estos investigadores los RAPDs revelan un alto polimorfismo en los fragmentos de ADN de todo el genoma (incluyendo regiones de ADN repetitivo), utilizando cebadores elegidos en las reacciones de amplificación. Son marcadores basados en la amplificación de ADN, que no requieren conocimiento de la secuencia del ADN ni de la selección laboriosa de sondas. Sin embargo, no son codominantes y es de baja repetitividad (lo que hace difícil la comparación de resultados entre laboratorios) (Ortiz et al., 2000).

Entre las ventajas que aportan estos marcadores destacan el empleo de cebadores universales que pueden ser analizados en gran número y en un corto período de tiempo, al no requerir hibridaciones o sondas de ADN y sí una pequeña cantidad de ADN extraído por métodos simples y rápidos (Williams et al., 1990; Kelly, 1995; Cheng et al., 1997). Los RAPD han sido ampliamente usados para la construcción de mapas (Silverstain et al., 2003) y en el análisis de relaciones filogenéticas (Juchum et al., 2007; Venkatachalam et al., 2008).

***DAF:**

Los marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting* = Impresión de la “huella genética” por amplificación del ADN) implican el uso de cebadores arbitrarios y cortos (5 nucleótidos), reduciendo de esta manera la exactitud de la hibridación cebador - molde de ADN. Por otro lado, el uso de cebadores tan cortos lleva a la obtención de un alto número de productos de amplificación lo que dificulta su interpretación e implica su posterior visualización a través de las técnicas de tinción con nitrato de plata (He y Prakash, 1997).

***AP-PCR:**

Los marcadores AP-PCR (*Arbitrary Polynucleotides – PCR* = PCR con oligonucleótidos arbitrarios; Welsh y McClelland, 1990) se tratan de una técnica basada en los mismos criterios de los RAPDs, (amplificaciones al azar en el genoma), aunque se cambia el diseño de los oligonucleótidos y el tipo de PCR. Los oligonucleótidos han de ser largos (no menos de 20 pb), y la PCR consta de dos ciclos de baja astringencia (poco rigurosa) que permiten la polimerización de una batería de fragmentos característicos de cada variedad.

***STS:**

El siguiente grupo de técnica STS (*Sequence Tagged Sites* = Sitios etiquetados por la secuencia; Olson et al., 1989) aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente.

***EST:**

Esta técnica EST (*Expresión Sites Tagging* = Etiquetado de sitios, o lugares de expresión; Adams et al., 1991) emplea oligonucleótidos que se han deducido a partir de ADNc parcial o completamente

secuenciado. En este tipo de técnicas el polimorfismo se pone principalmente de manifiesto cuando los fragmentos amplificados se cortan con enzimas de restricción. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente ya que pueden amplificarse secuencias intrónicas.

***CAPS:**

En este tipo de prueba CAPS (*Cut and Amplified Polimorphic Secuencias* = Secuencia polimórfica amplificada y cortada; Konieczny y Ausubel, 1993) los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática utilizando enzimas de corte frecuente, es decir, enzimas que reconozcan secuencias de 4 a 6 nucleótidos, y se cromatografían en un gel de agarosa. Las variaciones se detectan por presencia o ausencia de sitios de restricción.

A partir de esta técnica se han evaluado diferentes modificaciones que, en determinados casos particulares, solventan ciertas dificultades para desarrollar marcadores polimórficos. Los dCAPS (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) incluyen, en los cebadores utilizados en la PCR, nuevas mutaciones respecto al ADN molde, que introducen en los productos amplificados mutaciones nucleotídicas necesarias para generar en uno de los alelos una diana de restricción que es detectada mediante la posterior digestión de los productos de amplificación (Neff et al., 1998).

***SCAR:**

Dichos marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions* = Regiones amplificadas caracterizadas por la secuencia) se basan en la clonación y secuenciación de los productos amplificados (RAPDs), diseñándose a partir de estas secuencias cebadores más largos (20-25 pares de bases) que permiten la amplificación de zonas específicas del genoma. A parte de en su especificidad, estos marcadores difieren de los RAPDs por su consistencia. Los marcadores SCAR parten de la misma idea que los STS (*Sequence-Tagged Site*) propuestos como marcadores para la realización de mapas físicos del genoma humano (Olson et al., 1989). Normalmente, se obtienen a partir de fragmentos cortos de ADN provenientes de clones genómicos o ADNc y, habitualmente, son fragmentos de ADN de copia única.

Su principal utilización ha sido en el ordenamiento de YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*) o BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) (Olson et al., 1989; Hackauf y Wehling, 2005). En los últimos años han adquirido gran importancia en los programas de mejora vegetal y en el análisis genómico, al desarrollarse a partir de marcadores moleculares previamente mapeados como RAPDs (Vinod et al., 2007), RFLPs

(Flis et al., 2005) y AFLPs (Obert et al., 2005; He et al., 2008) ya que los marcadores STS son simples, baratos y fáciles de manejar, aumentando así la utilidad de los marcadores originales.

Otro tipo de marcadores descritos en la literatura como una variante de los SCAR son los ASAP (*Allele-Specific Associated Primers*), obtenidos a partir de cebadores que reconocen de forma diferencial las secuencias de cada uno de los alelos de un *locus* concreto (Gu et al., 1995).

***SSCP:**

Esta técnica SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism = Polimorfismo de conformaciones monocatenarias; Orita et al., 1989) se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de ADN monocatenario. Las distintas conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturizante. Esta técnica es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de tamaño muy próximo, ya que puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos en una secuencia de más de 1 Kb.

***SNP:**

Los marcadores tipo SNP (*Single-Nucleotide Polymorphisms* = Polimorfismos de nucleótido único) reflejan polimorfismos que afectan a un solo nucleótido de una determinada secuencia de ADN. Normalmente están representados por variaciones de dos o a lo sumo 3 bases nucleotídicas en una determinada posición del genoma. En la mayoría de los casos son polimorfismos bialélicos, es decir, sólo se encuentran dos alelos para cada *locus* estudiado (Gut, 2001). El uso de cebadores apropiados puede hacer posible la detección de alelos SNP mediante PCR convencional (See et al., 2000).

Son varias las ventajas y las oportunidades que ofrecen los SNPs, pero sin duda su éxito y su potencialidad se deben a la gran cantidad de ellos que se encuentran distribuidos aleatoriamente por el genoma de cualquier especie. Se ha estimado, como valor medio, que se puede detectar un SNP cada 0,3-1 Kb, aunque este valor puede variar entre diferentes regiones del genoma y entre genomas de diferentes especies (Edwards y Mogg, 2001; Rafalski, 2002a). Además de su abundancia y distribución, son fáciles de genotipar, existiendo actualmente en el mercado gran cantidad de técnicas que permiten analizar cientos o miles de muestras de una forma rápida y eficiente. También se ha podido comprobar que los SNP presentan un menor índice de mutaciones que otros tipos de polimorfismos (Rafalski, 2002b).

Entre las aplicaciones que se les ha encontrado a los SNPs, destacan su utilización como marcadores genéticos para definir haplotipos de regiones genómicas, en el mapeo de STS, en la integración de mapas genéticos y físicos y en estudios de mapeo por asociación, al permitir relacionar alelos de unos pocos genes candidatos con determinados fenotipos o hacer barridos de todo el genoma para identificar regiones asociadas a un fenotipo particular (Rafalski, 2002a; Rahman et al., 2007; An et al., 2008).

Para la detección de SNPs se siguen dos tipos de estrategias, una basada en resecuenciación de fragmentos PCR y otra en hibridaciones de microchips de ADN procedente de varios individuos, las cuales posteriormente se alinean para encontrar SNP, métodos que se han denominado eSNP (*electronic SNP*) e isSNP (*in silico SNP*), respectivamente. Una idea de la importancia que los SNPs están alcanzando actualmente la podemos obtener observando la gran cantidad de técnicas de detección analítica y automatización de SNPs que se ofrecen en el mercado por parte de la industria del sector (Dufresne et al., 2004; Bertin et al., 2005).

***SSR:**

Los microsatélites, también conocidos como SSR (*Simple Sequence Repeats* = Secuencias Simples Repetidas) o STR (*Short Tandem Repeat* = Tándem cortos repetidos), fueron descritos por primera vez por Hamada et al. (1982) como secuencias cortas de ADN constituidos por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem en regiones del genoma no codificante. Las variaciones existentes en el número de repeticiones entre individuos los convierten en marcadores muy polimórficos, codominantes, específicos de *locus* y altamente informativos. Por otra parte, los SSR se encuentran distribuidos de forma abundante y uniforme a lo largo de todo el genoma de plantas y animales, de ahí su enorme utilidad con fines diversos en la mejora genética vegetal (Torjek et al., 2002; Silva et al., 2008).

Esta técnica se ha aplicado con éxito al estudio de numerosos árboles (Fang et al., 1997), aunque en algunos se ha visto que los microsatélites son menos variables de lo que se esperaba. Esta clase de secuencias simples de ADN, que se encuentran de forma abundante y uniforme en los genomas de la mayoría de organismos eucariotas, no se transcriben a ARN y, entre la amplia variedad de funciones que se les atribuye se incluyen la regulación génica (Hamada et al., 1984) y la de actuar como señales para la conversión génica y la recombinación (Jeffreys et al., 1985).

Este tipo de ADN repetitivo es común en organismos eucariotas, y el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los organismos, hallándose en algunos hasta 50 copias de la unidad repetida. Para identificar estos polimorfismos, se construyen cebadores de PCR para la región del ADN que flanquea el

microsatélite. Las regiones adyacentes a los microsatélites tienden a conservarse dentro de las especies, aunque a veces se conservan también en niveles taxonómicos mayores (Hajeer et al., 2000). Generalmente, las repeticiones de dinucleótidos constituyen los microsatélites más comunes, que pueden ser de tres tipos: perfectos (ej. $(CA)_n$), imperfectos (ej. $(CA)_n$ -CCA- $(CA)_m$) y compuestos (ej. $(CA)_n$ (TG) $_m$), donde n y m son el número de repeticiones del motivo. Los tri y tetranucleótidos son menos habituales. En particular, se conoce que la repetición $(GT)_n$ representa el 0,5% del genoma humano, siendo la más extendida en genomas de mamíferos (Tautz y Renz, 1984). En genomas vegetales el dinucleótido más repetido es el $(AT)_n$ (Smulders et al., 1997), aunque existen particularidades según la especie vegetal. Así, se ha encontrado que en cebada y en arroz el SSR más abundante es el $(GA)_n$ (Chen et al., 1997).

Dado que el ADN adyacente al microsatélite tiene mayor probabilidad de ser conservado, los cebadores derivados de microsatélites se pueden usar a menudo con muchas variedades e incluso con otras especies. La detección de estos marcadores se automatiza fácilmente, son muy polimórficos y tienen buena resolución analítica. Todo esto los convierte en una alternativa preferida como marcadores (Matsuoka et al., 2002). Su detección se realiza mediante reacciones PCR utilizando cebadores específicos de secuencias que flanquean y definen las regiones repetidas.

Los microsatélites son marcadores cada vez más apreciados y usados en la mayor parte de los programas de mejora varietal. Se trata de marcadores multialélicos, altamente polimórficos, codominantes, transferibles entre especies relacionadas, sencillos de amplificar a través de la PCR, altamente reproducibles y de fácil automatización (Rafalski y Tingey, 1993). Además, el número de repeticiones es altamente variable pudiendo ser utilizado en la identificación de variedades, diversidad genética, cartografía de genoma, estudios filogenéticos y estudios evolutivos (Powell et al., 1996; Gupta et al., 1999; Peleg et al., 2008).

En resumen, en la Tabla 1.2 se muestran las principales ventajas e inconvenientes de los SSR. Los microsatélites tienen una ventaja especial sobre los RAPD por ser codominantes, o sea, pueden distinguir entre los homocigotos y los heterocigotos. Sin embargo, aunque los SSR tienden a ser más reproducibles, porque las secuencias de los cebadores son más largas, tienen una desventaja: requieren de algún conocimiento preexistente de la secuencia del ADN de la región, aunque sólo sea parcial. Su inconveniente principal es la inversión en esfuerzo y costo que se necesita para diseñar los cebadores específicos de cada locus. Del mismo modo que con los RAPD, el uso de la PCR genera datos rápidamente y requiere poco ADN. Por lo tanto, aunque sea el SSR el marcador ideal para el mejorador,

estos marcadores tienen un desarrollo extremadamente costoso y su uso está limitado a especies en las que exista esta información o puedan transferirse desde especies próximas.

Tabla 1.2. Ventajas e inconvenientes de los marcadores moleculares microsatélites.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requieren muy poco ADN y éste no necesariamente de alta calidad ▪ Sumamente polimórficos ▪ Uniformemente distribuidos en todo el genoma ▪ Interpretación sencilla de los resultados ▪ Automatizados fácilmente, y permiten la carga simultánea de productos en el mismo carril ▪ Buena resolución analítica y alta reproducibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Procedimiento de descubrimiento complejo ▪ Coste elevado

Una de las principales limitaciones para la utilización de los SSRs es la necesidad de conocer previamente la secuencia flanqueante de los mismos. Para superar esta limitación y aprovechar, al menos en parte, las ventajas de estos marcadores, se han desarrollado otros tipos de marcadores que hacen uso de las características de los microsatélites, entre los que se encuentran los ISSR (*Inter-SSR*). Estos emplean cebadores únicos compuestos por el motivo repetitivo propio de un microsatélite y un conjunto de 2-4 nucleótidos degenerados en uno de los extremos, se ha usado tanto en el extremo 3' o como en el 5'. Con ello se consigue anclar el cebador a la zona colindante de los microsatélites. El objetivo de estos marcadores es la amplificación de las secuencias localizadas entre los SSRs, prescindiendo de un conocimiento previo de la secuencia de ADN y convirtiéndose en un sistema de marcadores multilocus a diferencia de los SSR que son monolocus (Wu et al., 1994). Otros autores han utilizado los ISSRs con cebadores no anclados en uno de sus extremos (Leroy y Leon, 2000; Borner y Branchard, 2001).

1.1.3. LA IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIEDADES DE OLIVO

Dada la importancia del cultivo del olivo y los distintos tipos de aceites que se pueden obtener de las diferentes variedades, debería primar la elaboración de un método que identifique claramente las variedades de olivo. Las clasificaciones y caracteres utilizados a lo largo del tiempo para clasificar las variedades de olivo han sido muy diversos. Desde principios del siglo XX, la caracterización varietal de los diferentes cultivos de interés agrícola se ha llevado a cabo con la ayuda de caracteres morfo-agronómicos y más recientemente, con isoenzimas y proteínas de reserva.

El tipo de clasificación más utilizado por los primeros investigadores pomológicos del olivo es el que se basa en caracteres de los cultivares según las variaciones morfológicas de frutos, hojas, inflorescencias y endocarpos (Barranco y Rallo, 1984). El endocarpo es sin duda el carácter de mayor capacidad discriminante entre variedades, ya que permanece constante para muestras de un mismo individuo y años diferentes, apreciándose únicamente variaciones de tamaño, pero no morfológicas para diversas localizaciones del mismo cultivar (Salazar y López, 2002; Gomez-Jimenez et al., 2006).

En Italia, ya en 1989 se abogó por la creación de una red nacional y regional de variedades de olivo como medio para preservar la biodiversidad ya entonces prospectada (Bargioni y Lint, 1989), proponiendo unos estudios completos del germoplasma de olivo mundial que luego recogió el Consejo Oleico Internacional (COI) en un Convenio Internacional. En los años 90, Prevost et al. (1993) comenzaron a recoger materiales vegetales por toda Italia y empezaron a estudiar las posibles sinonimias entre estos materiales. Tanto Bartolini et al. (1994) como Panelli y Servili (2003), insisten en la necesidad de una caracterización pomológica completa ya en árboles iniciales y que se repetirá o comprobará después en colecciones adecuadas para evitar las confusiones de las características generales de los cultivares con las de los materiales clonales concretos de olivo que se vayan multiplicando y estableciendo en colección. Panelli y Servili (2003) recogen los resultados de las colecciones de germoplasma de la región de Umbría y realizan una caracterización pomológica de las variedades de esta región italiana, comparando, en algunos casos, con tipificaciones previas de árboles viejos y detectando algunos caracteres con amplias variaciones. Ratificando la necesidad de una caracterización pomológica del olivo en origen.

Los catálogos de variedades de olivo de las diferentes regiones italianas han sido publicados por diferentes autores como Mulas et al. (1994), que describen pomológicamente las variedades de Cerdeña; D'Amore et al. (1977) catalogaron en una primera aportación las principales variedades de olivo presentes

en Calabria; Macri et al. (1998) aportaron unos estudios biomorfológicos de las variedades de olivo autóctonas de Isernia, y Panelli et al. (1998), clasifican y estudian pomológicamente los olivos de la región de Marche. Todas estas aportaciones permiten tener un buen catálogo del comportamiento y en parte de las características de los aceites de Italia.

En Italia, Cimato (2002) indica la situación de 20 campos de colección de las variedades de olivo italianos como mecanismo útil y necesario para la conservación de la biodiversidad. El conjunto de prospecciones realizadas en el olivo en Italia condujo al marcaje y elección, ya en 1998, de 1864 árboles con distintas denominaciones, de los que 1306 resultaron sinonimias de los actualmente considerados como variedades existentes en este país, que son 538. De todas formas, si a éstos añadimos nuevas obtenciones o selecciones finalizadas y con materiales distintos dentro de la misma denominación, debemos considerar que hoy el elenco varietal italiano incluye 715 variedades.

En Portugal, se manifestó también la importancia de crear bancos de germoplasma, a nivel regional y general, en la década de los años 80. En la mayor parte de sus regiones olivareras, los autores se dedicaron a las selecciones clonales, pero pensando en la idea básica de comparar no sólo el olivo agronómica y pomológicamente, sino comparar también sus aceites, aunque todos ellos indican que los aceites que deben compararse son los de árboles adultos, de los árboles iniciales o cabezas de clan en sus condiciones de cultivo, ya que es ésta la mejor forma de caracterizar estos aceites, especialmente pensando que las selecciones se establecen en su mayor parte, y siempre al principio, en la comarca o comarcas próximas a los lugares de extracción de los clones. Así indican, entre otros, Serrano, Leitao, Martins et al. (1997) y Fernandes et al. (1997), la importancia de estudiar la composición de los aceites en los árboles seleccionados *in situ*. Además son realmente éstos los aceites que se comercializan y de los que existe interés por su caracterización.

Sin embargo, los marcadores morfológicos tienen en olivo utilidad limitada, además, por la elevada frecuencia con la que los genes que los codifican presentan interacciones con otros, así como la influencia ambiental sobre su expresión. Además, presentan desventajas relacionadas con la disminución de la diversidad morfológica, el efecto del medio ambiente en la morfología y la limitación de estos marcadores para la estimación de la distancia genética. De ahí que el uso de los marcadores moleculares basados en polimorfismos detectados en la propia molécula de ADN se haya popularizado enormemente ya que ofrecen nuevas e importantes posibilidades. Los marcadores moleculares facilitan la inclusión de una mayor variabilidad genética y evita la introducción de duplicados en los Bancos de Germoplasma de

olivo. Igualmente, permiten complementar y ampliar la información obtenida con los métodos morfológicos. La Tabla 1.3 muestra el uso de los diferentes marcadores moleculares descritos en olivo.

Tabla 1.3. Marcadores y tipo de estudio en el género *Olea*.

* RFLPs de ADN citoplasmático

Marcador	Especie	Estudio	Autores
RFLPs	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i> , y var. <i>europaea</i> ,	Filogenia	(Amane et al., 2000)
	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i> <i>Olea europaea</i> , ssp. <i>laperrinei</i> ; ssp. <i>maroccana</i> ; ssp. <i>cerasiformis</i>	Filogenia*	(Lumaret et al., 2000)
	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i>	Androesterilidad*	(Besnard et al., 2000)
RAPDs	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i>	Diversidad	(Claros et al., 2000; Fabbri et al., 1995; Hernández et al., 2001 a y b; Mekuria et al., 2001; Sanz Cortes et al., 2001; Belaj et al., 2001, 2002 ; Hagidimitriou et al., 2005)
	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i> y var. <i>europaea</i>		(Besnard et al., 2001 ; Cordeiro et al., 2008)
SSRs	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i> <i>europaea</i>	Diversidad	(Brachet et al., 1999; Lefort et al., 1999 ; Rallo et al., 2000; Sefc et al., 2000 ; Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Rallo et al., 2000, 2003; Nikoloudakis et al., 2003 ; Sarri et al., 2006; Besnard et al., 2008; Baldoni et al., 2009; Bracci et al., 2009; Gomes et al., 2009; Roubos et al., 2010)
SCARs	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i>	Diversidad	(Hernández et al., 2001a,b)
ISSRs	<i>O. europaea</i> ssp. <i>cuspidata</i> ; ssp. <i>cerasiformis</i> ; ssp. <i>laperrinei</i> ; ssp. <i>cerasiformis</i> ; ssp. <i>europaea</i>	Diversidad Filogenia	y (Hess et al., 2000; Terzopoulos et al., 2005; Essadki et al., 2006)
AFLPs	<i>Olea europaea</i> , var. <i>sylvestris</i> , var. <i>europaea</i> , ssp. <i>laperrinei</i> ; ssp. <i>maroccana</i>	Diversidad Filogenia	y (Angiolillo et al., 1999; Hagidimitriou et al., 2005; Owen et al., 2005 ; Montemurro et al., 2005)

En España, los marcadores utilizados con más éxito en estudios de identificación varietal de olivo han sido las isoenzimas y los marcadores de ADN. La Universidad de Córdoba tiene instalada la mayor colección de variedades de olivos españoles y del resto de la cuenca del Mediterráneo, gracias a un

convenio de la Universidad de Córdoba con el Comité Olivícola Internacional (COI). En Cataluña existe un banco de germoplasma en el IRTA-Mas Bové (Constantí, Tarragona) en las que existen al menos 29 cultivares con los que han trabajado en su androesterilidad (Rovira y Tous, 2001).

La mayoría de los estudios se han realizado en material incluido en colección como la identificación de las diferentes variedades españolas del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo del CIFA 'Alameda del Obispo' de Córdoba, la cual se ha llevado a cabo mediante el empleo de marcadores moleculares del tipo isoenzimas, RAPDs, AFLPs y SSRs (Rallo et al., 2005).

Si bien estos marcadores moleculares podrían servir para establecer la identidad de los genotipos, dada su capacidad discriminante, la elección de uno u otro va a depender de la complejidad técnica y del coste. Así, las isoenzimas y los RAPDs son marcadores útiles para identificar económicamente un elevado número de variedades, mientras que los AFLPs y microsatélites (SSRs), muy polimórficos, requieren de una mayor infraestructura y son más caros. Por tanto, la sencillez, el coste y la capacidad de los laboratorios son factores que determinan la elección de uno u otro marcador.

Aunque su uso ha sido limitado, diversos autores han comprobado la utilidad de las isoenzimas en la identificación de variedades de olivo, debido al alto polimorfismo detectado en la especie (Trujillo et al., 1995). Actualmente, las isoenzimas todavía se siguen usando porque se trata de una técnica simple y barata, que además puede mostrar segregación genética codominante. No obstante, el empleo de polen limita su uso a estudios en colección y al período productivo del árbol, además se requiere conocimiento previo de la proteína/enzima a estudiar (Rallo et al., 2005).

Al igual que las isoenzimas, los marcadores RAPD han demostrado su utilidad para identificar las frecuentes homonimias de olivo previamente descritas (Barranco y Rallo, 2000; Rallo et al., 2005). En olivo, los RAPDs se han utilizado con éxito en la identificación de variedades procedentes de colecciones de diferentes países dentro y fuera de la cuenca mediterránea, como Italia (Bogani et al., 1994; Cresti et al., 1994; Fabbri et al., 1995), Portugal (Gemas et al., 2004; Gómez-Jiménez et al., 2006; Cordeiro et al., 2008), Grecia (Nikoloudakis et al., 2003; Hagidimitriou et al., 2005), Francia (Besnard et al., 2001), Israel (Wiesmann et al., 1998), Australia (Mekuria et al., 1999) y España (Belaj et al., 2001; Sanz-Cortés et al., 2001; Rallo et al., 2005). Asimismo, dichos marcadores también han sido de gran utilidad para identificar material procedente de vivero (Rubio y Arús, 1997; Belaj et al., 1999; García-Férriz et al., 2001; Rallo et al., 2005). Sin embargo, los productos amplificados por RAPD frecuentemente contienen secuencias

redundantes de ADN repetitivo, por lo que no pueden ser utilizados como sondas de hibridación (Paran y Michelmore, 1993) y además los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter, sino al ADN redundante (repetitivo).

Por otra parte, el uso de marcadores tipo AFLP tiene un alto potencial en el estudio de la variabilidad genética en el olivo. Los marcadores moleculares de tipo AFLP han permitido corroborar homonimias, y confirmar la existencia de sinonimias entre variedades de diferente origen geográfico previamente descritas en España (Barranco y Rallo, 2000; Belaj et al., 2002; Rallo et al., 2005). Tal es el caso de las variedades 'Manzanilla Cacereña', 'Negrinha' y 'Azeitera' por un lado; 'Valanolia' y 'Cakir' por otro. En Francia, se estableció ya un banco de germoplasma analizado por marcadores moleculares tipo RAPD y AFLP a partir de 168 accesiones que han sido agrupadas en 32 variedades, 13 de ellas de interés general para este país y otras 19 de interés local (Besnard et al., 2001).

Los inconvenientes de los marcadores RAPD pueden ser solventados por el desarrollo de los SSR como marcadores genéticos mediante PCR. Belaj et al. (2003) han realizado un estudio comparativo de la capacidad de discriminación de los RAPD, AFLP y SSR, y su efectividad en el establecimiento de las relaciones genéticas en olivo, concluyendo que los SSR presentan un elevado nivel de polimorfismo y se han distribuido de forma homogénea en todos los grupos de ligamiento en el primer mapa de ligamiento genético de olivo (De la Rosa et al., 2003).

También en el olivo ha sido estudiada la diversidad genética con SSRs, en lo que respecta a la relación genética entre el olivo cultivado en diferentes países y sus formas silvestres (Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Rallo et al., 2000, 2003, 2005; Díaz et al., 2006; Sarri et al., 2006; Besnard et al., 2008; Baldoni et al., 2009; Bracci et al., 2009; Gomes et al., 2009; Roubos et al., 2010).

En los últimos años, la utilidad de la técnica SSR en la identificación varietal ha sido evidenciada para las variedades principales de olivo españolas (Rallo et al., 2003, 2005; Díaz et al., 2006). Han identificado 25 variedades mediante patrones alélicos obtenidos en cuatro loci, entre las que se encuentran algunas de las variedades cultivadas en Extremadura como "Arbequina", "Picual", "Gordal", "Manzanilla Cacereña", "Morisca" y "Verdial de Badajoz" (De la Rosa et al., 2002; Rallo et al., 2003, 2005; Díaz et al., 2006). En dichos trabajos, aunque aplicado a un corto número de variedades de Extremadura, se ha utilizado por primera vez la técnica tipo SSR para la discriminación de variedades cultivadas en Extremadura.



1.2. OBJETIVOS

El patrimonio genético del olivo es extraordinariamente rico: se estima que existen unos 2000 genotipos diferentes, todos ellos fruto de la selección empírica practicada por los agricultores a través de los siglos. Sin embargo, la mayor parte de estos cultivares son muy viejos y su difusión está limitada en torno a su presunto lugar de origen. El hecho de que las variedades más importantes en la actualidad ya lo fueran en el siglo XV da muestra de su antigüedad. Estas variedades han funcionado bien en el contexto de una agricultura marginal de baja productividad, pero no satisfacen los requisitos de una olivicultura moderna y competitiva.

Por otra parte, aparte de su interés agronómico y económico, el cultivo del olivo en regiones como Extremadura tiene también gran interés ecológico, ya que es una especie que se adapta muy bien a diferentes ecosistemas mediterráneos, especialmente aquellos con climas secos y suelos pobres, donde juega un importante papel en la protección del suelo de la erosión y el mantenimiento de la humedad. Debido a sus características climáticas y orográficas, Extremadura presenta microclimas muy diversos que han permitido el desarrollo de multitud de variedades autóctonas distintas, que se agrupan en olivares autóctonos perfectamente adaptados a dichas zonas y microclimas y que, como la dehesa o el bosque mediterráneo (con los que está en muchos casos mezclado formando parte de su arbolado), son un bien a cuidar y proteger por su valor ecológico contra la desertización.

Uno de los problemas más frecuentes, tanto en la conservación de variedades autóctonas como en la mejora genética, es la correcta identificación del material existente, así como de las nuevas entradas. El

olivo, debido a su antigüedad y al empirismo de los primeros observadores humanos, fue clasificado conforme a criterios genéricos de denominación. En muchos casos los nombres hacían referencia a características destacadas de los frutos o cualquier otra parte de la planta, o incluso a la ubicación geográfica. Tal situación ha acarreado hoy día una enorme confusión, con la reiteración del mismo nombre para variedades distintas (homonimias) o nombres distintos para la misma variedad (sinonimias). Se asiste también, aunque no de forma generalizada y mucho menos aceptada, a la noción de “variedad-población” para justificar fenotipos muy distintos que sólo coinciden en el nombre, hecho que aumenta enormemente la notable confusión que todavía predomina. Prueba de ello es la existencia, en las actuales colecciones de olivo, de unas 1200 variedades autóctonas con más de 3000 denominaciones.

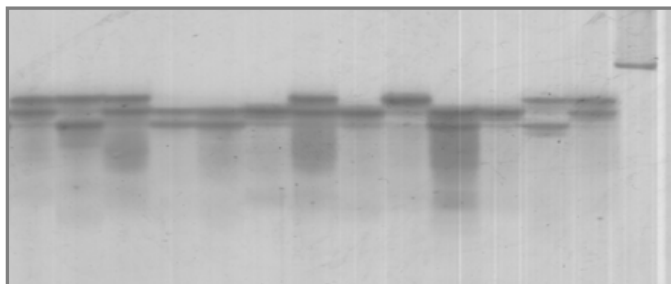
Las técnicas moleculares no pueden ser consideradas como substitutivas de la caracterización morfológica, sino más bien como un complemento al estudio de las fuentes genéticas de dichos caracteres morfológicos; y en este sentido, en el presente trabajo se plantean ambas caracterizaciones: morfológica y molecular del olivar extremeño, ya que los antecedentes previos de estudios morfológicos asociados con marcadores moleculares en olivo de otras localizaciones geográficas, han demostrado que nombres genéricos de variedades de olivo incluyen en realidad diferentes genotipos.

En el olivo, la identificación y certificación de material vegetal de vivero es muy importante en estos momentos de gran actividad viverística y además donde el material circula entre regiones y países. Entre los diferentes marcadores moleculares disponibles, los microsatélites son especialmente valorados por ser codominantes, evaluables mediante PCR y distribuidos homogéneamente en el genoma.

Por consiguiente, con el fin de poder disponer de un método rápido y eficiente de identificación de variedades autóctonas y considerando la importancia del cultivo del olivo en Extremadura, en el presente trabajo se abordan los siguientes **objetivos**:

1. Localización del material cultivado de esta especie en Extremadura, clasificación en una colección y **caracterización morfológica** de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura.
2. Identificación de las **variedades autóctonas** de olivo cultivadas en la región usando los **marcadores moleculares microsatélites**: determinación de patrones de bandas SSR que permitan la identificación varietal y evaluación de la utilidad de los SSR para la certificación de estas variedades, previamente caracterizadas morfológicamente.

3. Establecimiento de la **similitud genética** entre las diferentes variedades, basándonos en los datos obtenidos por SSR, así como el estudio de posibles sinonimias y homonimias, y comparación de estos resultados con las características morfológicas.



1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. MATERIAL VEGETAL

Con la idea de estudiar la biodiversidad del olivo en Extremadura hemos rastreado 22 localidades, ya que esta región presenta microclimas muy diversos que permiten el desarrollo de múltiples variedades distintas. En cada localidad hemos elegido al azar 10 árboles de una variedad, y tomado 40 hojas jóvenes y adultas junto a 40 frutos de cada árbol. Los árboles sueltos 'que no se sabe exactamente a qué pueden corresponder' no se han considerado en el análisis.

En el Anexo I se recogen los términos municipales prospectados en cada una de las provincias visitadas y las denominaciones de olivo encontradas durante las primaveras de los años 2006, 2007 y 2008. El número de términos municipales visitados en cada provincia ha dependido de la importancia y de la homogeneidad del olivar en la misma. En total se han encontrado 48 denominaciones varietales (116 accesiones diferentes) cultivadas de olivo en Extremadura.

1.3. 2. MÉTODOS

1.3.2.1. Metodología adoptada para la caracterización morfológica de las variedades de olivo (recogida en el Anexo II).

Para este trabajo de prospección e inventario de variedades de olivo en Extremadura se ha utilizado el esquema pomológico publicado por Barranco y Rallo (1984), y el Consejo Oleico Internacional (COI).

En el Anexo II se describe la metodología que se emplea para describir variedades de olivo en colección o campo, mediante una serie de caracteres morfológicos (del árbol, hoja adulta, fruto y endocarpo bien desarrollados) según COI.

Las hojas adultas y frutos bien desarrollados se recolectaron en 10 árboles de cada variedad, cortando 10 ramas de los 2-4 brazos de cada árbol. Se trasladaron en neveras al laboratorio y allí se clasificaron. En el laboratorio, se separaron las hojas y frutos de las ramas y los endocarpos de los frutos, se lavaron con agua destilada y clasificaron utilizando los siguientes parámetros o caracteres morfológicos para cada variedad:

- 4 parámetros (forma, longitud, anchura y curvatura longitudinal del limbo) para la hoja adulta.
- 9 parámetros (peso, forma, grado de simetría, diámetro transversal máximo, ápice, base, pezón, lenticelas, color en maduración) para el fruto.
- 10 parámetros (forma, grado de simetría (a), grado de simetría (b), diámetro transversal máximo, ápice, base, superficie, número de surcos fibrovasculares, distribución surcos, terminación del ápice) para el endocarpo,

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV. Los resultados obtenidos durante los tres años se cotejaron mediante análisis de ANOVA para determinar el efecto del año.

1.3.2.2. Extracción de ADN genómico de olivo

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron hojas jóvenes de las 116 accesiones diferentes (Anexo I). El aislamiento del ADN genómico se realizó siguiendo un método puesto a punto en nuestro laboratorio basado en los métodos de Rowland y Nguyen, (1993) y Angiolillo et al., (1999). Se pulverizó un gramo de hojas con nitrógeno líquido en un mortero, introduciéndose en tubos de polipropileno de 50 mL, donde se extrajo con 5 mL de tampón de extracción (Tris HCl pH 8 100 mM; NaCl 1,4 M; EDTA 20

mM; CTAB 2% (p/v); NaHSO₃ 0,1% (p/v)) con ayuda de un vortex. A continuación se añadieron 10 µL de 2-mercaptoetanol para conseguir una concentración final del 0,2% (v/v), se suplementó con 100 mg de PVP insoluble (Sigma) y se incubó 1 hora a 65 °C. La solución se llevó a temperatura ambiente y se extrajo con 5 mL de cloroformo. Se centrifugó en rotor oscilante durante 5 min a 4000 g y se añadieron 500 µL de la solución CTNa (CTAB 10 % (p/v) y NaCl 0,7 M) precalentada para disminuir su viscosidad. Se homogeneizó suavemente por inversión del tubo para evitar la fragmentación del ADN. El CTAB se elimina de nuevo con 5 mL de cloroformo y posterior centrifugación durante 5 min a 4000 g, tomándose la fase superior y precipitándose con 0,6 volúmenes de 2-propanol tras mezclar suavemente por inversión. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000 g y temperatura ambiente, y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% (v/v), resuspendiéndose en 50 µL de TE (Tris pH 7,4 10 mM; EDTA 1 mM). La mitad del ADN genómico aislado se almacenó a -20 °C y la restante se trató con RNAsa A a una concentración de 0,1 µg/µL durante 45-30 min a 37 °C. Posteriormente se precipitó con 250 µL de una solución que contiene NaCl 1,6 M y PEG 8000 (Sigma) 13% (p/v), incubándose 5 min a 4 °C. La precipitación con PEG se basa en la pérdida de solvatación del ADN, por lo que suele precipitar limpio de sales y otros compuestos de menor peso molecular como oligonucleótidos. Finalmente, se centrifugó 15 min a 15000 g y 4°C, lavándose el precipitado con 500 µL de etanol 70% y resuspendiéndose en 250 µL de TE como anteriormente se ha descrito. Ya que el ARN se elimina en su mayor parte en la precipitación con PEG, la concentración de ácidos nucleicos de las preparaciones se pudo cuantificar con bastante precisión midiendo la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia corresponde a 50 µg de ADN por mL de solución. La relación A260/A280 se utilizó para estimar la pureza de los ácidos nucleicos (Sambrook et al., 1989). Como solución de trabajo se empleó una dilución a 20 ng/µL.

1.3.2.3. Obtención de marcadores ADN microsatélites (SSR: “Simple Sequence Repeat”/ “Repeticiones de Secuencias Simples”)

Para la obtención de marcadores SSR es necesario el diseño de cebadores específicos a partir de las secuencias flanqueantes del SSR. Por lo tanto, el locus microsatélite se define por una pareja de cebadores que amplifican una región única del genoma que contiene un motivo repetido (Fig. 1.5).

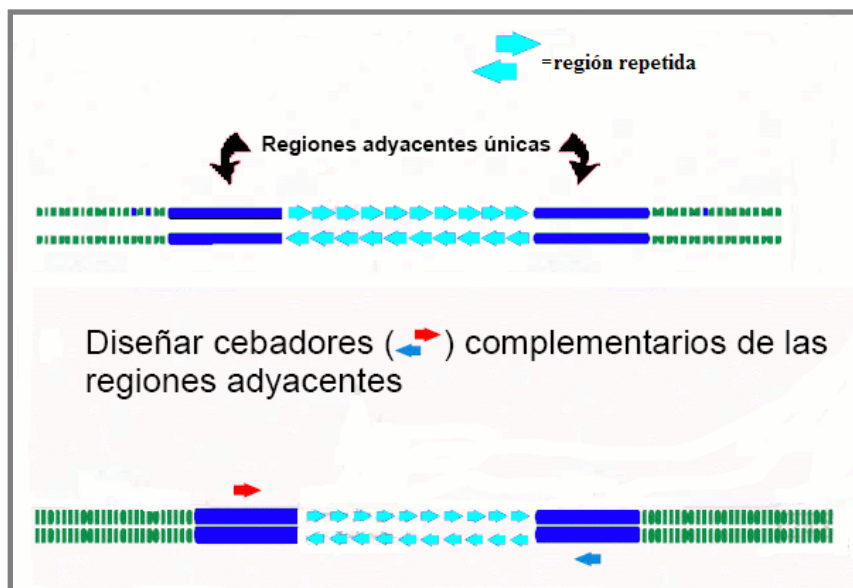


Fig. 1.5. Diseño de cebadores a partir de las regiones adyacentes a la región repetida.

En este trabajo se han utilizado cuatro microsatélites [EMO2 y EMO3 (De La Rosa et al., 2002) y DCA9 y DCA18 (Sefc et al., 2000)] por presentar un alto número de alelos, revelando un gran número de genotipos y permitiendo la distinción de un elevado número de cultivares. En la Tabla 1.6 se indican las características más relevantes de los microsatélites utilizados en este trabajo.

De las 116 accesiones diferentes de olivo han sido seleccionadas 59 accesiones (=34 denominaciones) por englobar las principales variedades autóctonas de Extremadura. En este trabajo se han usado los cuatro microsatélites (Tabla 1.6) para estudiar la identificación y el análisis de la variabilidad genética de las 59 denominaciones de olivo cultivado (*Olea europaea* L.) en Extremadura. De éstas solamente 38 denominaciones pudieron ser amplificadas con los cuatros SSRs (Tabla 1.7), el resto de accesiones sólo amplificó para alguno de los SSRs probados.

Tabla 1.6. Descripción de los microsatélites desarrollados en olivo.

MICROSATELITE o LOCUS	SECUENCIAS DE LOS PRIMERS (5'-3')	MOTIVO REPETIDO	TAMAÑO DEL ALELO (pb)
EMO2	F:CTCGCACTTTAAATTCATATGGGTAGGT R: GCGTGCTTGGGTGCTTGTGG	(AG) ₅ -G-(GA) ₁₀	213 (201-243)
EMO3	F: GGTGTAGCCCAAGCCCTTAT R: TGCATGACCGTGGTGTAAAGT	(CA) ₇	214 (205-215)
DCA9	F: AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	(GA) ₂₃	191 (161-205)
DCA18	F: AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	178 (168-184)

Tabla 1.7. El número de registro, la localidad y la variedad de las 59 accesiones de olivo analizadas por microsatélites. Se señalan con el símbolo “●” aquellas denominaciones para las que amplificaron los 4 SSRs. Para el análisis de datos fueron utilizadas únicamente las denominaciones subrayadas.

Nº REGISTRO	DENOMINACIÓN VARIETAL	AMPLIFICACIÓN 4 SSRs o loci	LOCALIDAD (PROVINCIA)
100	<u>"Acebuche"</u>	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
105	<u>"Arbequina"</u>	●	Olivenza (Badajoz)
11	<u>"Azulejo"</u>	●	Berlanga (Badajoz)
33	"Azulejo"		Fuente del Arco (Badajoz)
52	<u>"Azulito"</u>	●	Monasterio (Badajoz)
34	"Cañaval"		Fuente del Arco (Badajoz)
54	"Cañavera"		Monasterio (Badajoz)
2	<u>"Carrasqueña"</u>	●	Santos de Maimona (Badajoz)
30	"Carrasqueña"	●	Hornachos (Badajoz)
86	"Carrasqueña"	●	Badajoz (Badajoz)
99	"Carrasqueña"	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
116	"Cojón del gallo"		La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
18	"Colorá"		Villar del Rey (Badajoz)
25	<u>"Colorá"</u>	●	Albuquerque (Badajoz)
20	"Cordovil"	●	Villar del Rey (Badajoz)
14	"Cornicabra"		Navalvillar de Pelas (Badajoz)
93	<u>"Cornicabra"</u>	●	Puebla de Alcocer (Badajoz)
98	<u>"Cuerno Real"</u>	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
80	"Cuerno Real"	●	Navalvillar de Pela (Badajoz)
95	<u>"Fina"</u>	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
41	<u>"Gallega"</u>	●	San Vicente de Alcántara (Badajoz)
42	"Gorda"		San Vicente de Alcántara (Badajoz)
32	<u>"Gordal"</u>	●	Hornachos (Badajoz)
60	"Gordal"		Burguillos del Cerro (Badajoz)

56	"Jariego"		Monesterio (Badajoz)
47	"Limoncilla"		Don Benito (Badajoz)
23	"Manzanilla"	•	Alburquerque
38	"Manzanilla"		Fuente del Arco (Badajoz)
8	"Manzanilla"	•	Berlanga (Badajoz)
92	"Manzanilla"	•	Puebla de Alcocer (Badajoz)
17	"Manzanilla Cacereña"		Navalvillar de Pela (Badajoz)
46	"Manzanilla Cacereña"		Coria (Cáceres)
84	"Manzanilla Cacereña"	•	Alía (Cáceres)
13	"Manzanilla Real"	•	Navalvillar de Pela (Badajoz)
48	"Minuina"	•	Don Benito (Badajoz)
1	"Morisca"		Santos de Maimona (Badajoz)
10	"Morisca"	•	Berlanga (Badajoz)
27	"Morisca"		Hornachos (Badajoz)
5	"Morisca"	•	Berlanga (Badajoz)
24	"Ocal"	•	Alburquerque (Badajoz)
4	"Oliva"	•	Berlanga (Badajoz)
36	"Oliva"		Fuente del Arco (Badajoz)
114	"Original"	•	Navalvillar de Pela (Badajoz)
44	"Pajonala"		San Vicente de Alcántara (Badajoz)
12	"Perito"	•	Berlanga (Badajoz)
104	"Picual"	•	Olivenza (Badajoz)
28	"Picual"	•	Hornachos (Badajoz)
55	"Picual"	•	Monesterio (Badajoz)
26	"Pico Limón"		Hornachos (Badajoz)
6	"Pico Limón"	•	Berlanga (Badajoz)
9	"Pico Real"	•	Berlanga (Badajoz)
19	"Redondil"	•	Villar del Rey (Badajoz)
43	"Redondil"		San Vicente de Alcántara (Badajoz)
16	"Verdial de Badajoz"		Navalvillar de Pela (Badajoz)
3	"Verdial de Badajoz"		Santos de Maimona (Badajoz)
51	"Verdial de Badajoz"	•	Don Benito (Badajoz)
58	"Verdial de Badajoz"	•	Mérida (Badajoz)
94	"Verdial de Badajoz"	•	Puebla de Alcocer (Badajoz)

a) Amplificación de los marcadores SSR

Se trata de una prueba de PCR (*Polymerase Chain Reaction* = reacción en cadena de la polimerasa), siguiendo el procedimiento original (Williams et al., 1990). La utilización de la técnica de PCR, es la más ampliamente utilizada en biología molecular debido a su notable polivalencia, sensibilidad y rapidez (McPherson et al., 1995).

El éxito de la técnica SSR depende de las concentraciones de cada uno de los compuestos de la reacción, del programa de cada ciclo y del termociclador en el cual las reacciones se realizan. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen de 20 μL . En la Tabla 1.8 se detallan los compuestos y concentraciones utilizados.

Tabla 1.8. Productos empleados en la PCR.

* Forward and Reverse.

Producto	Volumen (μL)	Concentración stock	Concentración final
H ₂ O	14,4		
Tampón	2	10 X	1 X
MgCl ₂	1,2	25 mM	1,5 mM
dNTPs	0,5	10 mM	250 μM
cebador	0,5 x2*	10 μM	0,25 μM
Taq	0,1	10 U/ μl	0,05 U/ μL
ADN	1		
Volumen final	20		

Es necesario realizar un trabajo de optimización riguroso de las diferentes condiciones de la reacción (Sambrook et al., 1989; Taylor, 1991; Kidd y Ruano, 1995). La PCR se realizó durante 35 ciclos en un termociclador Gene Amp. PCR system 9700 – Applied Biosystems y el programa utilizado ha sido el que se expone en la Fig. 1.6.

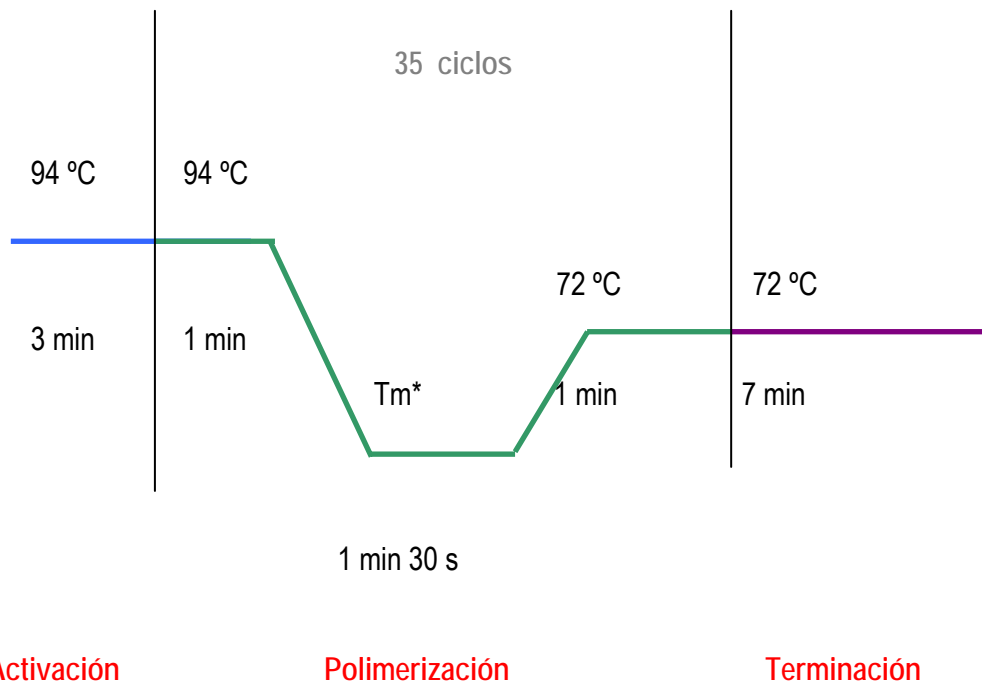


Fig. 1.6. Perfil de PCR, utilizado, con las respectivas condiciones de amplificación. T_m^* para EMO2 y EMO3 (58 °C), DCA18 (50 °C) y DCA9 (55 °C).

Obtenidos los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa de 1 % (Ultra Pure Gibco BRL) con 1 x TAE (Tris 40 mM; NaAc 20 mM; EDTA 1 mM) (Sambrook et al., 1989). La electroforesis se realizó a 100 V durante 1 hora, utilizándose como estándar de peso molecular 1 Kb y 100 bp “ADN ladder” (Gibco BRL). Los fragmentos amplificados de ADN se visualizaron en un transluminador UV y fueron fotografiados usando película Polaroid 667.

b) Electroforesis en geles de acrilamida y tinción con nitrato de plata

Después de la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de distintos individuos, se pueden visualizar los productos de amplificación en geles de agarosa resolutivos para ver las diferencias de tamaño que se quieren detectar. Los motivos repetidos de tri- o tetra-nucleótidos se pueden revelar de esta manera, pero los motivos de di-nucleótidos que, por otra parte, son los más abundantes, deben visualizarse en geles de acrilamida desnaturalizantes. La variación en tamaño de los productos de la PCR se debe a la diferencia en el número de las unidades repetidas en el microsatélite.

Para preparar el gel de acrilamida se limpia el cristal trasero (IPC) y el cristal delantero con agua miliQ. Preparar dos mezclas de "Bind Silane" (1,4 mL de etanol 95%, 10 μ L de ácido acético glacial y 3 μ L de bind silane) que se expanden sobre el cristal delantero. Sobre el cristal trasero

se distribuye "Repel Silane". A continuación se desgasifica en la bomba de vacío 100 mL de la solución de urea 7M y acrilamida 6%. Dejar polimerizar el gel al menos una hora y una vez polimerizado, el sistema se coloca en la base universal y se añade tampón TBE 1X tanto en la parte superior como en la inferior. Seguidamente se lleva a cabo el "pre-run" (10 min a 100 W) hasta que el gel esté a 40 °C de temperatura. Cargar las muestras previamente desnaturalizadas y en un tampón de carga que contiene formamida realizar la electroforesis durante 3-4 horas a 100W.

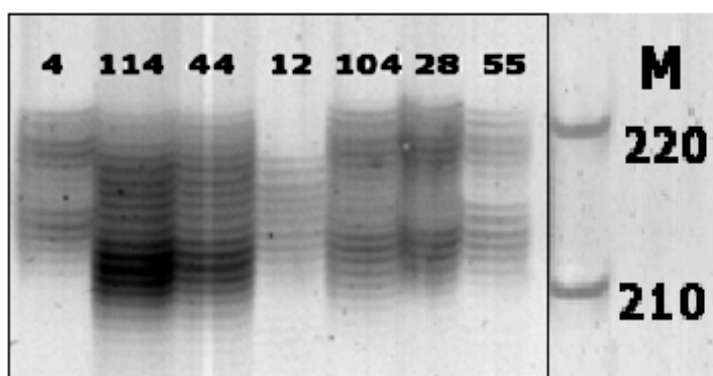


Fig. 1.7. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de amplificación del locus EMO3. Los números corresponden a diferentes accesiones analizadas. La letra "M" representa el marcador de peso molecular.

Finalizada la electroforesis se lleva a cabo la tinción del gel. Los alelos del SSR se pueden detectar usando diversos métodos: tinción con bromuro de etidio, nitrato de plata, radioisótopos o fluorescencia. En nuestro trabajo hemos utilizado la tinción con nitrato de plata. En la Fig. 1.7 se puede visualizar un ejemplo del resultado obtenido tras la electroforesis de los productos de amplificación de un microsatélite en geles de acrilamida y su posterior tinción con plata.

1.3.2.4. Análisis de los datos

a) Análisis estadístico

A partir de las 38 accesiones que dieron amplificación por PCR para los cuatro SSRs probados (Tabla 1.7) se calcularon una serie de valores estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables.

Los parámetros utilizados para evaluar la información dada por los 4 SSRs estudiados fueron: el número de alelos (A) y el número de alelos efectivos (A_e) por *locus* ($A_e = 1 / \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$, donde p_{ij} es la frecuencia del alelo j para el marcador i sumada a través de todos los fenotipos alélicos del *locus*). La “habilidad” de un marcador para discriminar entre dos cultivares al azar fue estimada para cada *locus* con el poder de discriminación ($PD = 1 - \sum_{j=1}^n g_{ij}$, donde g_{ij} es la frecuencia del genotipo j para el marcador i). Los valores de PD fueron utilizados para calcular la probabilidad de confusión [$C = \prod (1 - PD_i)$, donde PD_i es el poder de discriminación del marcador i], es decir, la probabilidad de que dos cultivares cualquiera tengan idénticos genotipos SSR excepto un solo cambio, considerando todo el *locus*.

La frecuencia alélica es un concepto utilizado para medir variación genética y se calcula mediante la fórmula $p(A) = [2(AA) + (Aa)] / 2n$, donde $2(AA)$ es dos veces el número de genotipos homocigotos con un alelo, (Aa) el número de heterocigotos con ese alelo, y $2n$ es 2 veces el número total de individuos de la muestra. Por otra parte, la frecuencia de un genotipo x viene dada por la fracción del número de individuos con el genotipo x entre el número de individuos totales.

El grado de polimorfismo fue cuantificado utilizando el contenido de información polimórfica (PIC, Anderson et al., 1993), también referenciado como “heterocigosidad esperada” por Powel et al., (1996) para soja, o “índice de diversidad” por Milbourne et al. (1997) para tomate:

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

Donde p_{ij} es la frecuencia del alelo j para el marcador i .

También se midió la “heterocigosidad observada” (H_o), parámetro ampliamente utilizado para medir la diversidad y la información generada por un marcador molecular. Se calcula dividiendo el número de individuos heterocigotos entre el número total de individuos.

b) *Análisis de similitud*

Los siguientes análisis se evaluaron a partir de las 25 denominaciones diferentes que amplificaron para los cuatro *loci*, que aparecen subrayadas en Tabla 1.7.

Para el análisis de la similitud existente entre las distintas accesiones se construyó una matriz de presencia/ausencia (1/0) de alelos en cada *locus*. Al ser el olivo una especie diploide, puede tener un mismo alelo (homocigoto), o dos alelos diferentes por *locus* (heterocigoto). Para los SSRs utilizados no hay descrita en la bibliografía la posibilidad de existencia de alelos nulos (los que conducen a ausencia de un determinado fenotipo).

La similitud genética entre cultivares fue analizada con el coeficiente de Jaccard (1908), cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{ij} = a/n-d$$

Donde: S_{ij} = similitud entre el individuo i y j

a = número de bandas compartidas por los individuos i y j

b = número de bandas presentes en i pero ausentes en j

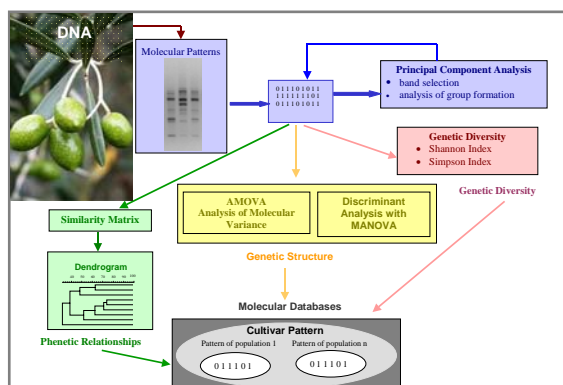
c = número de bandas presentes en j pero ausentes en i

d = número de bandas ausentes en ambos individuos.

$m = a+d$, $u = b+c$ y $n = u+m$.

La matriz de similitud se construyó con el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2002) utilizando el subprograma SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data). La matriz así generada fue introducida en el subprograma SAHN para construir el dendrograma usando el algoritmo de “unión media aritmética ponderada” (UPGMA: Unweighted Pair Group Method Average).

Con el objetivo de completar el estudio de la similitud se realizó a partir de la matriz inicial de presencia/ausencia un “análisis de correspondencia” (CA: Correspondence Analysis; Greenacre, 1984), disponible también en el programa NTSYS. Mediante este análisis se obtiene una representación análoga de las variables filas y columnas de la tabla de contingencia de frecuencias observadas. En el CA se utilizan distancias χ^2 para juzgar la proximidad entre las filas y columnas.



1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DEL OLIVO EN EXTREMADURA

Durante muchos años, los descriptores morfológicos (llamados descriptores primarios) han sido los únicos utilizados tanto para la identificación varietal de frutales, como para el análisis de conformidad del material vegetal y para la inscripción de nuevas variedades en el Catálogo oficial (Dosba y Saumier, 1998), inscripción que está condicionada por la satisfacción de los criterios DUE (Distinción, Uniformidad y Estabilidad). Debido a las características climáticas y orográficas de Extremadura, se ha permitido el desarrollo de múltiples variedades autóctonas. Actualmente, existe una caracterización morfológica y molecular de las más importantes variedades de olivo de Extremadura (“Manzanilla Cacereña”, “Verdial de Badajoz”, “Morisca” y “Pico Limón”) (Rallo et al., 2005), si bien esta caracterización no es completa y la identificación molecular de la mayoría de las variedades locales es desconocida hasta el momento.

Con la finalidad de caracterizar la biodiversidad varietal del olivo autóctono en Extremadura, como patrimonio genético de alto valor por su adaptación a las diferentes zonas climáticas y de suelo de la región, y por su valor ecológico en la conservación del suelo y contra la desertización, ha sido localizado el material cultivado de esta especie en la región (Anexo I). Aunque el rastreo fue muy exhaustivo, no podemos descartar que en algunas comarcas existan denominaciones distintas para estos mismos árboles o incluso que haya algunas variedades que no hayamos encontrado.

El número de términos municipales visitados en cada provincia ha dependido de la importancia y de la homogeneidad del olivar en la misma. Nuestro interés se ha centrado en variedades que se localizan en una sola zona donde tienen, generalmente, muy poca difusión. Al igual que en otras muchas zonas, el material vegetal del olivo cultivado en Extremadura está constituido por un gran número de variedades.

En total se han encontrado 48 denominaciones varietales (116 accesiones diferentes) cultivadas de olivo en Extremadura (Anexo I). Esta diversidad se debe probablemente al origen autóctono de las variedades, surgida de la probable selección de materiales diferentes en cada zona y de su restringida difusión en torno a la misma. La situación inicial se ha podido mantener debido a determinados factores. Entre ellos hay que destacar la escasa presión de selección aplicada por el hombre a esta especie, sobre todo en las zonas de baja intensidad de cultivo como las comarcas de sierra, donde los niveles de producción y rendimiento graso no han sido suficientemente críticos para conducir a la eliminación de las variedades o cultivares menos interesantes. Asimismo, la longevidad de las plantaciones limita la renovación varietal, salvo por sobre-injerto, lo que ha restringido la sustitución de cultivares.

El total de las denominaciones varietales encontradas podría dividirse en 4 grupos:

a) Variedades principales:

“Morisca”, “Gorda” (posible sinonimia de “Morisca”), “Manzanilla Cacereña”, “Cornezuelo” (sinonimia de “Cornicabra”), “Gordal”, “Manzanilla”, “Hojiblanca”, “Cornicabra”, “Corniche” (posible sinonimia de “Cornicabra”), “Verdial de Badajoz”, “Basta Extremeña” (posible sinonimia de “Morisca”), “Picual” y “Arbequina”.

b) Variedades secundarias:

“Pico Limón” y “Galega”.

c) Variedades locales catalogadas:

“Azulejo” (muestra de Berlanga, sur de la provincia de Badajoz), “Bical” (muestra de San Vicente de Alcántara, provincia de Badajoz), Carrasqueña (muestra de Los Santos de Maimona, provincia de Badajoz), “Limoncillo” (muestra de Don Benito y Talarrubias, provincia de Badajoz) y “Ocal” (muestra de Alburquerque, provincia de Badajoz),

d) Variedades locales no catalogadas previamente a este trabajo:

“Pico Real” (Berlanga), “Manzanilla Real” (Navalvillar de Pela), “Cuerno Real” (La Nava de Bequerencia de la Serena), “Colorá” (Villar del Rey-Alburquerque), “Pajonala” (San Vicente de Alcantara), “Azulito” (Monesterio), “Cañaveral” (Monesterio), “Jariego” (Monesterio), “Original” (Navalvillar de Pela), “Tempranillo” (Berlanga-Fuente del Arco), “Perito” (Berlanga), “Oliva” (Berlanga), “Cojón del Gallo” (La Nava de Bequerencia) y “Judiego” (Puebla de Alcocer).

Tabla 1.9. Número de Registro en el Banco de Germoplasma Mundial, difusión y superficie del total de superficie de olivar (%), dedicada al cultivo de las diferentes variedades autóctonas en Extremadura localizadas con este trabajo en los años 2006, 2007 y 2008. *Datos de la Junta de Extremadura del año 2000.

VARIEDAD AUTOCTONA DE EXTREMADURA	NUEVA VARIEDAD	Nº REGISTRO BANCO DE GERMOPLASMA MUNDIAL	DIFUSIÓN	% DE LA SUPERFICIE TOTAL DEL OLIVAR* EN EXTREMADURA
“Cañaveral”	●		Variedad local	2
“Cuerno Real”	●		Variedad local	<1
“Jariego”	●		Variedad local	<1
“Pajonala”	●		Variedad local	<1
“Pico Real”	●		Variedad local	<1
“Azulejo”		0959	Variedad local	<1
“Azulito”	●		Variedad local	<1
“Carrasqueña”		0494	Variedad local	13
“Cojón del Gallo”	●		Variedad local	<1
“Colora”	●		Variedad local	<1
“Judiego”	●		Variedad local	<1
“Manzanilla Cacerense”		0123	Variedad principal	17
“Manzanilla Real”	●		Variedad local	<1
“Morisca”		0017	Variedad principal	12
“Oliva”	●		Variedad local	<1
“Original”	●		Variedad local	<1
“Perito”	●		Variedad local	<1
“Pico Limón”		0273	Variedad secundaria	3
“Tempranillo”	●		Variedad local	<1
“Verdial de Badajoz”		0877	Variedad principal	13

De nuestros resultados podemos concluir que el cultivo del olivo en Extremadura esta basado, al menos, en 20 variedades autóctonas de las 12 Comarcas Oleícolas que conforman la región (Tabla 1.9), de las cuales 14 podrían ser consideradas nuevas variedades (Fig. 1.8), al no encontrarse incluidas en las 358 variedades de olivo que constituyen el Banco de Germoplasma Mundial, cuyo responsable es el Equipo de Mejora del Material Vegetal de Olivicultura del CIFA "Alameda del Obispo" (Córdoba).

Por lo tanto, este trabajo ha permitido crear una Colección de las variedades de olivo cultivadas en Extremadura durante los años 2006, 2007 y 2008 (Anexo I), que comprende un total de 48 denominaciones varietales (116 accesiones diferentes), y clasificar 14 nuevas variedades autóctonas (Fig. 1.8) de olivo recogidas en este trabajo.



Fig. 1.8. Situación geográfica de las 14 nuevas variedades autóctonas de olivo en Extremadura.

1.4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA INDIVIDUALIZADA DE LAS VARIEDADES DE OLIVO CULTIVADAS EN EXTREMADURA

Considerando la importancia del cultivo del olivo a nivel regional, en el presente trabajo de Tesis se realizó una caracterización morfológica individualizada de la totalidad de 116 accesiones diferentes que corresponden a 48 variedades cultivadas y silvestres de Extremadura, incluyendo variedades de otros orígenes, a partir de árboles cultivados en la región durante los años 2006, 2007 y 2008.

Para este trabajo de prospección e inventario de variedades de olivo en Extremadura se ha utilizado el esquema pomológico publicado por Barranco y Rallo (1984) y el Consejo Oleico Internacional (COI). En general, el esquema pomológico establecido incluye 55 caracteres del árbol, ramo, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpo. Actualmente, el esquema empleado reduce el número de caracteres a 32 (Trujillo y Barranco, 1999). Sin embargo, los métodos morfológicos poseen ciertos inconvenientes, tales como su dependencia de las condiciones ambientales, la necesidad de usar un número elevado de caracteres y el hecho de que requieren el empleo de órganos no siempre presentes (fruto y endocarpo).

Los parámetros o caracteres morfológicos evaluados en este trabajo para cada denominación varietal han sido los siguientes: hoja (4 parámetros), fruto (13 parámetros) y endocarpo (13 parámetros). La descripción morfológica de las 116 accesiones, que corresponden a las 48 variedades diferentes cultivadas en la región incluyendo las variedades autóctonas de Extremadura, se ha realizado según los caracteres de la hoja, del fruto y del endocarpo

Para realizar la monografía completa de las variedades de olivo en Extremadura hemos realizado una ficha varietal de cada variedad que contiene:

- El nombre del cultivar
- Una fotografía que muestra la fructificación típica de la variedad
- Sinonimias
- Zona de origen de la muestra
- La descripción morfológica de la variedad:
 - Caracteres de hoja adulta
 - Caracteres del fruto
 - Caracteres del endocarpo

1.4.2.1. Monografía de las variedades autóctonas de olivo cultivadas en Extremadura

De las 48 variedades cultivadas en Extremadura y caracterizadas morfológicamente se presenta la monografía de las 20 variedades autóctonas de olivo: "Azulejo", "Azulito", "Carrasqueña", "Cañaveral", "Cojón del Gallo", "Colora", "Cuerno Real", "Jariego", "Judiego", "Manzanilla Cacerense", "Manzanilla Real", "Morisca", "Oliva", "Original", "Pajonala", "Perito", "Pico Limón", "Pico Real", "Tempranillo" y "Verdial de Badajoz". Asimismo, se presenta la monografía de variedades de olivo de amplia distribución, cultivadas en la región y caracterizadas molecularmente en este trabajo.

FICHA VARIETAL	PÁGINA
"AZULEJO"	56
"AZULITO"	58
"CARRASQUEÑA"	60
"CAÑAVERAL"	62
"COJÓN DEL GALLO"	64
"COLORA"	66
"CUERNO REAL"	68
"JARIEGO"	70
"JUDIEGO"	72
"MANZANILLA CACEREÑA"	74
"MANZANILLA REAL"	76
"MORISCA"	78
"OLIVA"	80
"ORIGINAL"	82
"PAJONALA"	84
"PERITO"	86
"PICO LIMÓN"	88
"PICO REAL"	90
"TEMPRANILLO"	92
"VERDIAL DE BADAJOZ"	94
"ACEBUQUE"	96
"ARBEQUINA"	98
"BICAL"	100
"CORNICABRA"	102
"CORDOVIL"	104
"FINA"	106
"GALEGA"	108
"GORDAL"	110
"HOJIBLANCA"	112
"LIMONCILLO"	114
"OCAL"	116
"PICUAL"	118

“Azulejo”



- Denominación
“Azulejo”, variedad local.
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Monesterio y Llerena, al sur de la provincia de Badajoz.
- Consideraciones agronómica:
Variedad muy poco apreciada por el agricultor por su escasa productividad.
Usos: aceite.



“Azulejo”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio-elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Azulito”



- Denominación
“Azulito”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Monesterio (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Azulito”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y escasas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Cañaveral”



- Denominación
“Cañaveral”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en la localidad de Monesterio (Badajoz). Se cultiva en el sur de la provincia de Badajoz, aunque a nivel local, por lo que su cultivo es puntual y no está extendido.
- Consideraciones agronómicas
- Usos: aceite.



“Cañaveral”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *lanceolada*
 LONGITUD: *larga*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *alto*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Carrasqueña”



- Denominación
“Carrasqueña”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en la localidad de Los Santos de Maimona (Badajoz). Se cultiva en el sur de la provincia de Badajoz, aunque a nivel local, por lo que su cultivo no está extendido.
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Carrasqueña”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *redondeada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *rojo vinoso*

HOJA

LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 FORMA: *elíptico - lanceolada*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia el ápice*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 ERMINACIÓN DEL ÁPICE: *sin mucrón*



“Cojón del Gallo”



- Denominación
“Cojón del Gallo”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz).
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Cojón del Gallo”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntada*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *larga*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *epinástica*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Colorá”



- Denominación
“Colorá”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Villar del Rey-Alburquerque (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



"Colorá"

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrica*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *rojo vinso*

HOJA

FORMA: *elíptica*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL
 LIMBO: *epinástica*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucón*



“Cuerno Real”



- Denominación
“Cuerno Real”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Navalvillar de Pela y La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Cuerno Real”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *media*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *elíptico-lanceolada*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *epinástica*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *alto*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Jariego”



- Denominación
“Jariego”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Monesterio (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Jariego”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *esbozado*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *corta*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Judiego”



- Denominación
“Judiego”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia
localizada en Puebla de Alcocer (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Judiego”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado o hacia la base*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *alto*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*

HOJA

FORMA: *lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *epinástica*



“Manzanilla Cacereña”



▪ Denominación: Esta variedad es conocida con numerosas sinonimias en su amplia zona de cultivo. Entre las más utilizadas están: *Albareña, Alvellanina, Asperilla, Blanca, Cacereña, Carrasqueño, Costalera, de Agua, Hembra, Manzanil, Manzanilla, Morillo, Negrillo, Perito, Redonda, Redondilla* y *Turiel* en España. En Portugal se le encuentran las denominaciones *Aceiteira, Aceitoneira* y *Negrinha*.

▪ Origen
Español

▪ Difusión
Es variedad principal en las provincias de Cáceres, Badajoz, Salamanca, Ávila y Madrid. También se encuentra muy difundida en Portugal.

▪ Consideraciones agronómicas: Variedad poco vigorosa cuya capacidad de enraizamiento es muy elevada. Su época de floración es temprana y es considerada autocompatible y de bajo porcentaje de aborto ovárico. Su entrada en producción es precoz y la productividad elevada y constante. La maduración de sus frutos es temprana y presentan baja fuerza de retención, que facilita su recolección mecanizada. Variedad con doble aptitud. Es muy apreciada para su aderezo, tanto en verde como en negro, por la calidad de su pulpa. Se la considera de buena adaptación a suelos pobres y al frío invernal. Es susceptible a verticilosis y tolerante a mosca y tuberculosis.

▪ Usos: aceite y aceituna de mesa.



“Manzanilla Cacereña”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Manzanilla Real”



- Denominación
“Manzanilla real”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia
localizada en Navalvillar de Pela (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
- Usos: aceite y acetuna de mesa.



“Manzanilla Real”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y escasas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *larga*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrica*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 SUPERFICIE: *escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *junto a la sutura*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón muy pequeño*



“Morisca”



- Denominación

“Morisca”, variedad principal. Esta variedad es conocida en su zona de cultivo fundamentalmente con las denominaciones de *Basta* y *Morisca*. Se ha preferido usar esta última por ser menos ambigua. Otras sinonimias empleadas para esta variedad son: *Cañaval blanco*, *Cañaval negro*, *Cordovil*, *Churro*, *Cornezuelo*, *De Pico*, *Gorda*, *Macho* y *Verdial en España*. En Portugal es conocida con la denominación de *Conserva de Elvas*.

- Origen
Español

- Difusión.

Esta variedad ocupa en España más de 75000 ha, fundamentalmente en el sur de la provincia de Badajoz y en el norte de Sevilla. En Portugal se cultiva en el Alentejo.

- Consideraciones agronómicas: Su capacidad de enraizamiento por estaquillado semileñoso es media y su capacidad de brotación, tras una poda severa, es limitada. La época de floración es media y suele presentar elevados porcentajes de aborto ovárico. La precocidad de entrada en producción es media y la productividad media y alternante. La época de maduración de sus frutos es media y presentan una elevada resistencia al desprendimiento, que dificulta la recolección. Variedad apreciada para aceite, por su elevado rendimiento graso, y para mesa, por su tamaño y facilidad de aderezo. Variedad resistente a la sequía que la hace recomendable como patrón de variedades más susceptibles. Se considera susceptible a repilo y tuberculosis y susceptible a lepra y mosca.

- Usos: aceite.



“Morisca”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Oliva”



- Denominación
“Oliva”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad local de escasa importancia localizada en Berlanga (sur de Badajoz).
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



"Oliva"

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia el ápice*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *estrecha*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Original”



- Denominación
“Original”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en Navalvillar de Pela (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Original”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *larga*
 LONGITUD: *ancha*
 ANCHURA: *elíptico-lanceolada*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *alto*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *agrupados*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *sin mucrón*



“Pajonala”



- Denominación
- “Pajonala”, variedad local

- Origen
Español

- Difusión
Variedad localizada en San Vicente de Alcantara
(Badajoz)

- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Pajonala”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *medio*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Perito”



- Denominación
“Perito”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en Berlanga (sur de Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Perito”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *media*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *elíptico-lanceolada*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Pico Limón”



- Denominación: “Pico limón”, variedad secundaria. La denominación hace referencia a la presencia de un pezón conspicuo del fruto. También se ha encontrado con la sinonimia *Pico Cuervo* en Arroyo de la Luz.

- Origen
Español

- Difusión
Es una de las variedades más importantes de la Sierra Norte de Sevilla donde ocupa casi 7.000 ha. También se encuentra en las provincias de Huelva y Badajoz (sur de la provincia).

- Consideraciones agronómicas: Variedad productiva. Su época de floración es media. En su zona de cultivo es apreciada tanto por la calidad de su aceite como para aderezo casero. Se considera susceptible a la mosca.

- Usos: aceite.



“Pico Limón”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA:
 GRADO DE SIMETRÍA: *alargada*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *asimétrico*
 ÁPICE: *centrado*
 BASE: *apuntado*
 PEZÓN: *evidente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *corta-media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES:
medio
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Pico Real”



- Denominación
“Pico Real”, variedad local
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en Berlanga (sur de Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Pico Real”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *rojo vinoso*

HOJA

FORMA: *elíptica*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 SUPERFICIE: *escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *bajo*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *junto a la sutura*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Tempranillo”



- Denominación
- “Tempranillo”, variedad local

- Origen
- Español

- Difusión
- Variedad localizada en Berlanga y Fuente del Arco (sur de Badajoz)

- Consideraciones agronómicas
- Usos: aceite.



“Tempranillo”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *hiponástica*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntada*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Verdial de Badajoz”



- Denominación.

Esta variedad es conocida en su zona de cultivo con numerosas sinonimias como Macho, Manzanilla, manzanilla rabuda, Mollar, Original, Verdial y Zorzaleño. Se ha adoptado la denominación “Verdial de Badajoz” por ser esta su principal provincia de cultivo y para distinguirla de otras variedades de igual denominación genérica

- Origen
Español

- Difusión. Variedad principal que ocupa cerca de 29000 ha en las provincias de Badajoz y Cáceres.

- Consideraciones agronómicas.

Esta variedad presenta escasa capacidad de enraizamiento. Su época de maduración es tardía con una resistencia al desprendimiento media. Variedad apreciada por su productividad elevada y constante, tamaño de fruto y contenido en aceite. También se utiliza para aderezo en verde. Variedad rústica de gran adaptación a suelos pobres pero sensible al frío invernal. Se considera susceptible a repilo, tuberculosis y mosca.

- Usos: aceite.



“Verdial de Badajoz”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *larga*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia el ápice*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Acebuche”



- Denominación.
'Acebuche', olivo silvestre. Esta denominación se aplica a todos aquellos árboles procedentes de semilla.

- Origen
Español

- Difusión.
Es la variedad a partir de la cuál se comenzó a practicar el cultivo del olivo. De los bosques silvestres de 'Acebuche' se fueron seleccionando diferentes caracteres de consideración agronómicas y comerciales para posteriormente ser cultivados y seguir siendo seleccionados con el objetivo de potenciar la mejora en la producción y la adaptabilidad al medio de cultivo.



- Consideraciones agronómicas
- Usos: repoblación, ganado y ornamental.

"Acebuche"

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *bajo*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y escasas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptica*
 LONGITUD: *corta*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *bajo*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *lisa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES.: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV: *junto a la sutura*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Arbequina”



▪ Denominación.

“Arbequina”, variedad principal. Toponímico de Arbeca, localidad de Lérida donde se supone que se inició su cultivo. Una sinonimia es la denominación Blanca en Balbastro.

▪ Origen. Español

▪ Difusión. Es la variedad más importante de Cataluña donde ocupa más de 55.000 ha. También se encuentra ampliamente difundida en Aragón y, recientemente, en Andalucía, donde ocupa más de 20.000 ha en plantaciones intensivas. En Extremadura se encuentra en Olivenza (Badajoz).

▪ Consideraciones agronómicas. Esta variedad posee una capacidad de enraizamiento elevada. Su vigor es reducido lo que permite su utilización en plantaciones intensivas, de precoz entrada en producción, y de productividad elevada y constante. Su época de floración es media y es considerada autocompatible. La fuerza de retención de sus frutos es media, pero su pequeño calibre dificulta la recolección mecánica con vibrador de troncos. El rendimiento graso es elevado y la calidad de su aceite excelente, principalmente por sus buenas características organolépticas, aunque presenta baja estabilidad. Es la variedad base de las denominaciones de Origen catalanas “Les Garrigues” (Lleida) y “ciurana” (Tarragona). Variedad resistente al frío, tolerante a la salinidad y susceptible a la clorosis férrica en terrenos muy calizos. Es considerada susceptible a la mosca y verticilosis y tolerante a repilo. Usos: aceite.



“Arbequina”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *bajo*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia la base*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y escasas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *corta*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *bajo*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *lisa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *bajo*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Bical”



- Denominación. Variedad conocida sólo con la denominación de *Bical*.
- Origen: Español.
- Difusión. Se cultiva en la comarca de Sierra de la provincia de Huelva y también en el Alentejo en Portugal. La superficie cultivada en España asciende a 2.000 ha. En Extremadura se encuentran principalmente en Berlanga y Fuente del Arco (sur de Badajoz).
- Consideraciones agronómicas. Es considerada una variedad productiva y su entrada en producción es de media a tardía. Se adapta fácilmente a la recolección mecanizada. El rendimiento graso es medio y su aceite presenta buenas características organolépticas. Se destina principalmente para aceite, aunque otros autores destacan la calidad de su fruto para mesa. Variedad con una buena adaptación a su zona de cultivo. Se considera tolerante a repilo.
- Usos: aceite y acetuna de mesa.



"Bical"

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *epinástica*

ENDOCARPO

PESO: *medio*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Cornicabra”



▪ Denominación

“Cornicabra” es una variedad principal conocida con diversas denominaciones que, generalmente que hacen referencia a la forma curvada o alargada de su fruto como *Cabrilla, Cornal, Cornatillo, Cornetilla, Cornezuelo, Cornicabra Basta, Cornicabra Negra, Corniche, Corniche Menudo, Cornita, Corriente, Corval, Cuernecillo, del Piquillo, Longar, Longuera, Ornal, Osnal*.

▪ Origen

Español

▪ Difusión

Es la segunda variedad española en cuanto a superficie cultivada. Actualmente ocupa más de 270.000 ha en las provincias de Ciudad Real, Toledo, Madrid, Badajoz y Cáceres. Variedad localizada en la Puebla de Alcocer (Badajoz).

▪ Consideraciones agronómicas: Su entrada en producción es tardía y presentan elevada resistencia al desprendimiento, lo que dificulta su recolección mecanizada. Es apreciada por su elevado rendimiento graso y por la calidad de su aceite, de elevada estabilidad. También es utilizada para aderezo por la calidad de su pulpa. Variedad de gran adaptación a suelos pobres y zonas secas y frías.

▪ Usos: aceite y aceituna de mesa



“Cornicabra”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *medio*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *abundantes y pequeñas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *rojo vinoso*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *medio*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *sin mucrón*



“Cordovil”



- Denominación
“Cordovil”.
- Origen
Español
- Difusión
Variedad localizada en Villar del Rey (Badajoz)
- Consideraciones agronómicas
Usos: aceite.



“Cordovil”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *esbozado*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *epinástica*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *alto*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Fina”



- Denominación
“Fina”, homonimia de ‘Picual’ en Castuera.
- Origen
Español
- Difusión. Variedad localizada en La Nava de Benquerencia (Badajoz).
- Consideraciones agronómicas
- Usos: aceite.



“Fina”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *corta*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa-escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *junto a la sutura*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *sin mucrón*



“Galega”



▪ Denominación. “Galega”, variedad secundaria. En España se ha localizado con esta única denominación. En Portugal, su país de origen, se la encuentra con las denominaciones: *Galega*, *Galega Vulgar*, *Molar*, *Molarian*, *Negroa* y *Negrucha*

▪ Origen
Portugal

▪ Difusión.

Se encuentra como variedad difundida en las sierras de Huelva y en la comarca de Alburquerque en Badajoz. Es la variedad más importante de Portugal, donde representa cerca del 80% de la superficie total dedicada en este país al cultivo del olivo.

▪ Consideraciones agronómicas.

La capacidad de enraizamiento de esta variedad es baja. Su entrada en producción es precoz y su productividad se considera elevada pero muy alternante. La época de maduración de sus frutos es temprana y suelen presentar elevada resistencia al desprendimiento, lo que dificulta su recolección. Se destina fundamentalmente para la obtención de aceite que se considera de calidad, aunque el rendimiento graso es bajo. Variedad apreciada por su tolerancia a la sequía y a la humedad en el suelo. sin embargo es sensible al frío y a la caliza. Se muestra resistente a verticilosis y repilo, pero susceptible a tuberculosis, lepra y mosca.

Usos: aceite.



“Galega”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *bajo*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y muy escasas*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO:

ENDOCARPO

PESO: *medio*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Gordal”



- Denominación

“Gordal”, variedad principal. Esta variedad aparece principalmente con las denominaciones Gordal y Sevillano que hacen referencia al tamaño de su fruto y a su principal zona de cultivo respectivamente.

- Origen
Español

- Difusión. Variedad localizada en Hornachos y San Vicente de Alcántara (Badajoz). Es una variedad de mesa muy difundida internacionalmente. Su cultivo en España se concentra en la provincia de Sevilla, aunque está difundida en todas las comarcas olivícolas

- Consideraciones agronómicas: Variedad vigorosa cuando está injertada, presenta menor vigor en sus raíces. Su precocidad de entrada en producción es media. Su época de floración es media, se considera autoincompatible, de elevado aborto ovárico y con polen de muy baja germinabilidad. Su productividad es baja y alternante. La época de maduración de sus frutos es precoz y se destinan exclusivamente para aderezo, pues su contenido en aceite es muy bajo y de mala calidad.

- Usos: aceituna de mesa.



“Gordal”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *estrecha*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *escabrosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *junto a la sutura*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Hojiblanca”



- Denominación. “Hojiblanca”, variedad principal. Esta denominación hace referencia al color claro de sus hojas. También se le conoce en diversas localidades cordobesas con las sinonimias de *Casta de Lucena* en Cabra y *Lucentino* en Baena, cabra y castro del Río.

- Origen. Español.

- Difusión. Es la tercera variedad española en cuanto a superficie cultivada. Actualmente se cultiva principalmente en las provincias de Córdoba, Málaga, Sevilla y Granada. En Extremadura se encuentra localizada puntualmente en Talarrubias (Badajoz).

- Consideraciones agronómicas. La precocidad de entrada en producción de esta variedad es media y su productividad elevada y alternante. La época de floración es de media a tardía y es autocompatible y con polen de mediana calidad. Su capacidad de enraizamiento se considera media. La maduración es tardía y sus frutos presentan elevada resistencia al desprendimiento que dificulta su recolección mecanizada. Tienen doble aptitud y se consideran muy adecuadas para el aderezo en negro tipo californiano, por la textura firme de su pulpa. Su contenido en aceite es bajo pero muy apreciado por su calidad, aunque presenta baja estabilidad. La separación de la pulpa del hueso es difícil. Variedad resistente a suelos calizos, sequía y tolerante al frío invernal. Se la considera resistente a repilo, tuberculosis y verticilosis. Tampoco destaca por su resistencia a mosca y lepra. Usos: aceite y aceituna de mesa.



“Hojiblanca”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *esférica*
 GRADO DE SIMETRÍA: *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *estrecha*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *elíptica*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *simétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *bajo*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Limoncillo”



- Denominación
“Limoncillo”, variedad secundaria. Esta denominación se debe a la presencia en el fruto de un pronunciado pezón similar al de un limón.
- Origen
Español
- Difusión.
Se encuentra difundida con poca importancia en Don Benito (Badajoz).
- Consideraciones agronómicas:
Las épocas de floración y maduración son tardías. Variedad de productividad media y alternante. Su fruto se utiliza para aderezo casero. Se considera susceptible a la sequía y tolerante a la humedad. Parece susceptible a tuberculosis.
- Usos: aceite.



“Limoncillo”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada-redondeada*
 PEZÓN: *evidente*
 LENTICELAS: *abundantes y grandes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro-violeta*

HOJA

FORMA: *elíptica-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *hiponástica*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *hacia el ápice*
 ÁPICE: *apuntado-redondeado*
 BASE: *apuntada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Ocal”



- Denominación. “Ocal”, variedad local.
- Origen Español
- Difusión. Variedad localizada en Alburquerque (Badajoz). Variedad difundida también en las comarcas sevillanas Estepa y Campiña, y en toda la provincia de Córdoba donde ocupa cerca de 500 ha. También se localiza como variedad local en las provincias de Badajoz y Cádiz.
- Consideraciones agronómicas. Su productividad es de media a elevada. La época de maduración de sus frutos es temprana. Se destinan para la obtención de aceite por su elevado contenido graso y también para verdeo, por el gran tamaño de su fruto. Se considera tolerante a la sequía y al frío y susceptible a repilo, mosca y tuberculosis
- Usos: aceite y aceituna de mesa.



“Ocal”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *muy elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *ausente*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptica*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *media*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *ligeramente asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *ligeramente asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *rugosa*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *con mucrón*



“Picual”



- Denominación. “Picual”, variedad principal. La denominación de este cultivar hace referencia a la forma apuntada que presentan sus frutos. También se ha encontrado con las siguientes sinonimias: *Andaluza, Blanca, Corriente, de Aceite, de calidad, Fina, Grosal, Jabata, Lopereño, Martaña, Morcona, Nevadillo, Nevadillo blanco, Nevado, Nevado Blanco, Picúa, Redondilla, Salgar, Sevillano y Temprana*.
- Origen. Español. Difusión. Es la variedad más importante de España. Actualmente ocupa en Andalucía más de 850.000 ha, dominando en las provincias de Jaén (97%), Córdoba (38%) y Granada (40%). Es la base de las nueve plantaciones de todo el país. En Extremadura se encuentra en el centro y sur de la provincia de Badajoz.
- Consideraciones agronómicas. Variedad de fácil propagación vegetativa por estaca y por estaquillado semileñoso. Presenta elevada capacidad de brotación tras podas severas. La entrada en producción es precoz y su productividad es elevada y constante. Su época de floración es media y se considera autofértil. La época de maduración de sus frutos es precoz y presenta una baja resistencia al desprendimiento que facilita la recolección mecanizada de los mismos. Es muy apreciada por su elevado rendimiento graso y por su facilidad de cultivo. La apreciación de su aceite es media, aunque destaca por un índice alto de estabilidad, que implica una gran resistencia al enraizamiento, y por un porcentaje en ácido oleico muy elevado. Variedad rústica por su adaptación a diversas condiciones de clima y suelo. Sin embargo es sensible a la sequía y a terrenos calizos. Es una variedad tolerante a tuberculosis y lepra, pero muy susceptible a repilo y verticilosis. También es sensible a la mosca. Usos: aceite.



“Picual”

CARACTERES MORFOLÓGICOS

FRUTO

PESO: *elevado*
 FORMA: *ovoidal*
 GRADO DE SIMETRÍA: *asimétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *redondeado*
 BASE: *truncada*
 PEZÓN: *esbozado*
 LENTICELAS: *pequeñas y abundantes*
 COLOR EN MADURACIÓN: *negro*

HOJA

FORMA: *elíptico-lanceolada*
 LONGITUD: *media*
 ANCHURA: *estrecha*
 CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO: *plana*

ENDOCARPO

PESO: *elevado*
 FORMA: *alargada*
 GRADO DE SIMETRÍA (A): *asimétrico*
 GRADO DE SIMETRÍA (B): *simétrico*
 DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO: *centrado*
 ÁPICE: *apuntado*
 BASE: *redondeada*
 SUPERFICIE: *escabroso*
 NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES: *medio*
 DISTRIBUCIÓN SURCOS FIBROV.: *uniforme*
 TERMINACIÓN DEL ÁPICE: *sin mucrón*



1.4.2.2. Establecimiento de semejanzas y sinonimias a partir de la caracterización morfológica

Una vez hecha la caracterización morfológica, se ha procedido a comparar las variedades al objeto de establecer posibles sinonimias entre ellas. En general, el esquema pomológico establecido incluye 55 caracteres del árbol, ramo, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpo, siendo estos dos últimos los que permiten una mayor discriminación varietal gracias a su mayor variabilidad y a la estabilidad de los caracteres. Actualmente, el esquema empleado reduce el número de caracteres a 32 (Trujillo y Barranco, 1999). Sin embargo, los métodos morfológicos poseen ciertos inconvenientes, tales como su dependencia de las condiciones ambientales, la necesidad de usar un número elevado de caracteres y el hecho de que requieren el empleo de órganos no siempre presentes (fruto y endocarpo).

Las variedades cultivadas en Extremadura se han agrupado por su semejanza en cada uno de los caracteres de la hoja, fruto y endocarpo, siendo los caracteres del endocarpo los que ha permitido una mayor discriminación varietal (datos no mostrados).

Se ha obtenido un dendograma de las variedades según los parámetros morfológicos de la hoja, fruto y endocarpo (Fig. 1.9). El "Acebuche", olivo silvestre, aparece muy distinto al resto de las variedades a pesar de que se supone que todos los olivos cultivados derivan de él. Las variedades más diferentes al resto, según los parámetros morfológicos, han sido la "Manzanilla Real" y "Pico Real", dos posibles variedades locales de Navalvillar de Pela y Berlanga (Badajoz), respectivamente.

Los resultados obtenidos han demostrado que los marcadores morfológicos son útiles para la identificación de las variedades de olivo, reflejando un alto grado de variabilidad entre ellas, y además, para el establecimiento de algunas sinonimias, como las que se incluyen a continuación:

- "Bical" y "Hojiblanca"
- "Oliva" y "Cordovil"
- "Corniche" y "Cornicabra"

Cada par de estas variedades (sinonimias) presentan un mismo fenotipo en base a los caracteres de la hoja, fruto y endocarpo, considerándose idénticas entre sí (Fig. 1.9). Por lo tanto, es importante disponer de otros métodos capaces de detectar el grado de polimorfismo genético esperado entre ellas. La

necesidad está ampliamente justificada por el hecho de que la producción agrícola depende en gran medida de la variedad de olivo elegida (Hilali y El Anati, 1994).

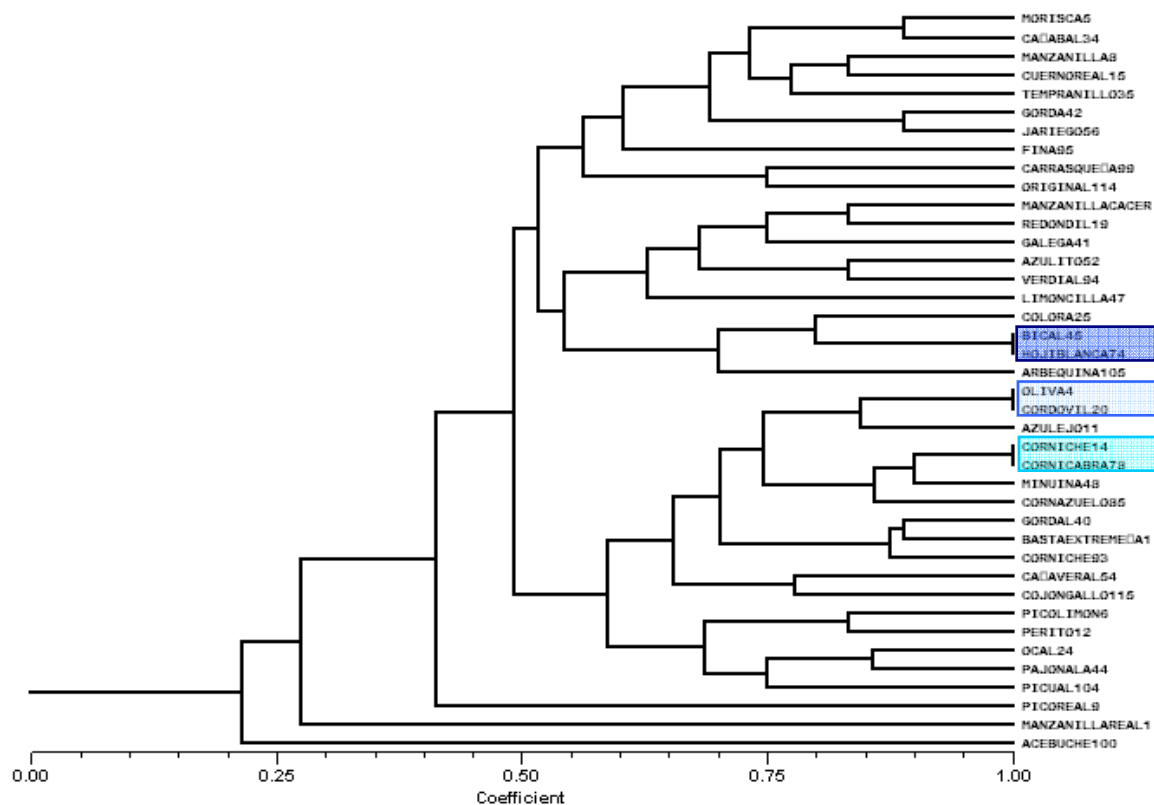


Fig. 1.9. Dendrograma de las variedades de olivo de Extremadura según los parámetros morfológicos de la hoja, fruto y endocarpo, basado en el agrupamiento de coeficientes Nei y Li. (1979), según método UPGMA.

En conclusión, los resultados demuestran que los marcadores morfológicos han sido útiles para la identificación de las variedades de olivo extremeñas, reflejando un alto grado de variabilidad entre ellas; siendo los caracteres del endocarpo los que han permitido una mayor discriminación varietal gracias a su mayor variabilidad y a la estabilidad de los caracteres.

1.4.3. IDENTIFICACIÓN VARIETAL: APLICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES A VARIEDADES AUTÓCTONAS DE OLIVO DE EXTREMADURA

Para la identificación varietal se ha puesto a punto un método fácil y rápido de extracción de ADN para el olivo. La extracción de ADN de hojas jóvenes, realizada según la metodología descrita para el olivo por Angiolillo et al. (1999) modificada, permitió obtener buenos resultados, con concentraciones entre 300 y 3000 ng/ μ L de ADN a partir de 1 g de hoja.

Para el análisis de la variabilidad genética de las distintas denominaciones de olivo cultivado en Extremadura, se puso a punto la técnica de tipo SSR en nuestro laboratorio y en general, se eligieron las variedades autóctonas de Extremadura (principales, secundarias, difundidas y locales) próximas geográficamente en su procedencia. De esta manera se podría calibrar el poder de esta técnica para distinguir variedades semejantes genéticamente. Para ello, se analizaron 59 accesiones que corresponden a 34 denominaciones varietales que representan a las principales variedades cultivadas en la región (ver “Materiales y Métodos”).

El estudio de la identificación de estas variedades de olivo se ha realizado utilizando 4 ADN microsatélites o loci SSR (EMO2, EMO3, DCA9 y DCA18), descritos previamente en olivo (Sefc et al., 2000; De la Rosa et al., 2002; Rallo et al., 2003). De las 59 accesiones 38 mostraron resultados reproducibles para el conjunto de los cuatro SSR, representando a 25 denominaciones varietales o variedades diferentes (Tabla 1.10). El resto de accesiones sólo amplificaron para algunos de los microsatélites ensayados.

En el análisis de estas 25 variedades de olivo cultivado, el número de alelos para cada uno de los microsatélites seleccionados se presentan en la Tabla 1.11. Veinticinco alelos han sido detectados de los 4 loci SSR cuando estas 25 variedades de olivo han sido analizadas.

El número de alelos por locus osciló de 4 (EMO2) a 8 (DCA18), siendo inferior al número descrito por De la Rosa et al. (2002) para los microsatélites EMO2 y EMO3, y Sefc et al. (2000) para los microsatélites DCA9 y DCA18. Esto puede ser debido al tamaño de la población en estudio, y a la aptitud conservadora a la hora de asignar los distintos alelos presentes en cada locus. El número de alelos efectivos (A_e) únicamente nos indica el número medio de alelos que son polimórficos con respecto al total.

Tabla 1.10. El número de registro y la localidad de las 25 denominaciones varietales de olivo utilizadas para evaluar la variabilidad genética del olivar con microsatélites.

Nº REGISTRO	DENOMINACIÓN VARIETAL	AMPLIFICACIÓN 4 SSRs o loci	LOCALIDAD (PROVINCIA)
100	" <u>Acebuche</u> "	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
105	" <u>Arbequina</u> "	●	Olivenza (Badajoz)
11	" <u>Azulejo</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
52	" <u>Azulito</u> "	●	Monasterio (Badajoz)
93	" <u>Cornicabra</u> "	●	Puebla de Alcocer (Badajoz)
2	" <u>Carrasqueña</u> "	●	Santos de Maimona (Badajoz)
25	" <u>Colorá</u> "	●	Alburquerque (Badajoz)
98	" <u>Cuerno Real</u> "	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
95	" <u>Fina</u> "	●	La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz)
41	" <u>Gallega</u> "	●	San Vicente de Alcántara (Badajoz)
32	" <u>Gordal</u> "	●	Hornachos (Badajoz)
92	" <u>Manzanilla Sevillana</u> "	●	Puebla de Alcocer (Badajoz)
84	" <u>Manzanilla Cacereña</u> "	●	Alía (Cáceres)
13	" <u>Manzanilla Real</u> "	●	Navalvillar de Pela (Badajoz)
48	" <u>Minuina</u> "	●	Don Benito (Badajoz)
5	" <u>Morisca</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
24	" <u>Ocal</u> "	●	Alburquerque (Badajoz)
4	" <u>Oliva</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
114	" <u>Original</u> "	●	Navalvillar de Pela (Badajoz)
12	" <u>Perito</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
104	" <u>Picual</u> "	●	Olivenza (Badajoz)
6	" <u>Pico Limón</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
9	" <u>Pico Real</u> "	●	Berlanga (Badajoz)
19	" <u>Redondil</u> "	●	Villar del Rey (Badajoz)
58	" <u>Verdial de Badajoz</u> "	●	Mérida (Badajoz)

El contenido de información polimórfica (PIC) evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Su valor oscila entre 0 y 1. Cuando su valor es inferior a 0.25 el marcador es poco informativo; si oscila entre 0.25 y 0.5, tenemos un marcador medianamente informativo; y por último, valores superiores a 0.5 nos indican que nuestro marcador es informativo. Todos los SSRs que se han utilizado presentan valores de PIC superiores a 0.5 y por lo tanto, nos puede aportar una elevada capacidad de discriminación entre las distintas variedades, y la detección de posibles denominaciones erróneas (Tabla 1.11). Para realizar una estimación conjunta de la capacidad que posee un microsatélite para diferenciar entre las distintas variedades en estudio, se emplea otro análisis, la probabilidad de confusión (C). El valor de C obtenido para los cuatro locus fue de 0.0024, lo que se puede traducir en un 99,76% de probabilidad de no equivocarnos a la hora de evaluar un SSR de dos variedades al azar. La probabilidad de confusión tiene una relación inversa con el poder de discriminación y por lo tanto con el número de microsatélites empleados. A mayor número de microsatélites y mayor poder de discriminación de estos, menor será el valor de C, aumentando la fiabilidad del análisis.

La heterocigosidad observada (H_o) se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci* y se calcula por cómputo directo. Cuanto mayor sea la heterocigosidad de un marcador mayor es la información que genera el mismo, aumentado la probabilidad de encontrar patrones alélicos polimórficos. Para los microsatélites empleados en este trabajo se han encontrado valores de heterocigosidad elevados, lo que justifica su utilidad en trabajos de identificación varietal, previamente descrita (De la Rosa et al., 2002). La H_o varió entre 0.58 y 0.95 y el poder de discriminación (PD) osciló de 0,68 a 0,83, con un valor medio de 0,77 (Tabla 1.11).

Tabla 1.11. Resultado del cálculo para los distintos locus de la heterocigosidad observada (H_o), el contenido de información polimórfica (PIC) y el número de alelos efectivos (Ae) y poder de discriminación (PD).

LOCUS	Ho	PIC	NºALELOS	NºALELOS EFECTIVOS	PD
			(A)	(Ae)	
DCA9	0.58	0.65	7	2.90	0.78
EMO3	0.87	0.78	6	4.60	0.83
DCA18	0.95	0.76	8	4.26	0.80
EMO2	0.71	0.63	4	2.74	0.68

Los altos valores para el PD encontrados en la mayoría de los locus SSR rinden a estos marcadores como una herramienta válida para discriminar entre las variedades cultivadas actuales. En general, la frecuencia media de los alelos ha sido alta (0.50) (Tabla 1.12).

Tabla 1.12. Frecuencia de los marcadores SSR en las 25 denominaciones varietales estudiadas.

Alelo/Locus	DCA9-162	DCA9-170	DCA9-185	DCA9-190	DCA9-195	DCA9-197			
Alelo 1	0.64	0.04	0.64	0.04	0.16	0.08			
Alelo 0	0.36	0.96	0.36	0.96	0.84	0.92			
Alelo/Locus	EMO3-205	EMO3-207	EMO3-209	EMO3-211	EMO3-213	EMO3-215			
Alelo 1	0.28	0.4	0.12	0.48	0.12	0.4			
Alelo 0	0.72	0.6	0.88	0.52	0.88	0.6			
Alelo/Locus	DCA18-165	DCA18-167	DCA18-169	DCA18-173	DCA18-175	DCA18-177	DCA18-179	DCA18-184	
Alelo 1	0.04	0.16	0.72	0.04	0.6	0.2	0.16	0.04	
Alelo 0	0.96	0.84	0.28	0.96	0.4	0.8	0.84	0.96	
Alelo/Locus	EMO2-201	EMO2-210	EMO2-220	EMO2-225					
Alelo 1	0.84	0.68	0.12	0.12					
Alelo 0	0.16	0.32	0.88	0.88					

De los veinticinco alelos encontrados algunos son específicos para una variedad dada. Las variedades “Acebuche”, “Colorá”, “Arbequina”, “Azulito” y “Ocal” se han podido identificar unívocamente con un solo alelo en algún locus SSR (Tabla 1.13). Estos tipos de marcadores específicos son una herramienta muy útil además para garantizar la autenticidad de material procedente de vivero, o para las pruebas de paternidad y el mapeo.

Tabla 1.13. Identificación de variedades por la presencia de alelos únicos en algún locus SSR.

VARIEDAD	UN MICROSATELITE - UN ALELO (pb)
“Acebuche”	DCA9-2 (170)
“Colorá”	DCA9-4 (190)
“Arbequina”	DCA18-1 (165)
“Azulito”	DCA18-4 (173)
“Ocal”	DCA18-8 (184)

Para la identificación de las variedades que no presentaron alelos únicos se necesitó combinaciones de patrones alélicos obtenidos con dos microsátélites diferentes (Tabla 1.14) o con tres. Además, no fueron encontradas diferencias entre los perfiles de amplificación obtenidos de individuos diferentes de la misma variedad.

En conclusión, se ha logrado identificar las 25 variedades de olivo analizadas en este trabajo gracias a los marcadores moleculares específicos, de las cuales las variedades “Azulito”, “Colorá”, “Cuerno Real”, “Manzanilla Real”, “Minuina”, “Oliva”, “Original”, “Perito” y “Pico Real” no están clasificadas en la colección del CIFA de Córdoba.

La identificación de todas las variedades incluidas en este trabajo utilizando un número reducido de microsátélites (4) pone de manifiesto la alta capacidad de discriminación de los marcadores SSR en esta especie donde adquiere gran importancia para solventar problemas por su habilidad para clarificar denominaciones erróneas, sinonimias y homonimias. Nuestros resultados son similares a otros trabajos (Cipriani et al., 2002; De la Rosa et al., 2003) demostrando que estos SSR son extremadamente de gran alcance en la identificación de variedades de olivo, debido a su alto contenido de información polimórfico (valor de PIC), y al alto número de alelos efectivos.

Los altos niveles de diversidad genética del olivo en Extremadura coinciden con estudios previos de identificación realizados en otras especies frutales (Truco y de Vicente, 1995; Galderisi et al., 1998) y en olivo en otras regiones de España (Barranco y Rallo, 2000; Belaj et al., 2002; Claros et al. 2000; Sanz-

Cortés et al., 2001), como en otros países : Italia (Cimato, 1993; Baldoni et al., 2001), Grecia (Loukas y Krimbas 1983), Marruecos (Ouzzani et al., 1996; Amane et al., 2000), Israel (Wiesman et al., 1998), Albania (Belaj et al., 2003), Australia (Mekuria et al., 1999) y Portugal (Gemas et al., 2004; Cordeiro et al., 2006); en estos trabajos han sido los marcadores tipo RAPD los que se han revelado también útiles para la identificación varietal de esta especie.

Tabla 1.14. Identificación de variedades por la combinación de patrones alélicos obtenidos con dos microsátélites diferentes.

VARIEDAD	DOS MICROSATELITES
“Galega”	DCA9-195/EMO3-205
“Gordal”	DCA9-195/EMO3-209 ó EMO3-209/EMO3-207
“Pico Real”	DCA9-195/EMO3-6
“Original”	DCA9-197/EMO3-205 ó EMO3-213/EMO3-205
“Manzanilla Real”	EMO3-209/EMO3-211
“Perito”	EMO3-209/EMO3-213
“Cuerno Real”	DCA18-207/EMO3-205
“Picual”	DCA18-167/EMO3-207
“Verdial”	DCA18-167/EMO3-211
“Carrasqueña”	DCA18-177/EMO3-211
“Cornezuelo”	DCA18-177/DCA9-185
“Azulejo”	DCA18-179/EMO3-215
“Manzanilla sevillana”	DCA18-179/EMO3-207
“Redondil”	DCA18-179/DCA18-175
“Manzanilla Cacereña”	EMO2-225/EMO3-207 ó EMO2-201/EMO3-207
“Pico Limón”	DCA9-195/EMO3-6

La certificación varietal es importante para evitar los errores de etiquetaje, como hemos mencionado, aunque también es un preámbulo necesario para la conservación y la caracterización de las variedades de olivo. Una de las formas de intentar poner orden en las denominaciones varietales se basa por un lado en el establecimiento de Bancos de Germoplasma en los que se aprecian las características agronómicas, y por otro, en analizar el ADN tal y como lo permiten las actuales herramientas moleculares.

En efecto, aunque algunas variedades ó cultivares se distinguen fácilmente por su caracterización morfológica, otras muchas se prestan a confusión.

Por otra parte, como los descriptores más discriminantes son los relacionados con el fruto y el hueso, el enfoque morfológico dista mucho de permitir el análisis para la conformidad de los cultivares. Los avances en el campo de la biología molecular abren la posibilidad de estudiar directamente el ADN, ofreciendo al mejorador genético muchas posibilidades aún por explotar. Además, la verificación de la identidad del material vegetal utilizado puede tener consecuencias comerciales y financieras extremadamente importantes para Extremadura. Los marcadores moleculares que se utilizan para la evaluación de la variabilidad son igualmente útiles para la caracterización genética que permite la identificación de cultivos. Numerosas ventajas indirectas derivan de los resultados de este trabajo, en razón de la posibilidad de explotar nuevas estrategias de certificación de las variedades de olivo de Extremadura, similares morfológicamente aunque diferentes genotípicamente, lo que interesa a los propietarios de los viveros de olivo permitiéndoles certificar las variedades que comercializan.

A pesar de su gran utilidad para la identificación del material vegetal incluido en los bancos de germoplasma y sus ventajas en comparación con los métodos tradicionales, el empleo de los marcadores moleculares está sujeto a ciertas limitaciones prácticas. Por ejemplo, es importante que la técnica aplicada pueda distinguir la mayoría o todos los genotipos en la colección. Al mismo tiempo, el gran número de accesiones que se encuentra en una colección requiere el uso de un protocolo rápido, sencillo y barato (Gilbert et al., 1999).

El mayor reto para la identificación de variedades con marcadores moleculares consiste en reducir tanto el coste de los análisis como la posibilidad de que una variedad distinta a las estudiadas presente el mismo perfil de amplificación que algunas de ellas simplemente por azar (Tessier et al., 1999). La gran capacidad de los marcadores SSR en olivo permitió la identificación fiable de la totalidad de los genotipos analizados mediante la combinación de patrones alélicos obtenidos con solo cuatro SSRs diferentes. Este resultado coincide con trabajos previos en olivo donde con sólo tres microsatélites fue posible la identificación inequívoca de otras 25 variedades de olivo españolas (Rallo et al., 2003; Diaz et al., 2006).

La alta capacidad discriminante de los microsatélites observada en otras especies vegetales (Rongwen et al., 1995; Hong et al., 1998; Lamboy et al., 1996; Dean et al., 1999) ha sido confirmada en este trabajo. La amplificación de 25 variedades con cuatro marcadores de tipo SSR ha sido lugar a un total de 25

alelos, de los cuales 5 son alelos únicos. La presencia de estos alelos únicos, que han permitido la identificación de cinco variedades, es particularmente interesante.

Por todo ello, los resultados de este trabajo, basados en la tecnología del marcador molecular, serán de gran valor para el control de certificación de material en Extremadura. Además, esta tecnología tiene una gran capacidad competitiva con clarísimo interés económico. Convendría reforzar el conocimiento científico y tecnológico para favorecer el empleo de los marcadores moleculares en el registro de nuevas variedades como complemento a los caracteres morfológicos reconocidos actualmente.

En conclusión, este trabajo tiene una aplicación práctica evidente que se puede resumir de la forma siguiente:

- creación de patentes sobre los métodos de análisis varietal que permitan realizar los análisis mencionados anteriormente;
- apoyo a las peticiones de denominación de origen con una huella dactilar de los olivos implicados en la misma y de nuevas variedades autóctonas de la Región;
- expedición de certificados varietales que permitan asegurar las variedades que se han utilizado, por ejemplo, en la elaboración del aceite, especialmente en aceites con denominación de origen;
- evitar que en compras masivas de plántones de olivo se puedan incluir árboles que no pertenezcan a la variedad deseada, puesto que el análisis de una sola hoja de una planta permitiría identificar la variedad;
- simplificar las técnicas de mejora genética del olivo, ya que permitiría seleccionar sólo aquellas que contengan los marcadores que interesen.

1.4.4. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OLIVO EN EXTREMADURA

La presencia y ausencia de fragmentos de ADN polimórficos entre las muestras (denotadas 1 y 0 respectivamente), permitieron confirmar una matriz de datos que fueron procesados para establecer los valores de similitud de acuerdo al índice Nei y Li entre las diferentes variedades. La ausencia de banda puede tener varias causas, como la existencia de alelos nulos.

La matriz de similitud genética se calcula con la definición de similaridad calculada con el método de Nei y Li (1979). De este modo el máximo valor de similitud genética entre dos individuos será de 1, cuando el patrón de bandas sea idéntico, mientras que el mínimo valor será de 0 cuando no existan bandas comunes. En la Tabla 1.15 se muestran los valores de similitud genética entre los 25 individuos obtenidos para los 4 loci SSR según el índice de Nei y Li. En general, se obtuvieron bajos valores de similitud entre las variedades estudiadas, los cuales oscilaron entre 0,00 y 0,87, confirmando la hipótesis de un elevado grado de diversidad entre los genotipos de olivo.

Los resultados de similitud encontrados son parecidos a los obtenidos por otros autores (Angiolillo et al., 1999; Belaj et al. 1998, 2002; Gemas et al., 2004; De la Rosa et al., 2003). Los valores de similitudes más bajos se han obtenido entre las variedades “Acebuche” y “Ocal” (0,00), “Acebuche” y “Colorá” (0,00), “Acebuche” y “Morisca” (0,00), “Acebuche” y “Carrasqueña” (0,00) y “Acebuche y “Fina” (0,00), mientras que la mayor similitud fue observada entre las variedades “Pico Real” y “Pico Limón” (0,87) y entre “Oliva” y “Morisca” (0,87).

Por lo tanto, la variedad “Acebuche” es la que presenta los menores valores de similitud con respecto al resto de variedades (Tabla 1.15). El menor valor de similitud lo presenta con las variedades: “Ocal”, “Colorá”, “Morisca”, “Carrasqueña” y “Fina”; mientras que el mayor de similitud lo presenta con la variedad “Azulejo” (0.33), variedad local de Berlanga y Fuente del Arco (Badajoz).

Estos valores indican que los marcadores SSR utilizados permitieron diferenciar eficientemente los genotipos estudiados, incluso las variedades que se consideran sinonimias (variedades con distintas denominaciones pero indistinguibles genéticamente):

- las variedades “Perito” y “Manzanilla Cacereña” se consideran una sinonimia en Llerena (Badajoz). Los datos de campo mostraron algunas diferencias morfológicas principalmente en el

endocarpo, aunque no se encontraron otras diferencias morfológicas entre ellas. Nuestros resultados confirman que son variedades diferentes, mostrando diferencias genéticas y determinando una similitud de sólo 0,45 (Tabla 1.15), lo que explicaría las diferencias encontradas en el endocarpo del fruto. Este “Perito” de Berlanga (Badajoz) es muy similar a la “Manzanilla Real” de Navalvillar de Pela (0,77) (Badajoz).

- las variedades “Verdial de Badajoz” y “Original” consideradas sinonimias en la localidad de Guadalupe (Badajoz), han mostrado tan sólo una similitud de 0,16 (Tabla 1.15). Estos datos nos llevan a considerarlas como identidades diferentes confirmado por contraste de endocarpos.
- La variedad “Fina” se considera una sinonimia de “Picual” en Castuera (Badajoz), sin embargo, la variedad “Fina” de La Nava de Benquerencia de la Serena (Badajoz) solo muestra una similitud de 0.55 con la “Picual” de Olivenza (Badajoz).

Hasta el momento, se consideraban sinonimias entre variedades con un pasado histórico común como “Manzanilla Sevillana” y “Redondil”, documentada por descriptores morfológicos (Barranco et al., 2000), isoenzimáticos (Trujillo et al., 1995) y confirmada con los marcadores de tipo RAPD (Belaj et al., 2001); este trabajo ha permitido la discriminación de estas dos variedades mediante el empleo de marcadores SSR. Del mismo modo, se ha clarificado un caso más de sinonimia entre las variedades “Colorá” y “Carrasqueña”.

El uso de SSR ha permitido también resolver denominaciones erróneas como la variedad “Cuerno Real” de Navalvillar de Pela (Badajoz) que presenta un patrón alélico idéntico a la “Verdial de Badajoz”, por lo que se considera una “Verdial de Badajoz”. No obstante, es importante indicar que, si bien es posible determinar inequívocamente cuándo dos especies son genéticamente distintas, es imposible afirmar con total seguridad que dos variedades son genéticamente idénticas.

En la denominación de las variedades de olivo es también frecuente la existencia de homonimias, es decir, que un mismo nombre sirva para denominar variedades genéticamente diferentes. Estas variedades sólo suelen tener en común una determinada característica, muchas veces relativa a alguna característica del fruto u otro atributo distintivo. La denominación Manzanilla comprende 11 variedades de olivo distintas, que se conocen con este nombre porque la forma del fruto se parece a una manzana pequeña (Barranco, 1994; Rallo et al., 2005).

Tabla 1.15. Valores de similitud entre cada pareja de variedades estudiadas según Índice de Nei y Li, 1979.

Acebuche	Arbequina	Azulejo	Azulito	Carrasqueña	Colora	
Acebuche	1.0000					
Arbequina	0.1000	1.0000				
Azulejo	0.3333	0.1818	1.0000			
Azulito	0.2000	0.0833	0.4000	1.0000		
Carrasqueña	0.0000	0.0909	0.1818	0.1818	1.0000	
Colora	0.0000	0.3000	0.1667	0.0769	0.4444	1.0000
Cornicabra	0.1818	0.1667	0.5000	0.3636	0.5556	0.2500
CuernoReal	0.3000	0.2727	0.5000	0.3636	0.1667	0.1538
Fina	0.0000	0.1818	0.4000	0.2727	0.4444	0.4000
Galega	0.1818	0.0769	0.3636	0.3636	0.5556	0.2500
Gordal	0.0000	0.0000	0.1667	0.1667	0.6250	0.2727
Manzanilla	0.1818	0.2727	0.5000	0.2500	0.5556	0.3636
ManzanillaCa	0.0833	0.4000	0.2500	0.3636	0.4000	0.3636
ManzanillaRe	0.0833	0.4000	0.3636	0.2500	0.4000	0.3636
Minuina	0.0909	0.3000	0.5556	0.2727	0.3000	0.4000
Morisca	0.0000	0.3000	0.4000	0.2727	0.4444	0.4000
Ocal	0.0000	0.0909	0.1818	0.0833	0.2000	0.3000
Oliva	0.0833	0.4000	0.5000	0.3636	0.4000	0.3636
Original	0.1000	0.0000	0.1818	0.1818	0.3333	0.0833
Perito	0.0833	0.2727	0.3636	0.2500	0.2727	0.2500
Picual	0.2000	0.3000	0.4000	0.1667	0.1818	0.2727
PicoLimon	0.0909	0.4444	0.4000	0.1667	0.3000	0.4000
PicoReal	0.0833	0.4000	0.5000	0.2500	0.2727	0.3636
Redondil	0.1000	0.2000	0.1818	0.1818	0.3333	0.3000
VerdialBadaj	0.1818	0.4000	0.3636	0.2500	0.2727	0.2500

Cornicabra	CuernoReal	Fina	Galega	Gordal	Manza	
Cornicabra	1.0000					
CuernoReal	0.4545	1.0000				
Fina	0.5000	0.5000	1.0000			
Galega	0.7778	0.3333	0.3636	1.0000		
Gordal	0.5000	0.1538	0.4000	0.6667	1.0000	
Manzanilla	0.6000	0.3333	0.5000	0.4545	0.3636	1.0000
ManzanillaCa	0.4545	0.3333	0.5000	0.3333	0.2500	0.6000
ManzanillaRe	0.4545	0.4545	0.5000	0.3333	0.3636	0.6000
Minuina	0.5000	0.5000	0.7500	0.3636	0.2727	0.5000
Morisca	0.3636	0.5000	0.7500	0.2500	0.2727	0.5000
Ocal	0.1667	0.0769	0.1818	0.1667	0.1818	0.1667
Oliva	0.4545	0.6000	0.6667	0.3333	0.2500	0.6000
Original	0.4000	0.2727	0.1818	0.4000	0.3000	0.1667
Perito	0.4545	0.4545	0.5000	0.3333	0.3636	0.4545
Picual	0.3636	0.6667	0.5556	0.2500	0.1667	0.3636
PicoLimon	0.3636	0.3636	0.4000	0.3636	0.2727	0.5000
PicoReal	0.3333	0.4545	0.5000	0.3333	0.2500	0.4545
Redondil	0.1667	0.2727	0.3000	0.1667	0.1818	0.4000
VerdialBadaj	0.3333	0.7778	0.5000	0.2308	0.1538	0.4545

ManzaCacer	ManzaReal	Minuina	Morisca	Ocal	Oliva		
ManzanillaCa	1.0000						
ManzanillaRe	0.6000	1.0000					
Minuina	0.5000	0.5000	1.0000				
Morisca	0.5000	0.6667	0.5556	1.0000			
Ocal	0.0769	0.1667	0.1818	0.1818	1.0000		
Oliva	0.6000	0.7778	0.6667	0.8750	0.1667	1.0000	
Original	0.0769	0.1667	0.0833	0.1818	0.3333	0.1667	
Perito	0.4545	0.7778	0.5000	0.5000	0.2727	0.6000	
Picual	0.3636	0.3636	0.7500	0.4000	0.0833	0.5000	
PicoLimon	0.5000	0.6667	0.5556	0.5556	0.1818	0.6667	
PicoReal	0.4545	0.6000	0.6667	0.6667	0.1667	0.7778	
Redondil	0.4000	0.4000	0.1818	0.4444	0.0909	0.4000	
VerdialBadaj	0.4545	0.6000	0.5000	0.6667	0.0769	0.7778	

Original	Perito	Picual	PicoLimon	PicoReal	Redondil		
Original	1.0000						
Perito	0.2727	1.0000					
Picual	0.0833	0.3636	1.0000				
PicoLimon	0.0833	0.5000	0.4000	1.0000			
PicoReal	0.0769	0.4545	0.5000	0.8750	1.0000		
Redondil	0.2000	0.2727	0.1818	0.3000	0.2727	1.0000	
VerdialBadaj	0.1667	0.4545	0.6667	0.5000	0.6000	0.4000	

VerdialBadajoz	
VerdialBadajoz	1.0000

En nuestro trabajo se han estudiado tres variedades denominadas Manzanilla: “Manzanilla Sevillana”, “Manzanilla Cacereña” y “Manzanilla Real”. Los valores de similitud de las variedades Manzanilla han sido 0.60 (Tabla 1.16); estos valores de similitud genética pueden considerarse como medios, lo que indica que una denominación compartida entre determinadas variedades debido a una característica común no es indicativo de una alta similitud genética.

Tabla 1.16. Índices de similitud genética de la homonimia “Manzanilla”.

	“Manzanilla Sevillana”	“Manzanilla Cacereña”	“Manzanilla Real”
“Manzanilla Sevillana”	1.0	0.6	0.6
“Manzanilla Cacereña”	0.6	1.0	0.6
“Manzanilla Real”	0.6	0.6	1.0

Esta alta diversidad de los cultivares podría ser debida probablemente tanto a los orígenes indígenas de las variedades como a la baja presión de selección por los agricultores a lo largo de la historia. El alto nivel de polimorfismo puede ser, como en otras especies frutales (Hormaza et al., 1994; Nicese et al., 1998; Oraguzie et al., 2001), reflejo del no-cruzamiento natural de las especies de olivo. Aunque el origen de esta variabilidad no es muy bien conocido, existiendo varias hipótesis al respecto. Así, sobre la base de datos isoenzimáticos, Ouazzani et al., (1993), Trujillo et al., (1995) y Grati-Kamoun et al., (2000) demostraron que las denominaciones 'Picholine Marocaine', 'Manzanilla' y 'Chemlali de Sfax' no presentaban cada una un genotipo único, sino varios. En el caso de la 'Manzanilla', las variaciones isoenzimáticas dentro de una misma denominación están asociadas a variaciones fenotípicas muy claras (Barranco y Rallo, 1984; Trujillo et al., 1995); por lo tanto en este caso, los diferentes genotipos detectados se considerarían como variedades diferentes. Sabemos que estas denominaciones policlonales son en realidad denominaciones comerciales.

Los estudios que se basan en los marcadores enzimáticos (Ouazzani et al., 1993; Lumaret et al., 1997) y marcadores de ADN (Besnard, 1999; Contento et al., 2002) indican un posible proceso de hibridación entre la var. *europaea* y la var. *sylvestris* Brot. seguido por las domesticaciones múltiples del olivo. Esos híbridos se llaman formas salvajes (Zahorí y Hopo, 1994) y son considerados fuentes artificiales de variación (Besnard et al., 2002). Puesto que el olivo se ha propagado vegetativamente durante un tiempo considerable, es razonable asumir que parte de la diversidad detectada en este estudio es de herencia antigua. Este proceso de domesticación puede explicar la diversidad genética.

En la Fig. 1.10 se muestra el dendograma obtenido de los resultados SSRs (Nei y Li, 1979) mediante el método de agrupamiento UPGMA a través del cual es posible observar las diferencias entre grupos y entre genotipos: la diferente posición en la que surge la rama indica la facilidad con la que se puede distinguir la variedad. En el dendograma elaborado aparecen de forma evidente las diferencias entre todas las variedades, diferenciándose todas ellas en un rango de 90 % de similitud.

El análisis genético de los resultados mostró una distancia gradual entre las diferentes variedades, siendo difícil justificar la presencia de grupos muy bien distanciados filogenéticamente, aunque es posible distinguir en el dendograma dos agrupamientos o "clusters" (I y II), con un 30% de similitud, a los que se unen 3 ramas independientes disminuyendo su grado de similitud: "Azulito", "Ocal" y "Acebuche" (Fig. 1.10). Estas últimas son las que más se diferencian de las demás, mostrando un mayor número de marcadores diferentes y apareciendo como genotipos más diferenciados. Así, la variedad que más se

diferencia del resto de las variedades cultivadas de olivo es el acebuche, parte superior de la figura, y por otro lado, las variedades “Azulito” y “Ocal”, parte inferior de la figura (Fig. 1.10). El acebuche, una variedad silvestre de olivo que se encuentra como árbol de porte arbustivo y que crece esporádicamente en el campo, presenta también una morfología muy diferente, con hojas que no son las típicas del olivo, sino más pequeñas y redondeadas y sus frutos son muy pequeños.

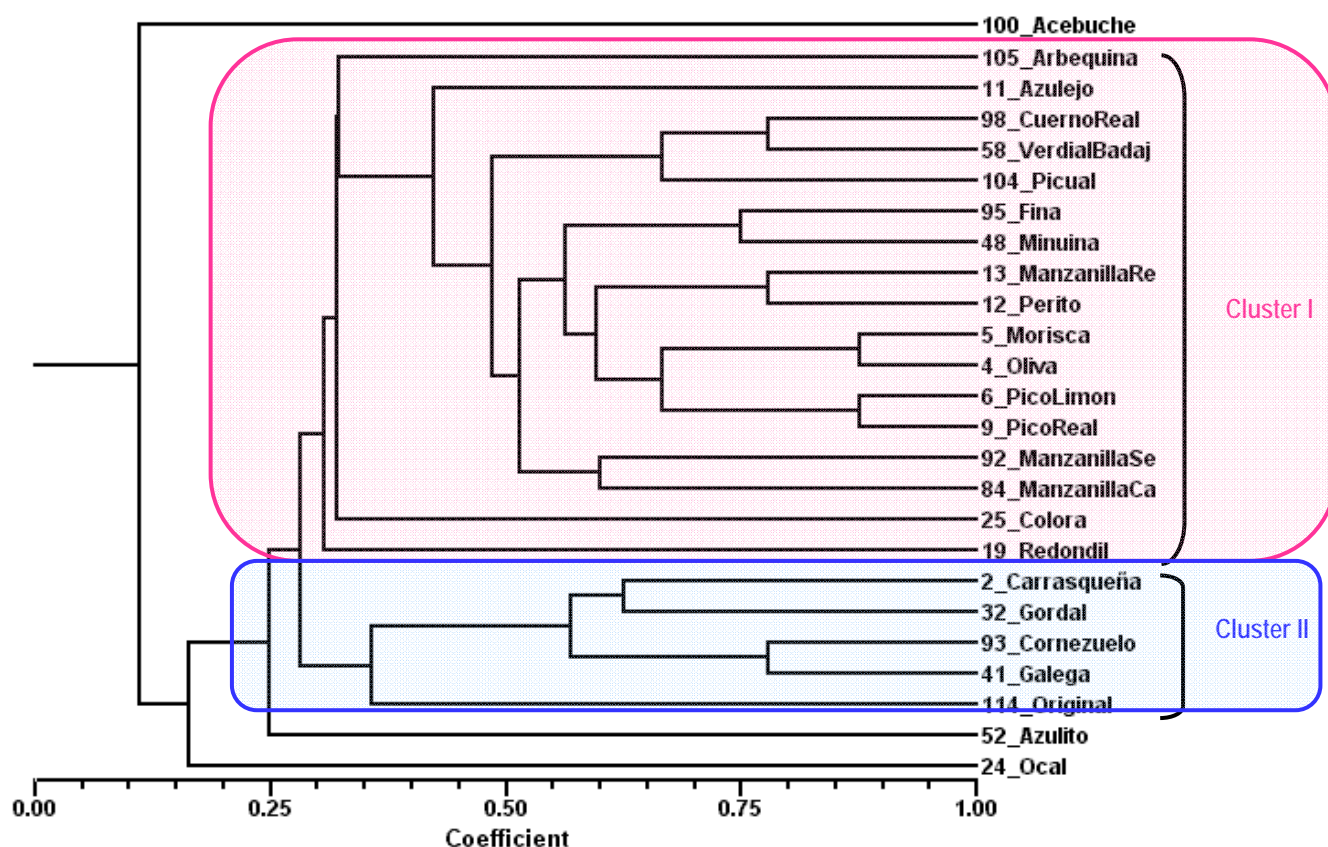


Fig. 1.10. Dendrograma de variedades de olivo de Extremadura, basado en el agrupamiento de coeficientes Nei y Li. (1979), según método UPGMA.

El cluster I es el comprendido entre las variedades “arbequina” y “redondil” y es el más homogéneo de los dos encontrados. Este cluster I presenta un subgrupo de variedades más parecidas, con un mayor grado de similitud entre ellas (50%), que comprende desde “Cuerno Real” a “Manzanilla Cacereña” (Fig. 1.10). En el cluster II los genotipos entre “Carrasqueña” y “Original”, presentan cierta variabilidad entre sí (Fig. 1.10).

Si bien, aunque los valores de similitud (SSR) no establecen grupos claramente diferenciados como se había pensado a través de las descripciones morfológicas, indican que existe menor distancia genética entre individuos con características o fenotipos muy similares entre sí. Así pues, las variedades con los mayores valores de similitud (“Oliva” y “Morisca”) presentan endocarpos iguales y frutos parecidos.

En estudios a gran escala geográfica realizados por Besnard et al. (2001) y Belaj et al. (2002) en variedades de muchos países de la Cuenca Mediterránea, se ha encontrado una estructura genética del olivar asociada a la selección local de olivos para la explotación del fruto (uso del fruto) y para la adaptación agro-ecológica. Esta estructura genética geográfica no fue exclusivamente observada entre variedades de diferentes países, sino que también se observa en las variedades del mismo país, incluso de diferentes regiones, como mostró Claros et al. (2000) en variedades españolas y Carriero et al. (2002) en variedades italianas. Es más, en una región específica de España, Sanz-Cortés et al. (2001) también observaron subgrupos con respecto al origen geográfico dentro de la región.

La agrupación de las variedades de una zona y el estudio de las distancias medias entre las pertenecientes a diferentes áreas puede proporcionar una aproximación al estudio de la relación origen geográfico-distancias. En otros trabajos, el uso de los marcadores moleculares ha proporcionado dos tipos de evidencias: una indica que las variedades de olivo no tienen ninguna relación especial (Fabbri et al., 1995; Belaj et al., 1998), mientras que la otra, que surge cuando se han seleccionado las variedades con una cierta relación geográfica, demuestra que la diferenciación de las variedades de olivo sigue un criterio eminentemente influenciado por las características edafoclimáticas (Wiesman et al., 1998; Claros et al., 2000). En nuestro caso, las distancias entre las accesiones permiten agrupar las variedades de olivo con una correlación entre el origen geográfico de la variedad y la similitud genética, reflejando una menor distancia en el dendograma entre las variedades más próximas geográficamente (Fig. 1.10). Dicho resultado está en concordancia con la hipótesis del origen autóctono de la mayoría de las variedades del olivo y su limitada difusión alrededor de su zona de cultivo (Barranco, 1994; Rallo et al., 2005).

Las relaciones genéticas entre las 25 variedades han sido establecidas por un análisis de correspondencia (Greenarce, 1984). El análisis de correspondencia obtenido con la utilización de los datos proporcionados por los análisis SSR clasifica a las 25 variedades de olivo de Extremadura en tres grupos (Fig. 1.11):

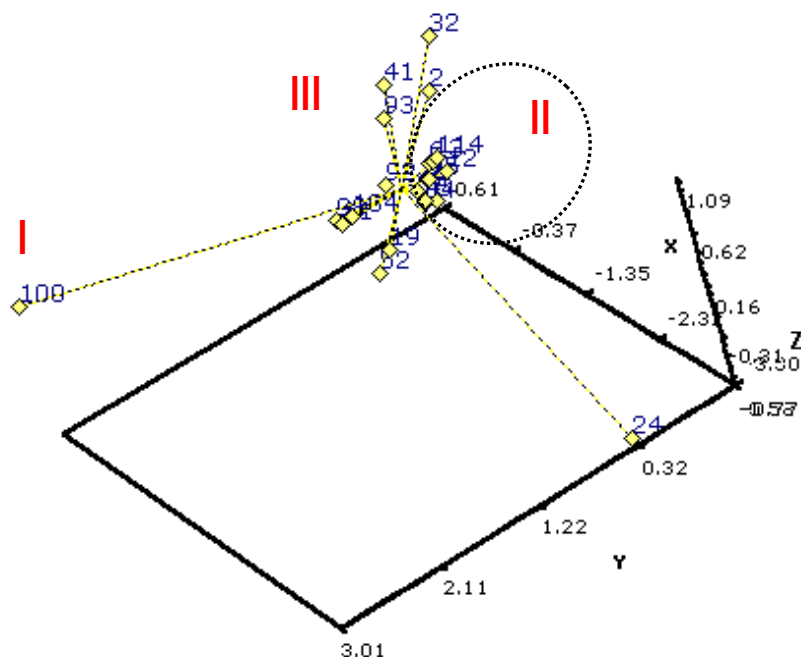


Fig. 1.11. Relaciones genéticas entre las 25 variedades establecidas por análisis de correspondencia en tres dimensiones. Tres grupos son definidos: olivo silvestre (I), olivos extremeños (II) y olivos de amplia distribución (III).

I. Olivo silvestre

El acebuche, olivo silvestre (bravío en algunas comarcas) aparece muy distinto al resto de las variedades a pesar de que se supone que todos los olivos cultivados derivan de él (Fig. 1.11, grupo I). Conviene recordar aquí algo que ya señalaron los griegos: el cruce de dos variedades distintas produce árboles generalmente no aptos para el cultivo y que “parecen” acebuches, aunque no lo son realmente. En este mismo grupo aparecen dos variedades (“Ocal” y “Azulito”), lo que puede ser debido a que comparten con el acebuche muchas características silvestres, o bien a que todos ellos son muy distintos al tipo de olivo que ha sido seleccionado a lo largo de los siglos en España en general, y en Extremadura en particular.

II. Olivos autóctonos extremeños

Las variedades típicamente extremeñas (“Verdial de Badajoz”, “Manzanilla Cacerense”, “Morisca” y la mayoría de las nuevas variedades locales) aparecen claramente diferenciadas del resto (Fig. 1.11, grupo II). Entre ellas la variedad “Pico Real” es probablemente una variante del “Pico Limón” según se puede

deducir de la poca distancia genética que los separa. De igual manera, la variedad local “Oliva” de Berlanga podría ser una variante de la “Morisca”, si bien éstas presentan diferencias morfológicas en fruto. En cambio, la variedad “Azulito” de Monesterio es una nueva variedad diferente tanto morfológica como genéticamente, aunque comparta denominaciones parecidas con “Azulejo” (variedad local de Berlanga) y con la variedad “Azul”, una variedad difundida en algunas localidades de Granada. Lo mismo ocurre con la “Manzanilla Real” localizada en Navalvillar de Pela (Badajoz) que es diferente en morfología (hoja, fruto y endocarpo) y genética a la “Manzanilla Cacereña”, a la “Manzanilla Sevillana” y a la “Manzanilla Prieta” (variedad secundaria que se cultiva en las sierras de Huelva y Sevilla). Hay que recordar que la variedad “Original” de Navalvillar de Pela no es la misma que se recoge en el libro de las variedades de olivo (Rallo et al., 2005), sino una nueva variedad, contrastada morfológicamente.

Hay que destacar que tanto la “Morisca” como “Manzanilla Cacereña”, si bien son árboles de distinto porte, vigor y fruto (lo que les hubiera clasificado lejos en un agrupamiento por criterios morfológicos), se encuentran muy relacionados genéticamente. Aunque hay “Manzanilla Cacereña” en la provincia de Badajoz, los árboles no presentan un aspecto muy saludable, quizá porque el clima y el suelo no sean adecuados. Lo mismo se puede decir de la “verdial” localizada en Cáceres, donde su producción es baja en cantidad y calidad, debido a su sensibilidad al frío invernal a pesar de ser una variedad rústica de gran adaptación a suelos pobres. Por tanto, puede pensarse que ambas variedades son muy características de cada provincia de Extremadura y que posiblemente en otro entorno no darían ni la misma productividad ni la misma calidad. En cambio otra variedad muy cultivada en Extremadura como la cornicabra (variedad principal no autóctona de Extremadura) que se utiliza esencialmente para aceite, se integra cercana a todos los olivos extremeños. Todos estos resultados sugieren que la selección ejercida sobre esta variedad es diferente a la sufrida por los olivos autóctonos extremeños, lo que no resultaría extraño dadas las diferentes condiciones edafoclimáticas.

III. Olivos de amplia distribución

El último grupo correspondería a las variedades cuya distribución no es tan dependiente del clima o los suelos (Fig. 1.11, grupo III). La mayoría de las variedades, con excepción quizá de la “Carrasqueña”, que se encuentran en este grupo, aunque sean predominantes de una zona, se pueden encontrar ampliamente distribuidas por Extremadura y fuera de ella.

En definitiva, la gran evidencia que surge al estudiar esta clasificación es que los olivos no parecen estar agrupados por similitudes morfológicas sino que parece predominar la localización geográfica. Este fenómeno es fácilmente explicable porque el olivo no ha sufrido sólo una selección natural, sino que también ha soportado una selección artificial para priorizar las variedades de alto rendimiento y de aceites consumibles.

Se supone que la mayoría de las variedades actuales de olivo son de origen autóctono y su difusión está limitada alrededor de su zona de cultivo (Barranco, 1997; Rallo et al., 2005). Al igual que en otros estudios llevados a cabo con marcadores de tipo RAPD (Besnard et al., 2001; Claros et al., 2000; Cordeiro et al., 2008), en el presente trabajo se ha encontrado asociación entre las agrupaciones de variedades y su difusión geográfica. Estas asociaciones se han observado tanto dentro de zonas del Mediterráneo como dentro del mismo país (Belaj et al., 2001). En este sentido, cabe mencionar las asociaciones de las variedades procedentes del Mediterráneo Oriental (Egipto, Israel, Líbano, Palestina, Siria y Turquía), Central (Albania, ExYugoslavia, Grecia, Italia y Tunes) y la agrupación conjunta de las variedades del Mediterráneo Occidental (Marruecos, España y Portugal). También dentro de países y regiones se han encontrado pautas geográficas de asociación. Por ejemplo, la agrupación separada de la mayoría de las variedades españolas de la zona de Levante en comparación con el resto de las variedades del mismo país, las variedades de la parte interior de Albania se agruparon separadamente de las variedades de la costa y la mayoría de las variedades sirias de la parte central de este país se agruparon conjuntamente (Belaj et al., 2001).

Los análisis de los marcadores moleculares, por su parte, parecen mostrar una componente híbrida de domesticación y características edafoclimáticas como ya fue indicado por otros trabajos (Angiolillo et al., 1999; Baldoni et al., 2009). La alta similitud genética observada entre las variedades locales en Extremadura, puede venir indicada por las condiciones ecológicas más homogéneas de la zona, que reducen los genotipos adaptados, mientras que las variedades de amplia distribución mantienen una divergencia más alta entre ellos. Es posible que, durante la expansión a lo largo del país, los olivos introducidos divergieran debido a la hibridación y “backcrossing” con los árboles indígenas. De esos híbridos, la selección local por el uso del fruto y/o la adaptación ocurrió para enfrentarse a las condiciones agro-ecológicas. Este proceso de selección se acentuó más o menos, generando variedades o cultivares más homogéneos, mientras compartían la adaptación a condiciones medioambientales específicas o el uso del fruto para aceite o para aceituna de mesa. Otras variedades, como “Azulito”, mantuvieron un

estatus más heterogéneo, quizás por no ser capaz de colonizar una gama de ambientes y no ser explotado para ambos usos (aceite y aceituna de mesa).

Aparentemente, en el olivo el riesgo de la desaparición de los recursos genéticos es menor que en otras especies, debido a la presencia de olivares tradicionales y a la longevidad de la especie (Rallo et al., 2005). Al mismo tiempo, los mejoradores están tomando conciencia de la necesidad de obtener nuevas combinaciones a partir de los fondos genéticos naturales. Cuanto mayor sea el nivel de variación genética existente en una especie, mayor será el margen de maniobra para la selección natural o artificial (Esquinas-Alcazar, 1999). Por tanto, la conservación y el estudio de los recursos genéticos son necesarios no sólo para salvaguardar el patrimonio genético seleccionado de forma empírica por los agricultores, sino también para llevar a cabo estudios de mejora y selección varietal.

En conclusión, la caracterización varietal por los marcadores moleculares (lograda por este trabajo) abre la posibilidad de desarrollar marcadores para la certificación varietal a propósito y por otra parte, debido a que la diversidad intervarietal del olivo en Extremadura se estructuró según la adaptación ecológica, la transposición de variedades de esta región a otra se debe evaluar cuidadosamente.



1.5. CONCLUSIONES

1. La localización y caracterización morfológica de las variedades cultivadas y silvestre de olivo de Extremadura han reflejado un alto grado de variabilidad entre ellas y han permitido la identificación de veinte variedades autóctonas de la región; siendo los caracteres del endocarpo los que permiten una mayor discriminación varietal gracias a su mayor variabilidad y a la estabilidad de los caracteres.
2. Los marcadores moleculares "ADN microsatélites" o "SSR" se han presentado como una herramienta muy útil para la identificación de 25 variedades de olivo cultivado en Extremadura, mostrando un alto poder de discriminación.
3. Sólo con la combinación de los cuatro loci SSR específicos (DCA9, DCA18, EMO2 y EMO3) se identificaron la totalidad de las variedades estudiadas, encontrándose marcadores únicos para cinco variedades.
4. Los resultados obtenidos a través de los marcadores SSR confirman la hipótesis de un elevado grado de diversidad genética entre los genotipos, fenómeno ya observado previamente a nivel morfológico y agronómico. El uso de SSR nos permitió distinguir todas las sinonimias detectadas previamente, así como discriminar genéticamente las homonimias analizadas.
5. Las variedades "Azulito" y "Ocal" son las que más se diferencian de las demás junto al olivo silvestre (acebuche), mostrando un mayor número de marcadores diferentes, lo que puede ser debido a que estas variedades (la nueva variedad local "Azulito" de Monesterio y la variedad difundida "Ocal" de

Alburquerque) comparten con el acebuche muchas características silvestres, o bien a que éstas son distintas al tipo de olivo que ha sido seleccionado a lo largo de los siglos en Extremadura.

6. Los marcadores SSR revelan una estructura genética del olivo extremeño de acuerdo al origen geográfico de la variedad, observándose un mayor grado de semejanza entre variedades de mayor proximidad geográfica, lo que está de acuerdo con la hipótesis que postula el origen autóctono de las variedades.



1.6. BIBLIOGRAFÍA

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252(5013):1651-1656.

Althoff DM, Gitzendanner MA, Segraves KA. 2007. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: A comparison of homology within and between genomes. *Systematic Biology* 56:477-484.

An C, Saha S, Jenkins JN, Ma DP, Scheffleer BE, Kohel RJ, Yu JZ, Stelly DM. 2008. Cotton (*Gossypium* spp.) R2R3-MYB transcription factors SNP identification, phylogenomic characterization, chromosome localization, and linkage mapping. *Theoretical and Applied Genetics*. 116:1015-1026.

Angles S. 1999. Evolución de la geografía oleícola en Andalucía. *Olivae* 78:12-22.

Amane M, Ouazzani N, Lumaret R, Debain C. 2000. Chloroplast-DNA Variation in the Wild And Cultivated Olives (*Olea europaea* L.) of Morocco. *Euphytica* 116:59-64.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique J, Sorrells ME, Tanksley SD. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-18.

Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 98:411-421.

Arus P, Moreno-Gonzalez J. 1993. Marker-Assisted selection. En: 'Plant Breeding: Principles and Projects'. Ed: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa. Chapman & Hall, London.

Baldoni L, Alfei A, Santinelli A, Angiolillo A, Pannelli G. 2001. Esame dei principali casi di sinonimia e omonimia in varietà di olivo marchigiane mediante analisi AFLP. VI Conv. Naz. Biodiversità, Bari, 6-7 Settembre.

Baldoni L, Cultrera NG, Mariotti R, Ricciolini C, et al. 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol. Breed.* 24: 213-231.

- Baldini E, Scaramuzzi F. 1957.** Contributo allo studio delle cultivar di olive da tavola. Indagine elaiografica comparativa in due oliveti di collezione. - Riv. Ortoflorofrutt. It., 41: 136-179.
- Barranco D, Rallo L. 1984.** Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, Spain. 387.
- Barranco, D. 1994.** Caracterización del material vegetal en olivo. En " avances en olivicultura". Fundación "La Caixa". Fructicultura profesional, Barcelona, pp 3-7.
- Barranco D, Rallo L.. 2000.** Olive cultivares in Spain. Hort Technology 10 (1):107-110.
- Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L. 2008.** El cultivo del olivo. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Sexta edición.
- Belaj A. 1998.** Identificación y clasificación de variedades de olivo (*Olea europaea* L.) del Banco de Germoplasma de Córdoba con RAPD. Thesis de Master. Universidad de Córdoba. España.
- Belaj A, Trujillo I, Rosa R, Rallo L, Giménez MJ. 2001.** Polimorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126(1):64-71.
- Belaj A, Satovic Z, Rallo L, Trujillo I. 2002.** Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. Theoretical and Applied Genetics 105(4):638-644.
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldóni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. 2003.** Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and Applied Genetics 107(4):736-744.
- Bertin I, Zhu JH, Gale MD. 2005.** SSCP-SNP in pearl millet –a new marker system for comparative genetics. Theor. Appl. Genet. 110:1467-1472.
- Besnard G, Khadari B, Villemur P, Berville A. 2000.** Cytoplasmic Male-Sterility in the Olive (*Olea europaea* L.). Theor. Appl. Genet. 100:1018-1024.
- Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Bervillé A. 2001.** Cultivar identification in olive based on RAPD markers. J. Am. Soc. Hort. Sci. 126:668-675.
- Besnard G, Garcia-Verdugo C, De Casas RR, Treier UA, et al. 2008.** Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. Ann. Bot. 101:25-30.
- Besnard G, Bervillé A. 2002.** On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 104(6-7):1157-1163.
- Bobone. 1933.** Ensaio Sobre a Caracterização das Variedades da Oliveira. Estudo Biométrico. XI Congresso Int. De Oleicultura, Lisboa. Nov. 1933,1-75.

- Bogani P, Cavaliere D, Petruccelli R, Polsinelli L, Roselli G, Lavee S, Klein I. 1994.** Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.* 356:98-101.
- Bornet B, Branchard M. 2001.** Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:209-215.
- Botstein D, White R, Skolnick M, Davis R. 1980.** Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Bracci T, Sebastiani L, Busconi M, Fogher C. 2009.** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sci. Hortic.* 122:209-215.
- Brachet S, Jubier M, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N. 1999.** Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Mol. Ecol.* 8:157-168.
- Caballero J, del Rio C. 1999.** Conservación de recursos genéticos del olivo. Seminario Internacional sobre innovaciones científicas y su aplicación en la olicultura y la elaiotecnia. Consejo Oleícola Internacional. Florencia.
- Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, Glorio G. 2002.** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104:301-307.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. 1997.** Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor, Appl. Genet.* 99:152-154.
- Cimato A. 1993.** Germoplasma dell' olivo in Toscana. Giunta Regionale.
- Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A, Testolin R. 2002.** Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104:223-228.
- Claros MG, Crespillo R, Aguilar ML, Canovas FM. 2000.** DNA-Fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116:131-142.
- Comet G. 1996.** "Economía Oleícola en la edad media". In Consejo Oleícola Internacional (Ed.), *Enciclopedia Mundial del Olivo*. Madrid: Consejo Oleícola Internacional, pp 50-52.
- Contento A, Ceccarelli M, Gelati M, Maggini F, Baldoni L, Cionin P. 2002.** Diversity of *Olea* genotypes and the origin of cultivated olives. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(8):1229-1238.
- Cordeiro AI, Sanchez-Sevilla JF, Alvarez-Tinaut MC, Gomez-Jimenez MC. 2008.** Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* L. by RAPD markers. *Biologia Plantarum* 52:642-647.
- Corraliza-Pérez JF. 1998.** Informe sobre el sector del olivar, del aceite de oliva y de la aceituna de mesa en Extremadura. Consejería de Agricultura y Comercio de la Junta de Extremadura.

- Cresti M, Linskens UF, Mulcahy DL, Bush S, Distilio J, Xu MY, Viguani R, Cimato A. 1994. Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and in olive of *Olea europaea* L. Adv. Hort. Sci. 10:105-107.
- Dean RE, Dahlberg JA, Hopkins MS, Mitchell SE, Kresovich S. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national sorghum collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. Crop Sci. 39:1215-1221.
- De la Rosa R, James CM, Tobutt KR. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. Molecular Ecology Notes, 2:265-267.
- De la Rosa R, Angiolillo A, Guerrero C, Pellegrini M, Rallo L, Besnard G, Berville A, Martín A, Baldón L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivares using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 106(7):1273-1282.
- De Giovanni C, Dell'Orco P, Bruno A, Ciccarese F, Lotti C, Ricciardi L. 2004. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. Plant Science 166:41-48.
- Díaz A, De la Rosa R, Martín A, Rallo P. 2006. Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. Tree Genet. Genomes 2:165-175.
- Dos Santos JB, Neinhuis J, Skroch P, Tivang J, Slocum MK. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. Theor. Appl. Genet. 87:909-915.
- Dosba F, Saunier R. 1998. La caractérisation variétale fruitière en France. Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France 84:171-180.
- Dufresne PJ, Jenni S, Fortin MG. 2004. FRET hybridization probes for the rapid detection of disease resistance alleles in plants: detection of corky root resistance in lettuce. Molecular Breeding 13:323-332.
- Edwards KJ, Mogg R. 2001. Plant genotyping by analysis of single nucleotide polymorphisms. En: Henry RJ. (ed.). Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plant. CAB International.
- Esquinas-Alcazar JT. 1999. Biotechnologies and genetic resources for food and agriculture. Forum Genova 9 (3 Suppl 3):84-7.
- Fabri A, Hormaza JI, Polito VS. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivares. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:538-542.
- Fang DO, Roose ML, Krueger RR, Federici CT. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLP, and Inter Simple-Sequence Markers. Theoretical and Applied Genetics, 95:211-219.
- FAO [online]. www.fao.org/docrep/.

- Feio M. 1991.** Clima e agricultura: exigências climáticas das principais culturas e potencialidades agrícolas do nosso clima / Mariano Feio.- Lisboa : Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, 1991.- 266p. : il.; 23 cm. Climatologia aplicada. Geografia rural e agrária.
- Feng XH, Zhao Y, Bottino PJ, Kung SD. 1993.** Cloning and characterization of a novel member of protein kinase family from soybean. *Biochimica et Biophysica Acta* 1172:200-204.
- Fiorino P, Nizzi-Grifi F. 1992.** La oleicultura y su expansión. *Olivae* 44: 9-12.
- Flis B, Hermig J, Strzelczyk-Zyta D, Gebhardt C, Marezewski W. 2005.** The Ry-f(sto) gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122(718) in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding* 15: 95-101.
- Fontanazza G, Baldoni L. 1990.** Proposed programme for the genetic improvement of the olive. *Olivae* 34:32-40.
- Frezzotti, G. 1928.** L'olivicultura e l'oleificio in Albania. *Oleum*. 28 Febbraio 1930-VIII.
- Galderisi U, Cipollaro M, Dibernardo C, Demasi L, Galano G, Cascino A. 1998.** Molecular typing of italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphisc DNA análisis. *J. Of Hort Sci & Biotech* 73:259-263.
- García-Férriz L, Ghorbel R, Ybarra M, Mari A, Belaj, A.; Trujillo, I. 2001.** Micropropagación de olivo a partir de material adulto. *Fruticultura profesional* 120:73-75.
- García-Mas J, Graziano E, Aranzana MJ, Monforte A, Oliver M, Ballester J, Viruel MA, Arus P. 2000.** Marcadores de ADN: Concepto, tipos, protocolos. En: Nuez F y Carrillo JM. (eds). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Garrido-Fernández A, Romero-Barranco C. 1999.** Calidad de las aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites* 50 (3):225-230.
- Gebhardt C, Mugnieri D, Reitter E, Salamini F, Bonnel E. 1993.** Identification of RFLP markers closely linked to the Hl gene to conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 85: 541-544.
- Gemas V, Almadanim M, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P. 2004.** Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51(5):501-511.
- Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Caligari PDS. 1999.** Developing an appropriate strategy to asses genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 98:1125-1131.
- Gomes S, Martins-Lopes P, Lopes J and Guedes-Pinto H. 2009.** Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 27:365-373.
- Gómez-Jiménez MC, Cordeiro AI, Espinosa Borreguero F, Alvarez-Tinaut MC. 2006.** Las variedades de olivo en Portugal. Universidad de Extremadura (eds.). Mérida (Badajoz).144 pp.

Gonzalo MJ, Oliver M, Garcia-Mas J, Monfort A, Dolcet-Sanjuan R, Katzir N, Arus P, Monforte JA. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L). *Theor. Appl. Genet.* 110:802-811.

Grati-Kamoun N, Khilf M, Ayadi M, Karray B. 2000. Clonal selection of olive cv. Chemlali de Sfax: preliminary results. Proceeding of the 4th International Symposium on Olive Growing, Valenzano (Bari), Italy.

Greenarce MJ. 1984. Theory and applications of correspondence analysis. Academic press. New York.

Gu KW, Weeden NF, Yu J, Wallace DH. 1995. Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor. Appl. Genet.* 91:465-470.

Gu IG. 2001. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* 17:475-492.

Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* 118:369-391.

Gutiérrez Gonzalez-Quijano R, Janer del Valle ML, Gutiérrez-Rosales F, Vázquez-Roncero A. 1977. Relación entre los polifenoles y la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites* 28:101-106.

Hackauf B, Wehling P. 2005. Approaching the self-incompatibility locus Z in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor. Appl. Genet.* 110:832-845.

Hagidimitriou M, Katsiotis A, Menexes G, Pontikis C, et al. 2005. Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:211-217.

Hajeer A, Worthington J, John S. 2000. SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. En: *Biotechniques: Molecular laboratory methods series*. Eaton Publishing, Manchester, U.K.

Hamada H, Seidman M, Howard BH, Gorman CM. 1984. Enhanced gene expression by the poly (dT-dG)-poly(dC-dA) sequence. *Mol. Cell. Biol.* 4:2622-2630.

Hamada H, Petrino M, Takugana T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in diverse eucaryotic genomes. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* 79:6465-6469.

He JP, Ke LP, Hong DF, Xie Y, Wang G, Liu P, Yang G. 2008. Fine mapping of a recessive genic male sterility gene (Bnms3) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP- and Arabidopsis-derived PCR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 11-18.

He GH, Prakash CS. 1997. Identification of Polymorphic DNA markers in cultivated Peanut. *Euphytica* 97:143-149.

- Hernández P, De La Rosa R, Rallo L, Dorado G, Martin A. 2001a. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea* L.) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 103: 788-791.
- Hernández P, De La Rosa R, Rallo L, Martin A, Dorado G. 2001b. First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea* L.): implications in plant variety identification by SCAR-marker development. *Theor. Appl. Genet.* 102:1082-1087.
- Hess J, Kadereit JW, Vargas P. 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer-1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol. Ecol.* 9:857-868.
- Heywood HU. 1978. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, London. 335 pp.
- Hormanza JL, Dollo C, Polito VS. 1994. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* (pistacio, Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Econ. Bot.* 48:344-358.
- Ipek A, Barut E, Gulen H, Oz AT, et al. 2009. SSR analysis demonstrates that olive production in the southern Marmara region in Turkey uses a single genotype. *Genet. Mol. Res.* 8:1264-1272.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.
- Jeffreys, A.J.; Wilson, V. and Thein, S.L. 1985. Individual-specific "fingerprints" on human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Juchum FS, Leal JB, Santos LM, Almeida MP, Ahnert D, Correa RX. 2007. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemao ex Benth.) using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 6:543-553.
- Ke LP, Sun YQ, Hong DF, Liu PW, Yang GS. 2005. Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed rape, *Brassica napus*. *Plant Breeding* 124:367-370.
- Kelly JD. 1995. Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Breeding for Major Gene Resistance to Plant Pathogens. *HortScience* 30:461-465.
- Kidd K, Ruano G. 1995. Optimazing PCR. In: *PCR 2 a Pratical approach*. Ed, McPherson, Hames e Taylor, IRL Press. Oxford.
- Konieczny A, Ausubel FM. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4:403-410.
- Lambooy WF, Yu J, Forsline PL, Weeden NF. 1996. Partitioning of allozyme diversity in wild populations of *Malus sieversii* L. and implications for germoplasm collection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:982-987.
- Lavee S. 1990. Aims, methods, and advances in breeding of new olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Acta Horticultrae* 286:23-36.

- Lavee S. 1994. ¿Porqué la necesidad de nuevas variedades de olivo? En Olivicultura. Fundación "la Caixa"- Agrolatino. pp. 29-37.
- Lee D, Reeves JC, Cooke RJ. 1996. DNA profiling for varietal identification in crop plants. *Diagnostics in Crop Production*, 65:235-240.
- Lefebvre V, Chevre AM. 1995. Tools for marking plant disease and pest resistance genes, a review. *Agronomie*, 15:3-19.
- Lefort F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC. 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Mol. Ecol.* 8:1075-1092.
- Leroy XJ, Leon K. 2000. A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:283a-283g.
- Lin H, Walker MA. 1998. Identifying Grape Rootstocks With Simple Sequence Repeat (SSR) DNA Markers. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:4:403-407
- Lipshchitz N, Gopna R, Hartman M, Biger G. 1991. The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the old world: a reassessment. *Journal of Archaeological Science* 18:441-453.
- Litt M, Luty Y. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Loukas M, Krimbas CB. 1983. History of olive cultivars based on their genetic distances. *J. Hort Sci.* 58:121-127.
- Lumaret R, Amane M, Ouazzani N, Baldoni L, Debain C. 2000. Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild olive taxa of the genus *Olea* L. *Theor. Appl. Genet.*, 101:547-553.
- Matsuoka Y, Mitchell SE, Kresovich S, Goodman M, Doebley J. 2002. Microsatellites in *Zea* variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104:436-450.
- McPherson RA. 1995. Molecular basis of genetic disease and molecular methods. *Clin Lab Med.* 1995 Dec;15(4):779-94. Review.
- Mekuria GT, Collins GG, Sedgley M. 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74:309-314.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird W, Bonar N, Powel JW, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel M, Tingey S, Rafalski A. 1997. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed.* 3:225-238.
- Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphism: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* 14: 387-392.

- Nicese FP, Hormaza JI, McGranaham CH. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica* 101:199-206.
- Nikoloudakis N, Banilas G, Gazis F, Hatzopoulos P. 2003. Discrimination and genetic diversity among cultivated olives of Greece using RAPD markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:741-746.
- Nishi T, Tajima T, Noguchi S, Ajisaka H, Negishi H. 2003. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. *Theor. Appl. Genet.* 106:765-770.
- Nuez F, Carrillo JM. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editorial de la UPV. Valencia.
- Obert DE, Fritz AK, Moran JL, Singh S, Rudd JC, Menz MA. 2005. Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 110:1439-1444.
- Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245:1434-1435.
- Oraguzie NC, Gardiner SE, Basset CM, Stefanati M, Ball RD, Bus VGM, White AG. 2001. Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. Germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:318-328.
- Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2766-2770.
- Ortiz JM, Aguinalalde I, Martín JP. 2000. Identificación varietal. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. 515-559.
- Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Guisto F. 1993. Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J. Hered.* 84:34-42.
- Ouazzani N, Lumaret R. 1996. Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica* 91(1): 9-20. {a} Dep. Arboriculture, Ecole Nationale Agriculture, BP S40, Meknes, Morocco.
- Paran I, Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- Peleg Z, Fshima T, Abbo S, Krugman T, Saranga Y. 2008. Genetic structure of wild emmer wheat populations as reflected by transcribed versus anonymous SSR markers. *Genome* 51:187-195.
- Pillay M, Kenny ST. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theor. Appl. Genet.* 92:334-339.
- Powell W, Morgante M, Andre Ch, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-238.

- Prataviera AG. 1999.** Los estudios del olivo y la clasificación botánica de este árbol. *Olivae* 78:60-77.
- Preston LR, Harker N, Holton T, Morell MK. 1999.** Plant cultivar identification using DNA analysis. *Plant Var. Seeds* 12(3):191-205.
- Prevost G, Mostardini S. 1999.** Los estudios del olivo y la clasificación botánica de este árbol. *Olivae* 78:60-77.
- Priego J. 1935.** Las variedades de olivo generalizadas en España. 51pp. +XVIII láminas. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Madrid.
- Rafalski A. 2002a.** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5:94-100.
- Rafalski A. 2002b.** Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162:329-333.
- Rafalski JA, Tingey SV. 1993.** Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9:275-280.
- Rajapakse S, Ballard RE. 1997.** Cultivar identification using molecular methods. *Biotech. Ornamental Plants* 1997:153-164.
- Rahman M, McVetty PBE, Li G. 2007.** Development of SRAP, SNP and Multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1101-1107.
- Rallo L. 1986.** En torno al olivar. Editorial Universidad de Córdoba. 23 pp.
- Rallo L. 1995.** Selección y mejora genética del olivo en España. *Olivae* 59:46-53.
- Rallo L, Barranco D, Caballero JM, del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I. 2005.** Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Rallo P, Dorado G, Martín A. 2000.** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101:984-989.
- Rallo P, Tenzer I, Gessler C, Baldoni L, et al. 2003.** Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor. Appl. Genet.* 107:940-946.
- Rapoport H. 2001.** Botánica y Morfología, Cap. 2, pp.35-60. Coord. Barranco, D.; Fernández-Escobar, D.; Rallo, L. El cultivo del olivo 4ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Ritschel P, Lins T, Tristan R, Buso G, Buso J, Amauri J, Ferreira M. 2004.** Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 4 (1):9-23.

- Robinson RW, Provvidenti R, Shroeder WT. 1970.** A marker gene for tobacco mosaic resistance. *TGC Rep.* 20:55.
- Rodrigues FM. 1999.** A cultura da Oliveira. Textos de apoio as aulas de Técnicas de Produção Agrícola II, Escola Superior Agrária de Elvas. Instituto Politécnico de Portalegre.
- Rohlf FJ. 2002.** NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- Rojas-Barros P, Hu JG, Jan CC. 2008.** Molecular mapping of an apical branching gene of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 117:19-28.
- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB. 1995.** The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor, Appl. Genet.* 90:43-48.
- Roubos K, Moustakas M, Aravanopoulos FA. 2010.** Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. *Genetics and Molecular Research* 9 (3):1865-1876.
- Rowland LJ, Nguyen B. 1993.** Use of polyethylene glycol for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. *BioTechniques* 14:734-736.
- Rubio MJ, Arús P. 1997.** Un vivero español, "Agromillora Catalana", aplica en su producción de planta de olivo un control de calidad genético y sanitario basado en las tecnologías de RAPDs y Elisa-Das. *Fruticultura*, 88: 14-18.
- Ruby MJ. 1917.** Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur les varietes cultivars en France. *Ann. Des Sci. Nat.* 9.
- Salman-Mikov A, Levi A, Wolf S, Trebitsh T. 2008.** ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. *Plant and Cell Physiology* 49: 740-750.
- Sambrook J, Fristish EF, Maniatis T. 1989.** "Molecular cloning. A laboratory Manual". CHS Laboratory Press, New York.
- Sanz-Cortés F, Badenes ML, Paz S, Iñiguez A, Llácer G. 2001.** Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:7-12.
- Sarri V, Baldoni L, Porceddu A, Cultrera NG, et al. 2006.** Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome* 49:1606-1615.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonca D, Dos Santos MR, Da Camara Machado ML, Dacamara Machado A. 2000.** Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9:1171-1173.
- See D, Kanazin V, Talbert H, Blake T. 2000.** Electrophoretic detection of singlenucleotide polymorphisms. *BioTechniques* 28:710-716.

- Sfax K. 1923.** The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-560.
- Silberstein L, Kovalski I, Brotman Y, Perin C, Dogimont C, Pitrat M, Klingler J, Thompson G, Portnoy V, Katzir N, Perl-Treves R. 2003.** Linkage map of *Cucumis melo* including phenotypic traits and sequence-characterized genes. *Genome* 46:761-773.
- Silva CG, Yamanaka N, Brogin RL, Arias AA, Nepomuceno L, Di Mauro A, Pereira S, Nogueira LM, Passianotto AL, Abdelnoor RV. 2008.** Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 117:57-60.
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B. 1997.** Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 97:264-272.
- Spennemann DHR. 1999.** Breve historia de la introducción del olivo en Australia. *Olivae* 77:22-28.
- Staub JE, Box J, Meglic V, Horejsi TF, McCreig JD. 1997.** Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data determining intraspecific variation in *Cucumis*. *Genet. Res. Crop. Evol.* 4 :257-259.
- Staub JE, Serquen FC. 1996.** Genetic markers, Map construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience* 31:729-741.
- Tagu D, Moussard C. 2003.** Principes des techniques de biologie moléculaire. INRA. Paris.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW. 1989.** RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-263.
- Tatineni V, Cantrell RG, Davis DD. 1996.** Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. *Crop Sci* 36:186-192.
- Taylor G. 1991.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: *PCR a practical approach*. Eds. McPherson, M.J., B.D. Hames y G.R. Taylor. IRL Press. Oxford.
- Tautz. 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for a polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.
- Tautz D, Renz M. 1984.** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12(10):4127-38.
- Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A. 1999.** Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98(1):171-177.
- Torjek O, Kiss E, Mazik-Tokei K, Hutvagner GY, Silhavy D, Banfalvi ZS, Kertesz Z, Pauk J, Hessz L. 2002.** Molecular homogeneity of conventional and doubled haploide wheat cultivars and their DH lines. *Novenytermeless* 51:7-20.

- Tous J, Romero A. 1993.** Variedades de olivo. Con especial referencia a Cataluña. Fundación "La Caixa"- AEDOS. Barcelona.
- Trapero A, Blanco MA. 1999.** Enfermedades. En: El cultivo del olivo. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (Eds.). Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía.
- Truco M, de Vicente C. 1995.** Identificación varietal en especies de los generos Prunus, Malus y Pyrus con marcadores moleculares. VI Congreso de la Sociedad Española de ciencias Hortícolas. pp 140.
- Trujillo I, Arus P, Rallo L. 1995.** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:318-324.
- Tseng YT, Lo HF, Hwang SY. 2002.** Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:99-105.
- Uceda M, Hermoso M. 1994.** Aceites Andaluces. Denominaciones de origen. Fruticultura profesional, suplemento al 62:113-120.
- Uceda M, Hermoso M. 1998.** La calidad del aceite de oliva. En 'El cultivo del olivo', pp. 18-33. Ed. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo. Mundi-Prensa, Madrid.
- Van Berloo R, Zhu AG, Ursem R, Verbakel H, Gort G, van Eeuwijk FA. 2008.** Diversity and linkage disequilibrium analysis within a selected set of cultivated tomatoes. Theoretical and Applied Genetics 117:89-101.
- Vázquez Roncero A, Janer del Valle C, Janer del Valle ML. 1975.** Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. Grasas y Aceites 26:14-18.
- Vázquez JF, Sanchez-Yelamo MD, Carrillo JM. 2000.** Marcadores morfológicos y bioquímicos. En: Nuez F. y Carrillo JM. (eds). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Venkatachalam L, Sreedhar RV, Bhagyalakshmi N. 2008.** The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47:974-985.
- Vergari G, Patumi M, Fontanazza G. 1996.** Use of RAPDs markers in the characterisation of olive germplasm. Olivae 60: 19-22.
- Vinod MS, Raghavan PS, George S, Parida A. 2007.** Identification of a sex-specific SCAR marker in dioecious *Pandanus fascicularis* L. (Pandanaceae). Genome 50: 834-839.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.

Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 19:861-866.

Wiesman Z, Avidan S, Lavee S, Quebedeaux B. 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West bank using randomly amplified polymorphisms amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(5):837-841.

Williams JGK, Rubelik AR, Livak KJ, Rafalski A, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

Wu K, Jones R, Danneberger L, Scolnik PA. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22:3257-3258.

Young ND. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 5:505-510.

Zabeau M, Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification. A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application. Publ. 0534858A1.

Zohary D. 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Hort.* 356:62-65.

Zohary D, Hopf M. 1994. Domestication of plants in the Old World, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, UK.

Zohary D, Spiegel-Roy. 1975. Beginning of fruit growing in the old world. *Science* 187:319-327.



1.7. ANEXOS

Anexo I

Anexo I. LAS 116 ACCESIONES DE LAS 48 DENOMINACIONES VARIETALES DE OLIVO ENCONTRADAS EN ESTE TRABAJO, SU Nº DE REGISTRO, Y SU LOCALIZACIÓN EN EXTREMADURA.

Denominación varietal	Nº de registro de las accesiones	Localidad (Área de Cultivo)	Provincia
"Morisca"	1	Santos de Maimona	Badajoz
	89	Mérida	Badajoz
	10	Berlanga	Badajoz
	27	Hornachos	Badajoz
	5	Berlanga	Badajoz
	62	Herrera del Duque	Badajoz
	69	Talarrubias	Badajoz
	7	Berlanga	Badajoz
"Oliva"	4	Berlanga	Badajoz
	36	Fuente del arco	Badajoz
"Pico Limón"	57	Monesterio	Badajoz
	26	Hornachos	Badajoz
	39	Fuente del Arco	Badajoz
	6	Berlanga	Badajoz
	67	Talarrubias	Badajoz
	17	Navalvillar de Pela	Badajoz
	46	Coria	Cáceres

"Manzanilla Cacereña"	75	Talarrubias	Badajoz
	102	Cañamero	Cáceres
	84	Alia	Cáceres
"Pico Real"	9	Berlanga	Badajoz
"Azulejo"	11	Berlanga	Badajoz
	33	Fuente del Arco	Badajoz
"Perito"	12	Berlanga	Badajoz
	37	Fuente del Arco	Badajoz
"Manzanilla Real"	13	Navalvillar de Pela	Badajoz
"Corniche"	14	Navalvillar de Pela	Badajoz
	85	Alia	Cáceres
"Cuerno Real"	15	Navalvillar de Pela	Badajoz
	98	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
	80	Navalvillar de Pela	Badajoz
"Redondil"	19	Villar del Rey	Badajoz
	43	San Vicente de Alcantara	Badajoz
	21	Alburquerque	Badajoz

"Cordovil"	20	Villar del Rey	Badajoz
"Ocal"	24	Alburquerque	Badajoz
"Colora"	18	Villar del Rey	Badajoz
	25	Alburquerque	Badajoz
"Cañaval"	34	Fuente del Arco	Badajoz
"Tempranillo"	35	Fuente del Arco	Badajoz
"Gordal"	32	Hornachos	Badajoz
	60	Burguillos del Cerro	Badajoz
	40	Fuente del Arco	Badajoz
	71	Talarrubias	Badajoz
"Galega"	41	San Vicente de Alcantara	Badajoz
	111	Talarrubias	Badajoz
"Pajonala"	44	San Vicente de Alcantara	Badajoz
"Bical"	45	San Vicente de Alcantara	Badajoz
"Gorda"	42	San Vicente de Alcantara	Badajoz
	23	Alburquerque	Badajoz
	31	Hornachos	Badajoz

"Manzanilla"			
	38	Fuente del Arco	Badajoz
	50	Don Benito	Badajoz
	53	Monesterio	Badajoz
	59	Burguillos del Cerro	Badajoz
	64	Herrera del Duque	Badajoz
	8	Berlanga	Badajoz
	82	Navalvillar de Pela	Badajoz
	87	Mérida	Badajoz
	92	Puebla de Alcocer	Badajoz
	96	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
	97	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
	72	Talarrubias	Badajoz
	"Limoncilla"	47	Don Benito
68		Talarrubias	Badajoz
"Minuina"	48	Don Benito	Badajoz
"Azulito"	52	Monesterio	Badajoz
"Cañaveral"	54	Monesterio	Badajoz
"Jariego" o "Juriega"	56	Monesterio	Badajoz

	112	Navalvillar de Pela	Badajoz
"Hojiblanca"	74	Talarrubias	Badajoz
"Cornicabra"	78	Talarrubias	Badajoz
	14	Navalvillar de Pela	Badajoz
	66	Herrera del Duque	Badajoz
	90	Merida	Badajoz
"Cornezuelo"	63	Herrera del Duque	Badajoz
	79	Navalvillar de Pelas	Badajoz
	103	Cañamero	Cáceres
"Corniche"	85	Alia	Cáceres
	93	Puebla de Alcocer	Badajoz
"Verdial de Badajoz"	83	Navalvillar de Pela	Badajoz
	88	Mérida	Badajoz
	113	Talarrubias	Badajoz
	16	Navalvillar de Pela	Badajoz
	29	Hornachos	Badajoz
	3	Santos de Maimona	Badajoz
	51	Don Benito	Badajoz

	58	Mérida	Badajoz
	61	Herrera del Duque	Badajoz
	94	Puebla de Alcocer	Badajoz
"Fina"	95	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
"Carrasqueña"	99	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
	106	Talarrubias	Badajoz
	2	Santos de Maimona	Badajoz
	30	Hornachos	Badajoz
	86	Badajoz	Badajoz
"Acebuche"	100	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
	81	Navalvillar de Pela	Badajoz
	91	Mérida	Badajoz
"Basta extremeña"	101	Feria	Badajoz
"Picual"	104	Olivenza	Badajoz
	49	Don Benito	Badajoz
	65	Herrera del Duque	Badajoz
	76	Talarrubias	Badajoz
"Arbequina"	105	Olivenza	Badajoz
	77	Talarrubias	Badajoz
"Original"	114	Navalvillar de Pela	Badajoz

"Cojón del gallo"	115	La Nava de Benquerencia de la Serena	Badajoz
"Judiego"	116	Puebla de Alcocer	Badajoz
"Sevillano"	22	Villar del Rey	Badajoz
"Picudo"	55	Monesterio	Badajoz
	110	Talarrubias	Badajoz
"Aloreña"	70	Talarrubias	Badajoz
"Canfanil"	73	Talarrubias	Badajoz
"Avellanilla"	107	Talarrubias	Badajoz
"Lechin"	108	Talarrubias	Badajoz
"Blanqueta"	109	Talarrubias	Badajoz

Anexo 2

Anexo 2. METODOLOGÍA ADOPTADA PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS VARIEDADES DE OLIVO

Estas líneas pretenden describir la metodología que se ha de emplear para describir variedades de olivo en colección o campo mediante una serie de caracteres morfológicos (del árbol, de la hoja adulta, de la inflorescencia, del fruto y del endocarpo bien desarrollados).

Los caracteres propuestos por el Consejo Oleico Internacional (COI) para la caracterización de los materiales de olivo son los siguientes:

1. Caracteres del árbol:

Se consideran tres caracteres cualitativos (vigor, porte y densidad de copa) y uno cuantitativo (longitud de los entrenudos).

Vigor - Hace referencia tanto al tamaño del árbol como a la capacidad intrínseca de las ramas principales y de los ramos para crecer en longitud y en grosor. Se distinguen las siguientes categorías:

Bajo: Árbol con poco crecimiento, incluso en condiciones agronómicas óptimas. El tronco y la superficie de proyección de la copa en la fase adulta son claramente menores de lo que se espera de un ejemplar de esta especie.

Medio: Árbol que, en cada zona y para las prácticas de cultivo habituales, representa el desarrollo medio que se espera de un olivo.

Elevado: Árbol que, para cada zona y para las prácticas de cultivo habituales, presenta un crecimiento importante, un desarrollo notable del tronco y de la copa en altura y en volumen, con ramas vigorosas y largas.

Porte - Este carácter describe la distribución natural de las ramas principales y de los ramos, sin que influya la formación adoptada y con poca influencia del vigor. Se distinguen tres clases:

Llorón: Caracterizado por una ramificación plagiogeótrapa, es decir, por ramos y ramas de poco diámetro, que crecen desde el principio inclinados hacia abajo.



Fig. Porte llorón

Abierto: Es el porte natural de la especie; caracterizable por una ramificación inicial ortogeótopa. Después, el peso de la copa y/o de la cosecha obligan al ramo a inclinarse y a dirigirse en el sentido de la mayor disponibilidad de espacio y de luz, de forma que la copa adquiere una forma hemisférica (incluso en el caso de tener el olivo varios pies, éstos se distinguen siempre por una pronunciada individualidad).



Fig. Porte abierto

Erguido: Este porte es característico de algunos cultivares cuyas ramas principales crecen con tendencia a la verticalidad y presentan una dominancia apical acusada. El árbol adquiere un aspecto cónico más o menos pronunciado que se convierte en cilíndrico cuando llega a adulto. Aunque el porte erguido no siempre va unido al vigor, como norma general los cultivares de porte erguido suelen ser también vigorosos, aunque con notables excepciones.



Fig. Porte erguido

Densidad de copa - Este parámetro indica la abundancia de vegetación de la copa, que se puede medir por la posibilidad de penetración de la luz. Es el resultado de las interacciones entre la longitud de los entrenudos, el número y vigor de los ramos y el tamaño de las hojas. Se clasifica en tres categorías:

Clara: Está normalmente asociada a cultivares de crecimiento rápido con entrenudos largos. Desde cualquier punto se observan "claros" a través de los cuales puede penetrar la luz.

Media: Es la densidad típica de la especie: la vegetación es abundante pero la longitud de los entrenudos y el crecimiento dejan siempre sectores interiores de la copa en los que se produce el efecto de penumbra.

Espesa: Es característica de los cultivares con entrenudos cortos, que presentan una ramificación abundante y muy frondosa. La copa se presenta como una superficie compacta cuya parte interior está sombreada.

Longitud de los entrenudos - Este carácter se observa en 8-10 ramos fructíferos situados alrededor del árbol a la altura del observador. Se distinguen las siguientes clases:

Cortos (< 1 cm)

Medios (1-3 cm)

Largos (> 3 cm)

2. Caracteres de la hoja:

Los tres primeros son cuantitativos y el cuarto cualitativo y se observarán en muestras de aproximadamente 40 hojas adultas tomadas de la zona media de 8-10 brotes del año, elegidos de entre los más representativos del árbol en su cara Sur a la altura del observador.

Forma: Determinada por la relación entre la longitud (L) y la anchura (A).

Elíptica ($L/A < 4$)

Elíptico-lanceolada ($L/A 4-6$)

Lanceolada ($L/A > 6$)



Fig. Forma de la hoja: elíptica; elíptico-lanceolada y lanceolada

Longitud:

Corta (< 5 cm)

Media (5-7 cm)

Larga (> 7 cm)

Anchura:

Estrecha (< 1 cm)

Media (1-1,5 cm)

Ancha ($> 1,5$ cm)

Curvatura longitudinal del limbo. Su eje longitudinal permite clasificar la lámina foliar como:

Epinástica

Plana

Hiponástica

Helicoidal



Fig. Curvatura longitudinal del limbo de la hoja: epinástica, plana; hiponástica y helicoidal

3. Caracteres de la inflorescencia

Se consideran la longitud y el número de flores de muestras de 40 inflorescencias en el estado de botón blanco, tomadas de la zona media de 8-10 ramos fructíferos (del año anterior), elegidos de entre los más representativos del árbol en su cara sur.

Longitud:

Corta (< 25 mm)

Media (25-35 mm)

Larga (> 35 mm)

Número de flores/inflorescencia:

Bajo (< 18 flores)

Medio (18-25 flores)

Alto (> 25 flores)

4. Caracteres del fruto

Determinados en una muestra de 40 frutos tomados de la zona media de ramos fructíferos, elegidos de entre los más representativos del árbol en su cara sur y eliminando los pequeños y los grandes.

En algunos caracteres se hace mención a dos posiciones. Se llama posición "A" aquella en la que el fruto presenta generalmente mayor asimetría al sujetarlo por sus extremos entre los dedos índice y pulgar. La

posición "B" es la que resulta de girar 90° la anterior quedando la parte más desarrollada hacia el observador.

La descripción del fruto se realiza aproximadamente cuando concluye el envero o cambio de color que caracteriza el comienzo de la maduración, estimada por dicho criterio. De los 11 caracteres del fruto, los cuatro que llevan (*) se consideran de alto poder discriminante entre variedades.

Peso:

Bajo (< 2 g)

Medio (2-4 g)

Alto (4-6 g)

Muy alto (> 6 g)

Forma (en posición A): Determinada en función de la relación entre la longitud (L) y la anchura (A):

Esférica ($L/A < 1,25$)

Ovoidal ($L/A 1,25-1,45$)

Alargada ($L/A > 1,45$)



Fig. Forma (en posición A): Esférica, ovoidal e alargada

Simetría (en posición A): Determinada por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales:

Simétrico

Ligeramente asimétrico

Asimétrico



Fig. Simetría (en posición A): Simétrico; ligeramente asimétrico e asimétrico

Posición del diámetro transversal máximo (en posición B): Según su situación puede estar:

Hacia la base

Centrada

Hacia el ápice



Fig. Posición del diámetro transversal máximo (en posición B): Hacia la base; centrada y hacia el ápice

Ápice (en posición A):

Apuntado

Redondeado



Fig. Ápice (en posición A): Apuntado y redondeado

Base (en posición A):

Truncada

Redondeada



Fig. Base (en posición A): Truncada y redondeada

Pezón: Este carácter del punto estilar del fruto puede ser:

- Ausente
- Esbozado
- Evidente



Fig. Pezón: Ausente; esbozado e evidente

Presencia de lenticelas: Cuando el fruto aún está verde:

- Escasas
- Abundantes



Fig. Presencia de lenticelas: Escasas e abundantes

Tamaño de las lenticelas: Cuando el fruto aún está verde:

- Pequeñas
- Grandes



Fig. Tamaño de las lenticelas: Pequeñas y grandes

Lugar de inicio del enverado: Al comienzo del período de maduración, cuando aparecen las primeras manchas violáceas en la epidermis del fruto, éstas lo hacen:

- Desde la base
- Uniformemente por toda la epidermis
- Desde el ápice



Fig. Lugar de inicio del enverado: Desde la base; uniformemente por toda la epidermis y desde el ápice

Color en plena maduración: Observado al final del proceso de maduración por color, cuando el fruto alcanza el color definitivo:

Negro

Otros (especificar si es posible).

5. Caracteres del endocarpo

Evaluados en la muestra de 40 frutos antes mencionada. El endocarpo representa la porción interna, lignificada del fruto, que protege la semilla. Usualmente se denomina hueso al conjunto integrado por el endocarpo y la semilla. Al igual que en el fruto, en algunos caracteres se hace referencia a dos posiciones. La "A" corresponde normalmente a la de máxima asimetría y es aquella en que la sutura carpelar queda a la vista del observador. La posición "B" procede de un giro de 90° de la anterior, de modo que la porción más desarrollada queda hacia el observador.

Salvo el primero, todos los caracteres del endocarpo son de alto poder discriminante en la identificación de variedades.

Peso:

Bajo (< 0,3 g)

Medio (0,3-0,45 g)

Alto (0,45-0,7 g)

Muy alto (> 0,7 g)

Forma (en posición A): Determinada en función de la relación entre la longitud (L) y la anchura (A):

Esférica (L/A < 1,4)

Ovoidal (L/A 1,4-1,8)

Elíptica (L/A 1,8-2,2)

Alargada (L/A > 2,2)



Fig. Forma (en posición A): Esférica; ovoidal; elíptica e alargada

Simetría (en posición A): Determinada por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales:

Simétrico

Ligeramente asimétrico

Asimétrico

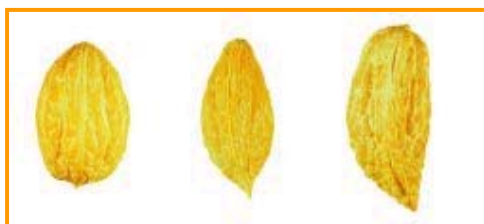


Fig. Simetría (en posición A): Simétrico; ligeramente asimétrico e asimétrico

Simetría (en posición B):

Simétrico

Ligeramente asimétrico



Fig. Simetría (en posición B): Simétrico y ligeramente asimétrico

Posición del diámetro transversal máximo (en posición B): Según su situación puede estar:

Hacia la base

Centrada

Hacia el ápice



Fig. Posición del diámetro transversal máximo (en posición B): Hacia la base; centrada y hacia el ápice

Ápice (en posición A):

Apuntado

Redondeado



Fig. Ápice (en posición A): Apuntado y redondeado

Base (en posición A):

Truncada

Apuntada

Redondeada



Fig. Base (en posición A): Truncada; apuntada y redondeada

Superficie (en posición B): Según la profundidad y abundancia de los haces fibrovasculares:

- Lisa
- Rugosa
- Escabrosa



Fig. Superficie (en posición B): Lisa; rugosa y escabrosa

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

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

Distribución de los surcos fibrovasculares:

- Uniforme
- Agrupados junto a la sutura



Fig. Distribución de los surcos fibrovasculares: Uniforme y agrupados junto a la sutura

Terminación del ápice:

- Sin mucrón
- Con mucrón



Fig. Terminación del ápice: Sin mucrón y con mucrón.

Capítulo 2



Capítulo 2:

**Identificación y análisis de la
expresión de genes de la biosíntesis
y señalización del etileno durante el
desarrollo y maduración
del fruto en olivo**

Capítulo 2: Identificación y análisis de la expresión de genes de la biosíntesis y señalización del etileno durante el desarrollo y maduración del fruto en olivo

2. 1. INTRODUCCION	183
2.1.1. EL OLIVO	183
2.1.1.1. Tejidos reproductivos	
2.1.1.2. Floración, polinización y fecundación	
2.1.1.3. Cuajado y abscisión de frutos	
2.1.1.4. Crecimiento y desarrollo del fruto	
2.1.1.5. Composición del fruto	
2.1.2. EL ETILENO	195
2.1.2.1. La biosíntesis de etileno en plantas	
2.1.2.2. Enzimas implicadas en la transformación de SAM a etileno	
2.1.2.3. La ruta de señalización del etileno	
2.1.3. EL ETILENO EN LA FLORACIÓN	211
2.1.4. EL ETILENO EN EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DE FRUTOS	213
2. 2. OBJETIVOS	221
2. 3. MATERIALES Y MÉTODOS	225
2.3.1. MATERIAL VEGETAL	225
2.3. 2. MÉTODOS	228
2.3.2.1. Determinaciones bioquímicas	
2.3.2.2. Líneas celulares utilizadas	
2.3.2.3. Extracción de ARN total	
2.3.2.4. Síntesis de ADNc	
2.3.2.5. Purificación de fragmentos de ADN	
2.3.2.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos	
2.3.2.7. Modificaciones de los ácidos nucleicos	
2.3.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa	
2.3.2.9. Análisis de expresión de diferentes transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR)	
2.3.2.11. Análisis y representación de datos	
2. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	245
2.4.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO, CONTENIDO DEL PRECURSOR DE SU SÍNTESIS Y SU CONJUGADO DURANTE EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DEL FRUTO EN EL OLIVO	245
2.4.1.1. Características del fruto de olivo en desarrollo	
2.4.1.2. Metabolismo de etileno durante la floración, el desarrollo y maduración del fruto en olivo	
2.4.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS DE LA SÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL FRUTO EN OLIVO	254

Índice

2.4.2.1. Aislamiento, caracterización y expresión de cDNAs relacionados con la biosíntesis de etileno en olivo	
2.4.2.2. Aislamiento, caracterización y expresión de cDNA relacionados con la señalización de etileno en olivo	
2.4.3. ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO EN OLIVO	285
2.4.4. INTERACCIÓN ENTRE ETILENO Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO	287
2. 5. CONCLUSIONES	295
2. 6. BIBLIOGRAFÍA	297



2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. EL OLIVO

2.1.1.1. Tejidos reproductivos

Las inflorescencias se desarrollan en las axilas foliares de los nudos del crecimiento vegetativo del año previo a la floración. La forma de las inflorescencias es paniculada: tienen un eje central del cual salen ramificaciones que, a su vez, también pueden ser ramificadas (Fig. 2.1). El pedúnculo que une la flor al eje de la inflorescencia es corto, de 2 mm a casi invisible. En las ramificaciones de las inflorescencias, las flores son aisladas o forman grupos de tres o cinco. Cada inflorescencia puede tener entre 10 y 40 flores según el cultivar y las condiciones fisiológicas y ambientales.

En las inflorescencias se presentan flores de dos tipos: perfectas y estaminíferas (Fig. 2.2). Las flores perfectas son hermafroditas, compuestas de estambres y pistilo bien desarrollados. Las estaminíferas o masculinas, también conocidas como imperfectas, tienen el ovario rudimentario o ausente, y parecen formarse debido a un fallo en el desarrollo del mismo. Como consecuencia de la falta de un ovario funcional, las flores estaminíferas no pueden dar lugar a la formación de un fruto. La proporción de flores estaminíferas (% aborto ovárico), así como el número de flores por inflorescencia, varía según el cultivar y el año. Su presencia en proporciones que pueden llegar hasta el 50% o más en años normales, no suele reducir la producción. Estudios histológicos indican que las yemas florales presentes en noviembre han desarrollado los primeros cinco nudos de la inflorescencia. El desarrollo posterior de la inflorescencia y

las flores transcurre a partir de la salida del reposo (aproximadamente en febrero), hasta la floración en primavera (Barranco et al., 2008).



Fig. 2.1. Inflorescencias paniculadas de olivo días antes de floración.

Las flores son pequeñas y actinomorfas, con simetría regular. El cáliz, constituido por el conjunto de los sépalos, es un pequeño tubo acampanado de color blanco verdoso que se mantiene junto a la base del ovario después de la caída de los pétalos. La corola está compuesta por cuatro pétalos blancos o blanco-amarillentos unidos a su base (Fig. 2.2). Los estambres son dos y están insertados en la corola en orientación opuesta. Constan de un filamento corto y una antera relativamente grande. Los numerosos granos de polen se forman en el interior de las anteras tras la meiosis de las células madres del polen. En el olivo, el desarrollo desde célula madre del polen hasta polen maduro transcurre durante las 6 semanas anteriores a la floración. El polen está maduro en antesis, cuando se abre la flor, y la dehiscencia de las anteras, liberando el polen, ocurre a partir de este momento durante aproximadamente 5 días. El grano de polen maduro, el microgametofito, es bicelular y consta de una célula vegetativa y una célula generativa. La pared exterior del grano de polen tiene una estructura específica característica de la especie; allí se ha propuesto que están localizadas proteínas de tipo alergógeno (Fernández y Rodríguez-García, 1988; Barranco et al., 2008).

En el centro de la flor se encuentra el pistilo, compuesto por un ovario súpero, un breve estilo y un estigma bilobulado y papiloso. El ovario tiene dos lóculos o cavidades, cada una de las cuales contiene dos óvulos o primordios seminales unidos por el funículo a la parte superior de la placenta central, que separa los dos lóculos (Fig. 2.3). Los óvulos son anátropos: durante su formación experimentan un giro estructural que acaba orientando el micropilo, la puerta por donde tiene que entrar el tubo polínico, hacia

la parte superior del ovario, cerca del estilo. Solamente uno de los cuatro óvulos será fecundado y seguirá su desarrollo para formar la semilla.

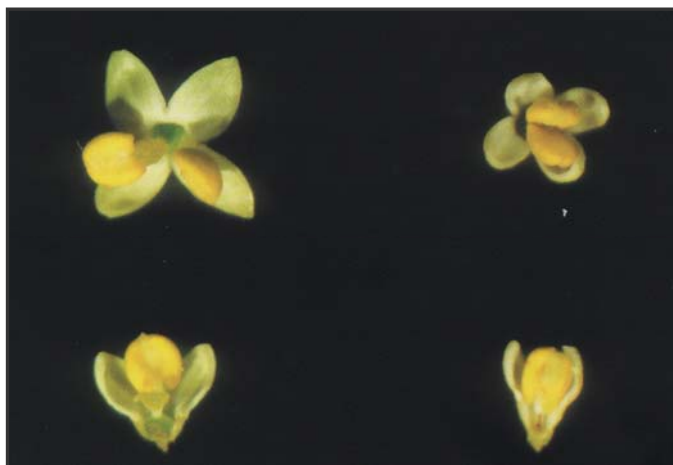


Fig. 2.2. Flores perfectas e imperfectas. Las flores de arriba están completas; las de abajo han sido cortadas por la mitad para poder visualizar mejor la estructura del pistilo. En los dos tipos de flores se aprecian dos grandes anteras amarillas rodeadas por cuatro pétalos blancos. La flor perfecta (izquierda) muestra un pistilo compuesto por un ovario redondo y verde, estigma y estilo prominente. En la flor imperfecta (derecha) todas las estructuras del pistilo son menores y de un color más amarillo verdusco. Fuente: Barranco et al. (2008).

En cada óvulo se forma un saco embrionario tras la meiosis y las siguientes divisiones nucleares de la megagametogénesis. Según estas divisiones el desarrollo del saco embrionario del olivo se ha caracterizado como bispórico de tipo *Allium*. El saco embrionario del olivo se encuentra maduro y receptivo para ser fecundado en el momento de la antesis, cuando se abren los pétalos. En el saco maduro se aprecian la ovocélula flanqueada por las dos sinérgidas en la zona micropilar y los dos núcleos polares en la zona central. Las otras tres células características del saco embrionario, las antípodas, son efímeras en el olivo. El desarrollo completo desde célula madre del megagametofito hasta saco embrionario maduro transcurre en las tres semanas antes de floración (King, 1938, Extremera et al., 1988).

En algunos óvulos el desarrollo del saco embrionario es incompleto o anormal (Barranco et al., 2008). Esta condición parece resultar de un fallo meiótico en las primeras fases de la megagametogénesis y conduce a la formación de un estrecho canal micropilar largo. Esto es el caso general en el cultivar ornamental 'Swan Hill', que no fructifica por ello, y también ocurre en cierta proporción en los primordios seminales de los cultivares fructíferos. Sin embargo, como solamente se requiere un primordio seminal

desarrollado y viable de los cuatro por ovario para efectuar la fecundación, en años normales los sacos no desarrollados no parecen disminuir la producción (Rapoport y Rallo, 1991; Barranco et al., 2008).



Fig. 2.3. Sección histológica longitudinal de un pistilo. El pistilo, la parte femenina de la flor, está compuesto por el estigma, el estilo y el ovario. Por el centro del estilo y con forma de embudo, se aprecia el tejido transmisor por donde pasa el tubo polínico. En cada lóculo (cavidad) del ovario aparece uno de los primordios seminales u óvulos.

La polinización y la fecundación son los requisitos esenciales para la formación y el cuajado de frutos. La polinización empieza con la llegada al estigma de los granos de polen. Con su germinación, los tubos polínicos penetran por las papilas estigmáticas y empiezan el camino hacia el primordio seminal. Pasan por el estigma y a continuación por el tejido transmisor del centro del estilo. Sólo un tubo polínico (o unos pocos) pasa la base del estilo y penetra en la parte superior del ovario (Cuevas et al., 1995).

En el olivo las interacciones entre el tubo polínico y el estilo representan un importante punto de control de la fecundación. Allí ocurre la selección de un solo tubo polínico, un fenómeno llamado *selección gamética*, por el cual unos gametos son preferidos a los otros para la fecundación. En cambio, la autoincompatibilidad en el olivo se expresa por el retraso de los tubos polínicos del mismo cultivar para atravesar el estigma. Por esta razón pueden no llegar a tiempo para encontrar primordios seminales viables (Cuevas, 1992).

El tubo polínico «ganador» entra en uno de los dos lóculos, camina por encima del funículo y llega al micropilo de un primordio seminal, donde penetra por una de las sinérgidas y descarga su contenido de dos gametos. En el proceso de la doble fecundación, característica básica de todas las angiospermas,

uno de los dos gametos masculinos procedentes del tubo polínico se une con la ovocélula y el otro con los núcleos polares.

De la unión de un gameto masculino con la ovocélula se forma el cigoto, que luego se transforma en el embrión. El cigoto se mantiene al principio sin actividad, hasta 2-3 semanas después de floración, momento en que empieza su crecimiento. El segundo gameto masculino se une con los núcleos polares para formar el endospermo, el tejido que sirve para nutrir al embrión. En el olivo, el endospermo experimenta un gran desarrollo a partir de la fecundación.

Como consecuencia de la fecundación uno de los cuatro óvulos, al que designamos con el nombre *óvulo funcional*, empieza su desarrollo como semilla. Los otros tres óvulos abortan y terminan degenerando (Fig. 2.4). La fecundación y determinación del óvulo funcional y el desarrollo y crecimiento de éste estimulan el crecimiento del ovario para formar el fruto y determinan el cuajado de este fruto. El cuajado y principio del crecimiento de unos ovarios desencadena el proceso de abscisión de los ovarios no fecundados y algunos fecundados pero menos desarrollados.

La aceituna es un fruto pequeño de forma elipsoidal a globosa. Normalmente mide de 1 a 4 cm de longitud y de 0,6 a 2 cm de diámetro. Entre los cultivares de fruto pequeño se encuentran 'Arbequina' y 'Koroneiki'. Entre las de fruto grande 'Gordal Sevillana' y 'Ascolana'. En madurez, la aceituna es negra, negro-violácea o rojiza, pero en muchos casos se cosecha antes, en estado verde.

Botánicamente la aceituna es una drupa, tal como la almendra, el albaricoque, la ciruela, la cereza y el melocotón. Se trata de un fruto con una sola semilla compuesto por tres tejidos principales: endocarpo, mesocarpo y exocarpo (Fig. 2.4). Los tejidos del fruto se desarrollan del ovario por los procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y del cuajado inicial.

El *endocarpo* o hueso empieza a crecer a partir de la fecundación y aumenta en tamaño durante los dos meses siguientes. En su estado maduro, el endocarpo está compuesto enteramente por células esclerificadas. Estas células deben su dureza a la deposición de una gruesa pared secundaria con un alto contenido de lignina. Las esclereidas empiezan a diferenciarse en el endocarpo desde la primera semana después de la floración, pero en esta época inicial son muy pocas y están muy salpicadas entre las células no diferenciadas. Mientras el endocarpo aumenta su tamaño, se aumenta el número y la proporción de esclereidas y también su grado de esclerificación. En el ovario en floración existe un anillo

de haces vasculares marcando la separación entre el endocarpo y el mesocarpo (Fig. 2.4). Con la conversión del ovario en fruto, los haces vasculares aumentan en tamaño y desarrollan muchas conexiones entre sí con el fin de importar agua y sustancias para formar el fruto. Los surcos que aparecen en el hueso del fruto maduro se forman alrededor de estos haces y son característicos en cada cultivar (Barranco et al., 2008).

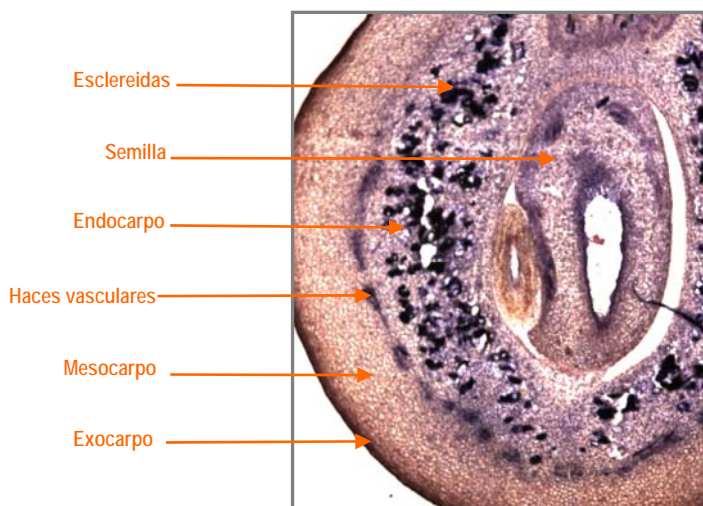


Fig. 2.4. Sección histológica longitudinal mostrando el desarrollo del óvulo funcional (derecha) y uno de los óvulos abortivos (izquierda) 14 días después de floración. De los cuatro óvulos presentes en un ovario, uno, el óvulo funcional, experimenta un gran crecimiento y vascularización tras su fecundación. Los otros tres abortan y degeneran.

El *mesocarpo*, el tejido carnoso, también empieza a desarrollarse a partir de la fecundación, pero mientras la expansión del endocarpo se detiene a los dos meses, el mesocarpo sigue creciendo hasta la maduración (Fig. 2.4). Las células del mesocarpo son parenquimáticas, poco diferenciadas pero con una gran capacidad de crecimiento. Estas células son isodiamétricas y forman una malla uniforme y bastante compacta. Del exterior al interior del mesocarpo existe un incremento progresivo en el tamaño celular. Durante el desarrollo del mesocarpo las células parenquimáticas experimentan un gran aumento en tamaño y, simultáneamente, la formación de notables espacios intercelulares. También algunas esclereidas aisladas se forman dentro del mesocarpo, pero esto ocurre en número muy reducido y con menor grado de esclerificación en comparación con el endocarpo. El almacenamiento del aceite ocurre en las vacuolas de las células parenquimáticas del mesocarpo (King, 1938). En el primer periodo de crecimiento del mesocarpo, a partir de la fecundación, intervienen los procesos de división y expansión

celular. La división celular dura hasta las 4 a 6 semanas después de la floración. La expansión celular es muy notable en este periodo, ya que las células doblan su tamaño se dividen y vuelven a doblarlo antes de la nueva división. Estudios comparativos de cultivares con frutos de tamaños diversos, indican que las diferencias entre cultivares están determinadas por el número de células formadas en el mesocarpo (Rallo Morillo, 1994; Barranco et al., 2008). A partir de las 4 a 6 semanas el crecimiento del mesocarpo se debe totalmente a la expansión celular. Este proceso puede ser continuo o discontinuo, dependiendo de las condiciones ambientales y, en particular, el estado hídrico. En esta segunda fase, la expansión celular está acompañada por la acumulación de aceite.

El *exocarpo* o epicarpo es la capa exterior y más fina del fruto (Fig. 2.4). Este tejido está compuesto por la epidermis con su cutícula. La cutícula es fina en la época de floración y polinización, cuando el ovario se encuentra todavía protegido por los pétalos, pero rápidamente se desarrolla para formar una gruesa capa protectora. Algunas estomas se producen en la epidermis para luego convertirse en lenticelas, regiones que posiblemente actúan en el intercambio de gases. Se observan las lenticelas como puntitos en la superficie del fruto; su número y tamaño es un carácter varietal.

Coincidente con la formación del fruto, e íntimamente interrelacionados entre sí, el óvulo funcional se desarrolla para formar la semilla. El embrión ocupa casi todo el volumen de la semilla. La cubierta seminal, derivada del tegumento, que representaba el tejido principal del óvulo, es fina y dura y atravesada por numerosos haces vasculares. Entre las cubiertas seminales y el embrión se encuentra una fina capa de endospermo con alto contenido de almidón (King, 1938; Barranco et al., 2008).

El embrión es recto y espatulado, mostrando una estructura típica de dos cotiledones, radícula y plúmula. Los cotiledones u hojas embrionarias son grandes. La radícula, que es corta, está situada hacia el extremo inferior del eje embrionario y corresponde al sistema radical. Entre los cotiledones hay una plúmula pequeña, el órgano de donde se desarrolla el tallo. De la célula apical del proembrión se forma el embrión propiamente dicho, que es alimentado por el endospermo. Una vez que empiezan las divisiones celulares, el desarrollo del embrión prosigue muy rápidamente, llegando al estado globular a las seis semanas y aparece con los cotiledones desarrollados a las ocho semanas. A los cinco meses el embrión está completamente formado y es capaz de germinar; a partir de este momento, la semilla no experimenta cambios estructurales. Sin embargo, en los últimos meses de maduración del fruto ocurren cambios fisiológicos en la semilla que inducen su latencia. En el transcurso de su crecimiento, la mayor parte del endospermo es consumido y el embrión llena casi el interior de la semilla. La semilla, por su

parte, llena la cavidad interior del endocarpo que procede del lóculo (Barranco et al., 2008).

2.1.1.2. Floración, polinización y fecundación

Durante la floración tiene lugar la polinización, esto es, la transferencia de polen desde la antera de la flor al estigma de la misma u otra flor. En olivo, este transporte lo realiza generalmente el viento que puede llevar el polen a distancias de kilómetros, si bien más del 95% del polen queda depositado a una distancia inferior a menos de 40 metros de la fuente del mismo (Griggs et al., 1975; Lavee y Datt, 1978).

Para que se lleve a cabo la fecundación de la flor el tubo polínico ha de recorrer el camino que le lleva desde el estigma, lugar donde se deposita el polen, hasta el interior del saco embrionario, donde la descarga de los gametos masculinos y su fusión con la ovocélula y los núcleos polares da lugar a la futura semilla y con ello a la conversión de la flor en fruto. Sin embargo, no todos los granos de polen son igualmente aceptados para efectuar la fecundación y originar un fruto. En este sentido, el olivo es una especie preferentemente alógama (fecundación cruzada). Ello se produce mediante un mecanismo conocido como autoincompatibilidad polen-pistilo. Debido a este fenómeno el pistilo de una flor reconoce y rechaza bioquímicamente el polen que presenta su mismo genotipo, es decir, al polen de la misma variedad. Al tiempo, selecciona y permite el crecimiento del tubo polínico procedente de aquellos granos de polen que corresponden a otras variedades. Sin embargo, en olivo el rechazo del polen propio no es total ni tan intenso como en otros frutales (cerezo, almendro, manzano). En cualquier caso, el polen propio suele crecer más tardíamente y alcanza el óvulo con un retraso variable con respecto al polen de otra variedad. En condiciones de altas temperaturas y/o pobres condiciones de cultivo que acortan la vida del óvulo, este retraso puede ser crítico y conducir a una disminución del cuajado. Dado el carácter generalmente monovarietal de las plantaciones en España, este hecho puede tener repercusión en la producción y por ello se considera de modo creciente la instalación de polinizadores en los nuevos olivares.

El desarrollo de pruebas de paternidad con microsatélites en olivo (De la Rosa et al., 2004) ha proporcionado una valiosa herramienta para los estudios de incompatibilidad. También han evidenciado el papel del transporte de polen a largas distancias en la fecundación cruzada. Así, Díaz et al. (2006) no han encontrado frutos procedentes de autofecundación en plantaciones monovariales de “Arbequina” y “Picual”. En ambos casos el polen fecundante pertenecía a variedades cultivadas en fincas o zonas próximas o a genotipos desconocidos (posiblemente variedades locales o acebuches). Esta polinización

cruzada oculta por polen aerovagante de variedades diferentes de zonas próximas o presentes por error de plantación en los propios olivares ha sido posiblemente la causa del papel asignado a la autofecundación en plantaciones monovarietales, que suelen ser la norma en España. Un ensayo de polinización en cámara de cultivo con 'Arbequina' en condiciones estrictas de aislamiento ha mostrado también claramente la incompatibilidad de esta variedad (García, 2006). Dado el carácter masivo del cultivo del olivo en España y su continuidad geográfica, la polinización oculta por polen de diferente variedad a la dominante en cualquier zona parece ser mucho más frecuente de lo que se suponía.

La necesidad de polinización cruzada en zonas de nueva o menor intensidad de cultivo ha sido reseñada en California, Méjico, Israel y Australia. La distancia respecto a variedades polinizadoras en olivares aislados o distantes de otros parece ser la causa de los problemas de cuajado en estos casos. También la asincronía en la fecha de floración entre variedades debida a insuficiente frío invernal puede ocasionar un pobre cuajado por déficit de polinización cruzada. Éste es fácil de diagnosticar por la presencia de zofairones u ovarios sin desarrollar (frutos partenocárpicos) en fechas muy posteriores a la floración, a veces hasta dos meses después. En suma, la plantación de polinizadores en nuevos olivares parece necesaria en zonas nuevas o distanciadas de otros olivares. Sin embargo, en zonas tradicionales, donde ha sido frecuente la presencia próxima de árboles de otras variedades, el establecimiento de polinizadores no ha sido imprescindible, aunque los problemas de cuajado señalados en períodos calurosos durante la floración indican insuficiente fecundación (Barranco et al., 2008).

2.1.1.3. Cuajado y abscisión de frutos

El proceso que marca la transición del ovario de la flor al fruto en desarrollo se denomina cuajado. Este paso supone la iniciación de un crecimiento rápido de los tejidos del ovario; si dicho crecimiento no se produce, o una vez iniciado cesa, el ovario se desprende. Para que el cuajado ocurra son necesarios tres requisitos previos: la existencia de yemas florales maduras, bien formadas y nutridas, un adecuado régimen de temperaturas durante la antesis, polinización y fertilización y un aporte suficiente de fotoasimilados cuando el ovario inicie su desarrollo. Tras la fecundación del ovario se inicia el desarrollo del fruto, que tiene lugar en fases sucesivas, con características bien definidas, pero variables en su periodo final, en el que el fruto cesa prácticamente su crecimiento y madura. Durante las 2-10 semanas siguientes a la antesis, según las especies y variedades, el crecimiento de esta parte es consecuencia de la división celular, hasta alcanzar un máximo, momento en el que la mitosis cesa paulatinamente al mismo tiempo que la elongación y el engrosamiento celular van adquiriendo importancia. En este nuevo

periodo el fruto alcanza, por término medio, hasta el 80% de su tamaño final y culmina con una ralentización progresiva, cesa el crecimiento y el fruto cambia de color y madura. Superada esta fase, el fruto pierde turgencia, aumenta su sensibilidad a las condiciones del medio, pierde el control metabólico e inicia su senescencia. Si los frutos maduros no se recolectan, se forma la capa de abscisión y caen al suelo, promoviéndose la distribución del material genético en diferentes nichos ecológicos.

En el olivo, normalmente sólo uno de los cuatro primordios seminales del ovario es fecundado e inicia su crecimiento. En el tránsito del primordio seminal a semilla, el endospermo es la parte que primero crece. El cigoto permanece, por su parte, en una especie de latencia. Su transformación en el embrión sólo tiene lugar algunas semanas más tarde, cuando ya la futura semilla ha alcanzado un cierto tamaño. Parece que el endospermo actúa como motor del crecimiento inicial de la semilla. Se ha observado una gran vascularización y crecimiento en el primordio seminal fecundado en correspondencia con el desarrollo del endospermo, lo que no sucede en los otros tres primordios seminales del fruto que, como norma, acaban por abortar a los pocos días. Cuando se impide la fecundación mediante eliminación de las anteras y ensacado de las flores, los cuatro primordios seminales apenas crecen, permanecen vivos durante bastantes más días que en caso de fecundación y muestran un tamaño análogo (Rapoport y Rallo, 1991).

El aumento de tamaño del ovario es precedido por el crecimiento del primordio seminal fecundado. La polinización cruzada anticipa el crecimiento del primordio seminal respecto a la autopolinización, habiéndose encontrado una estrecha correlación entre las pautas temporales de crecimiento del óvulo y del ovario por esta causa. La demanda de asimilados determinada por el comienzo del crecimiento de los frutos origina una acusada competencia entre los mismos y con los ovarios de las flores sin fecundar, lo que se traduce en una masiva abscisión de ovarios y jóvenes frutos. Esta se inicia primero entre flores y/o frutos dentro de las inflorescencias y, posteriormente, entre inflorescencias próximas. El período de abscisión comienza, pues, tan pronto crecen los primeros frutos y se prolonga hasta unas 6-8 semanas después de la floración. En total llegan a caer hasta un 96-99% de las flores de un olivo en años de elevada floración y buena cosecha. Una vez establecida la población de frutos en este período, éstos prosiguen su crecimiento hasta maduración sin que se produzcan nuevas caídas, salvo por causas accidentales o patológicas (Barranco et al., 2008).

Hay una vía alternativa a esta pauta general de desarrollo del fruto. Se trata de los frutos partenocárpicos, conocidos como *zofairones* (la palabra *zofairon* procede del árabe, idioma en el que significa intruso). En éstos el concurso de la fecundación no es necesario para su desarrollo y su velocidad de crecimiento es

menor. Por tanto, su demanda de asimilados es más atemperada. Ello hace que los frutos vecinos apenas compitan entre sí por lo que la abscisión es mínima y las pequeñas aceitunas aparecen con frecuencia arracimadas (Barranco et al., 2008).

2.1.1.4. Crecimiento y desarrollo del fruto

Desde la fecundación hasta su madurez el fruto atraviesa una serie de etapas según una pauta precisa y predeterminada. Aunque desconocemos los mecanismos, resulta evidente la interacción semilla-ovario durante el desarrollo del fruto.

Evolutivamente hablando, los frutos parece que han servido para proteger y dispersar a las semillas, y por consiguiente, han estado y están sometidos a una fuerte presión selectiva. Hace aproximadamente 70 millones de años, al final del Cretácico o al inicio del período Terciario, tuvo lugar una importante diversificación de las formas de los frutos derivada del aumento de animales dispersantes de las semillas y puede que también derivada del cambio climático y de vegetación. La profesora S. Knapp (Museo de Historia Natural de Londres) sostiene que las formas tan variadas de los frutos han evolucionado repetidamente (Knapp, 2002). Así, demuestra que la Solanácea ancestral tuvo un fruto en cápsula, quien mediante el proceso evolutivo ha desembocado en un fruto en drupa (con una o varias semillas), bayas, etc. Asimismo, la estrategia para desprenderse la semilla del resto del fruto también ha sufrido una fuerte evolución ya que mientras algunas semillas son expelidas del fruto mediante un proceso de dehiscencia, otras tienen que esperar a que las diferentes partes del mismo desaparezcan para poder dispersarse. En este estudio evolutivo tan detallado se llega a la conclusión de que el color ancestral del fruto fue el rojo, mientras que el verde y el amarillo fueron posteriores.

Desde el punto de vista cuantitativo el *crecimiento de la aceituna*, como el de cualquier otra drupa, se ajusta a una doble sigmoidea (Conde et al., 2008). Durante la primera fase de crecimiento contribuyen al aumento de tamaño tanto la división como la expansión celular. Esta fase concluye aproximadamente con el final de la esclerificación o endurecimiento del endocarpo, que sucede entre unas 7 y 9 semanas después de la floración. Tras un período durante el cual el crecimiento se ralentiza o se detiene, el fruto experimenta un nuevo incremento de tamaño, en cuya fase final ocurre el enverado o cambio de color de la epidermis que determina el comienzo de la maduración (Barranco et al., 2008; Conde et al., 2008).

El *endurecimiento del endocarpo* ha representado un estado de desarrollo al que se ha prestado cierta

atención en relación con la práctica de la fertilización nitrogenada. En realidad, su causa, es decir la esclerificación del endocarpo, es un proceso que se inicia a los pocos días de la antesis. En un primer período la lignificación de las células acontece de un modo disperso para, posteriormente, adquirir un carácter masivo, lo que conduce a una resistencia del fruto a ser atravesado que impide su corte con una navaja bien afilada. La última fase del endurecimiento del endocarpo coincide con el máximo crecimiento del embrión, una vez que la semilla ha alcanzado su tamaño definitivo. Este período es crítico para dos cosechas sucesivas. Por un lado, concluye la abscisión de las aceitunas de la cosecha actual. De otra parte, el desarrollo del embrión y la esclerificación del endocarpo parecen contemporáneos con el comienzo de la inducción floral, de manera que la presencia de frutos con semillas más allá de este período tiene un claro efecto inhibitor sobre la floración al año siguiente (floración de retorno). Como se ha visto, este efecto representa la causa fundamental de la vecería del olivo.

El *tamaño del fruto* es un factor crítico para la calidad de la aceituna de mesa. En la evolución normal del crecimiento del fruto, la carga del árbol, es decir el número de aceitunas, es posiblemente el principal factor determinante del tamaño del fruto en unas condiciones determinadas de medio y cultivo. En todos los frutales, y el olivo como en tantas otras cosas no es una excepción, existe una relación negativa entre el número de frutos por árbol y el peso del fruto. Como se ha visto, la población de frutos queda determinada en las 6-8 semanas que siguen a la floración. Sin embargo, sólo la reducción del número de flores y frutos jóvenes hasta 25-30 días después de floración se traduce en un aumento del tamaño final de la aceituna. Aclareos previos conducen a una menor competencia entre frutos y, en consecuencia, a una menor caída natural, lo que compensa el aclareo. Aclareos posteriores, aunque el fruto se encuentra en su primera fase de crecimiento, apenas repercuten en un aumento de tamaño (Barranco et al., 2008).

La *síntesis de ácidos grasos* en las células del mesocarpo determina el rendimiento graso de la aceituna. La reacción que promueve la formación de triglicéridos es un paso previo en dicha síntesis, por lo que se puede emplear para cuantificar la acumulación temporal de lípidos. En el caso de la aceituna se ha observado que la acumulación se inicia durante la fase de detención del crecimiento de la drupa y concluye al comienzo de la maduración. Estos datos parecen confirmar estudios previos sobre el rendimiento graso de la aceituna que indican que la cantidad de aceite por aceituna alcanza su techo en torno al comienzo de la maduración. Las fluctuaciones a partir de esta época se deben fundamentalmente a variaciones en el contenido de humedad de la pulpa (Barranco et al., 2008).

2.1.1.5. Composición del fruto

En frutos totalmente desarrollados la pulpa (mesocarpo) representa un 70-90%, el hueso un 9-27% y la semilla un 2-3% del peso total del fruto. En cualquier caso, estos porcentajes varían de forma notable en función de la variedad, estado de madurez del fruto, nivel de carga del árbol, etc. Los componentes mayoritarios tanto de la pulpa como de la semilla son el agua y el aceite (Fernández et al., 1985). Se ha determinado que en la pulpa el porcentaje de agua alcanza un valor medio de 50-60% mientras que el aceite representa el 20-30%, existiendo una relación inversa entre sí. En la semilla el agua, por término medio, constituye el 30% y el aceite un 27% del total.

Otros componentes cuantitativamente importantes en la composición de la pulpa son los azúcares reductores que pueden alcanzar unos valores del 3-4%, destacando por su importancia: glucosa, fructosa y sacarosa. La fracción de polisacáridos presentes en la pulpa está constituida fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, llegando a alcanzar un porcentaje del orden del 4%. Relacionadas con la consistencia de la pulpa, las sustancias pécticas representan el 0,3-0,6% de la misma. El contenido en proteínas de la pulpa es del 1-3%, siendo la arginina el aminoácido más importante. Otros compuestos que alcanzan porcentajes importantes en la pulpa son los compuestos fenólicos, que pueden llegar a alcanzar valores comprendidos entre 1 y 3% de su peso fresco (Barranco et al., 2008).

La semilla presenta un contenido en carbohidratos del 27% y un elevado contenido en proteínas (10%). La fracción fenólica presente en la semilla también es elevada, si bien no existen estudios comparativos en función de la variedad. Por último, el endocarpo o hueso está constituido fundamentalmente por celulosa (30%) y otros polisacáridos, lignina, hemicelulosa, en un 41 % (Barranco et al., 2008).

2.1.2. ETILENO

El etileno, la olefina más sencilla que se conoce, está presente en la Naturaleza en cantidades traza y en plantas superiores actúa como señal hormonal a muy bajas concentraciones ($<1 \mu\text{L/L}$) para regular procesos importantes del crecimiento y desarrollo (Fluhr y Mattoo, 1996; Bleecker y Kende, 2000; Bradford, 2008; Lin et al., 2009). Puede ser producido tanto por animales como microorganismos (Abeles et al., 1992) pero no existen evidencias en estos seres de que este gas actúe como factor hormonal.

Las plantas primitivas producen etileno mediante una ruta todavía desconocida pero diferente de la de plantas superiores (Osborne et al., 1996). No obstante, alguna de las plantas primitivas estudiadas posee respuestas fisiológicas en las que el etileno está implicado. Investigaciones llevadas a cabo en plantas con la ruta de síntesis de etileno inhibida demuestran que, si bien pueden sobrevivir, tienen un impedimento severo en la respuesta a enfermedades, penetración del sistema radical en el suelo y maduración del fruto, entre otras alteraciones.

2.1.2.1. La biosíntesis de etileno en plantas

En experimentos iniciales se demostró que los carbonos 3 y 4 de la metionina, precursor de la síntesis de esta fitohormona en plantas superiores, eran los que se convertían en etileno; mientras que los carbonos 1 y 2 se incorporaban a CO₂ y ácido fórmico, respectivamente (Lieberman, 1979; Bleecker y Kende, 2000; Bradford, 2008; Lin et al., 2009). Paralelamente, se hicieron experimentos con ³⁵S-metionina comprobándose que la radioactividad se acumulaba en los compuestos 5-metil-tio-adenosina (MTA) y 5-metil-tio-ribosa (MTR); lo que demostraba que la S-adenosilmetionina (SAM) era un intermediario en la ruta de biosíntesis de etileno, gastándose ATP en el proceso (Fig. 2.5).

La transformación de SAM en etileno se descubrió mediante la incubación de tejidos de manzana en presencia de L-[U¹⁴]-metionina y condiciones anaeróbicas, las cuales impiden la formación de etileno (Yang y Hoffman, 1984). En este experimento se detectó la formación de un compuesto intermediario identificado como el aminoácido no proteico 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC). Una vez restauradas las condiciones aeróbicas del medio, el tejido de manzana produjo etileno radioactivo a partir del precursor ACC. Paralelamente a lo descrito, se demostró que el grupo CH₃S del MTA se reciclaba a metionina y que la ribosa del MTA se transformaba en la porción 2-aminobutirato de este aminoácido azufrado. Al proceso de reciclado de la MTA a metionina se le denominó '*Ciclo de Yang*' (Bleecker y Kende, 2000; Bradford, 2008; Fig. 2.5).

El ACC es un aminoácido neutro cuya entrada a la célula es exclusivamente dependiente de la concentración externa apoplástica. Cuando la concentración de ACC es baja, su entrada a la célula se inhibe competitivamente por otros aminoácidos neutros, incluyendo su análogo estructural α -amino-isobutírico (AIB) (Saftner y Baker, 1987). La vacuola es el compartimento celular implicado en la acumulación del ACC (aprox. 75%); sin embargo, la concentración molar en el apoplasto y en la vacuola son muy similares (Tophop et al., 1989). El ACC puede salir de la vacuola de forma pasiva siempre y

cuando exista obviamente un gradiente de concentración. Todos estos datos indican que el transporte intracelular de ACC no limita la producción de etileno.

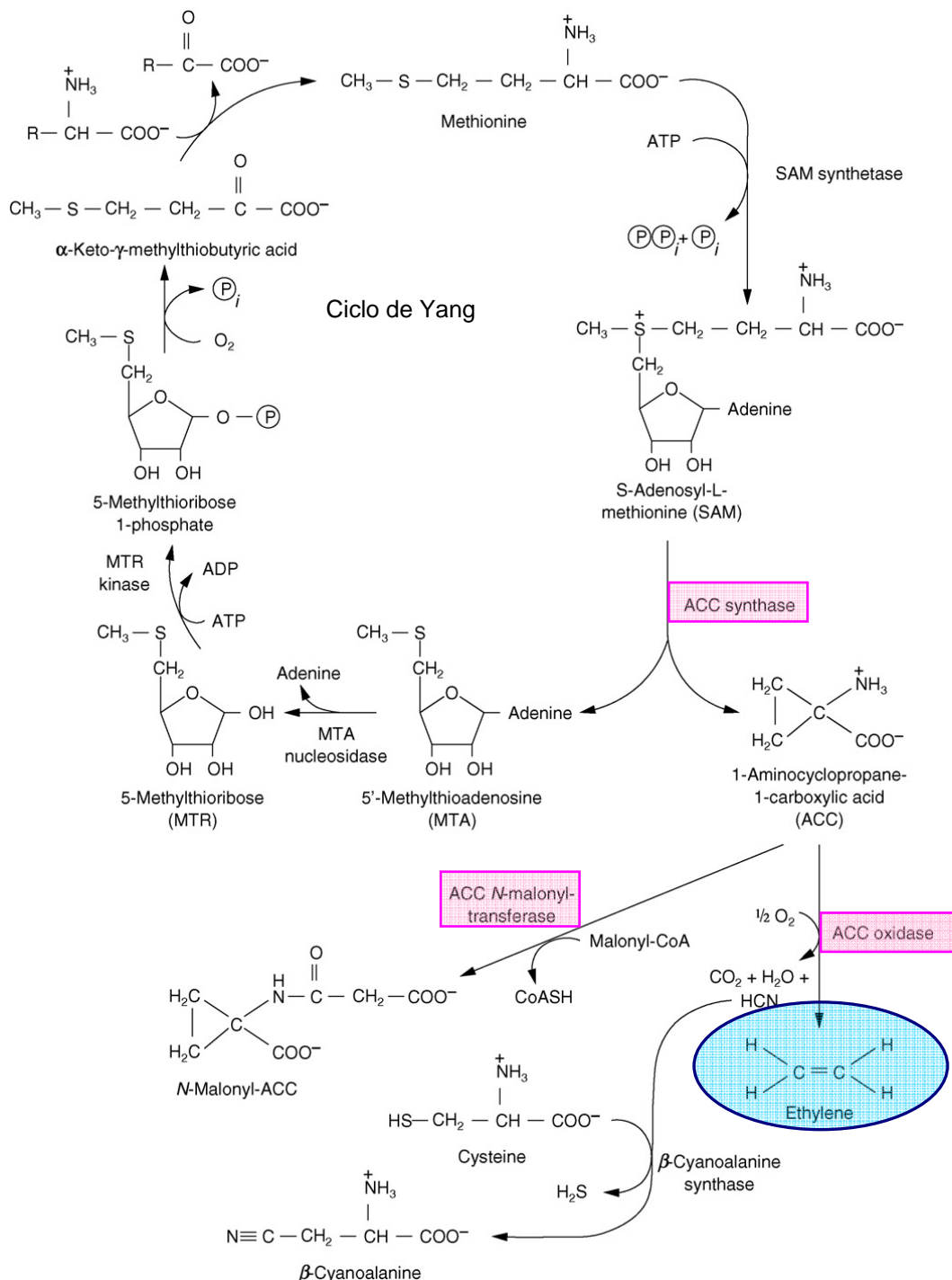


Fig. 2.5. Biosíntesis de etileno en plantas superiores. Fuente: Bradford (2008).

Alternativamente a la oxidación del ACC a etileno, las plantas superiores pueden conjugar este precursor (Fig. 2.5). El conjugado más abundante es el N-malonil-ACC (MACC) (Yang y Hoffman, 1984; Bleecker y Kende, 2000; Bradford, 2008). En algunos tejidos (ej. fruto de manzana preclimatérico), más del 40% del ACC está en forma de MACC (Lelievre et al., 1997; Pech et al., 2008). La síntesis de MACC es citosólica. En condiciones normales este conjugado no se transforma en ACC, pero si la concentración del MACC es muy elevada, un porcentaje del mismo puede ser convertido en ACC mediante una MACC-hidrolasa (Fluhr y Mattoo, 1996). Contrariamente al ACC, el MACC abunda en la vacuola, a la cual ingresa mediante un proceso activo en el que está implicado un transportador tonoplástico y gasto de ATP (Tophop et al., 1989). El MACC puede permanecer en la vacuola o alternativamente ser exportado fuera de ella dependiendo del grado de protonación; aspecto éste que depende del pH vacuolar (Pedreño et al., 1991).

Por último, en el proceso de oxidación del ACC a etileno se produce cianuro, el cual, debido a su gran toxicidad, se transforma inmediatamente en L-cisteína mediante la intervención de la β -cianoalanina-sintetasa (Fig. 2.5). La L-cisteína forma β -cianoalanina que es posteriormente metabolizada a asparragina o a γ -glutamil- β -cianoalanina (Fluhr y Mattoo, 1996; Bleecker y Kende, 2000; Bradford, 2008).

2.1.2.2. Enzimas implicadas en la transformación de SAM a etileno

a) ACC sintasa (ACS)

Es una enzima citosólica dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) que convierte SAM en ACC y MTA mediante una α,γ -eliminación (Fig. 2.5). Asimismo, y por una α,γ -eliminación puede formarse vinilglicina la cual se une irreversiblemente al centro activo de la ACS provocando una inhibición suicida de la enzima. Por esta razón, los análogos de la vinilglicina (ej. aminoetoxi-vinilglicina y rizobitoxina) y de la hidroxilamina (ej. amino oxiacético, AOA), son utilizados en el laboratorio como inhibidores de la actividad enzimática (Yang y Hoffman, 1984). La ACS se purificó a homogeneidad a partir de, entre otros, los frutos de tomate y manzana (Van der Straeten et al., 1990; White et al., 1994; Zhou et al., 1998). Conocida su secuencia de aminoácidos, pudo aislarse el gen que la codifica (Kende, 1993). El peso molecular de la ACS oscila, dependiendo de la especie, entre 45-58 kDa (Bleeker et al., 1986; Van der Straeten et al., 1990; Sato et al., 1991). Su pH óptimo es de 8.5 y la K_m para el SAM oscila entre 13 y 60 μM (Imaseki, 1999). Es activa en forma monomérica (Li y Mattoo, 1994). Sin embargo, en los tejidos vegetales (Sato et

al., 1991) y cuando se expresa como proteína de fusión en *E.coli*, aparece como homodímero (Capitani et al., 1999) de enorme labilidad y vida media muy corta (ej. 58 min en el fruto de tomate; Kim y Yang, 1992). Mediante análisis de complementación de mutantes ACS se demostró que esta enzima puede estar en forma heterodimérica y que el centro activo, determinado por Yip et al. (1990), está situado en la interfase de ambas subunidades (Tarum et al., 1998). El dominio C-terminal de la ACS juega un papel muy importante en la dimerización de la proteína y aunque no participa en la actividad catalítica, sí afecta a la vida media y estabilidad (Chae et al., 2003). En cuanto al procesamiento de la región C-terminal de la ACS, cabe decir que no se lleva a cabo *in vivo* y los resultados que pudieran apuntar hacia ello son el resultado de la rotura proteolítica que tiene lugar durante el proceso de extracción (Tatsuki et al., 2001). Actualmente, todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de formación del ACC por la ACS. No obstante, es probable que esté implicado el desplazamiento nucleofílico del resto de la MTA en la SAM. Estudios de la estructura cristalina de la ACS de tomate parecen demostrar que el mecanismo catalítico es similar al de otras enzimas dependientes de PLP (Stella et al., 1996; Huai et al., 2001; Bradford 2008).

La estructura primaria de la ACS, deducida de la secuencia nucleotídica de los clones, muestra que el peso molecular del enzima de diferentes fuentes es bastante similar. Así, en fruto de tomate es de 53 kDa (Rottmann et al., 1991) y en flores de clavel de 58 kDa (Park et al., 1992). El mayor nivel de homología entre diferentes ACS se produce en la parte interna del polipéptido, mientras que en la región terminal carboxilica son más divergentes. Existen 8 regiones de alta homología a juzgar por sus secuencias aminoacídicas. La homología más alta se observa en el entorno del centro activo, implicando 11-12 aminoácidos que se cree están relacionados con la unión al PLP y al ACC, al igual que ocurre con otras aminotransferasas (Imaseki, 1999).

Desde el primer éxito en el clonaje del gen ACS (Sato y Theologis, 1989), han sido identificados los genes que codifican a la ACS en distintas especies (ej. manzana, Dong et al., 1991; tomate, Yip, 1992; melón, Miki et al., 1995; col de bruselas, Pogson et al., 1995; garbanzo, Gómez-Jiménez y Matilla, 2006) y se ha confirmado su carácter enzimático mediante la expresión heteróloga en *E. coli* y levaduras (Imaseki, 1999). La ACS pertenece a una familia multigénica divergente y sus miembros se expresan diferencialmente por factores que provocan la síntesis de etileno (Imaseki, 1999).

La ACS pertenece a una familia de 10 miembros en *Arabidopsis*, 9 en tomate y 5 en melón (Chae et al., 2003). En su conjunto, estos miembros pueden clasificarse en 4 grupos en función de su pl (Fluhr y Mattoo, 1996). En concreto, en *Arabidopsis* existe un buen número de publicaciones en las que se

estudia la expresión génica de todas las ACS conocidas en diversos tejidos y órganos de esta planta crucífera modelo. La At-ACS8 fue la única ACS a la que no se le estudió su expresión. La At-ACS7, que carece de la región C-terminal variable presente en otras ACS, se expresa en plántulas etioladas una vez tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la traducción (Woeste et al., 1999). Curiosamente, la cicloheximida estimula la expresión de At-ACS1, At-ACS2, At-ACS4, At-ACS5, At-ACS6 (Arteca et al., 1999); esta estimulación sugiere: (i) regulación por algún factor proteico de carácter represor; (ii) una retención del mRNA en los ribosomas y un aumento de la estabilidad del mRNA(ACS) (Arteca et al., 1999; Wang et al., 2002). Por otra parte, la expresión de los genes At-ACS4 y At-ACS6 es inducida por auxinas, habiéndose descrito en el promotor de At-ACS4 cuatro secuencias ARE (*auxin responsive element*) (Abel et al., 1995). En *Arabidopsis*, solamente el gen At-ACS6 resultó ser estimulado positivamente por etileno (Arteca et al., 1999). Finalmente, los genes ACS2, ACS4 y ACS6 poseen estimulación por encharcamiento, anaerobiosis y tratamiento con LiCl.

En la mayoría de los casos publicados, la enzima ACS está regulada a nivel transcripcional (Kende, 1993; Pech et al., 2008) aunque también existen datos de regulaciones post-transcripcionales (Spanu et al., 1993) y post-traduccionales (Spanu et al., 1994). La inhibición por AVG de la producción de etileno en los mutantes *eto1*, *eto2* y *eto3* (ethylene-overproducer 1, 2 y 3) de *A. thaliana* sugiere que estas mutaciones afectan a la síntesis de gas (Guzmán y Echer, 1990). En efecto, cuando se secuenció At-ACS5 en el mutante *eto2* se demostró que existía una perturbación en su extremo C-terminal consistente en la pérdida del lugar de fosforilación Arg-Val-Ser. Por otra parte, la mutación *eto3* implica la alteración de un solo aminoácido en el extremo C-terminal de At-ACS9, la cual tiene una identidad de aminoácidos del 91% con respecto a At-ACS5 (Chae et al., 2003). Sin embargo, la mutación recesiva *eto1* no afecta a ninguno de los genes ACS (Cosgrove et al., 2001). Finalmente, aquellos individuos de *Arabidopsis* que son insensibles a citoquininas porque no se estimula la síntesis de etileno por estas fitohormonas tienen una mutación a nivel de At-ACS5. Fueron caracterizados dos de estos mutantes y se observó una alteración en los aminoácidos conservados 201 y 269, lo que probablemente afecte a la actividad catalítica de la ACS (Vogel et al., 1998). En definitiva, el extremo C-terminal de At-ACS5 y At-ACS9 parece que tienen una función en la regulación negativa de la ACS. Es también muy probable que este hecho suceda también en At-ACS4 y At-ACS8, las cuales comparten mucha similitud con At-ACS5 y At-ACS9 en los 18 aminoácidos del extremo C-terminal.

A la regulación post-transcripcional de la ACS señalada en el párrafo anterior hay que añadir el hecho de que el extremo C-terminal de la enzima controla la estabilidad de esta proteína. Si tenemos en cuenta que

en la mutación *eto2* se produce un aumento en la estabilidad de la ACS implicada, podemos concluir que el dominio C-terminal tiene una gran incidencia en la vida media de la enzima. Por otra parte, debido a que las citoquininas aumentan la estabilidad de la ACS y estimulan también la producción de etileno en el mutante *eto2*, que tiene afectada la región C-terminal de la ACS5, se pudo concluir que estas fitohormonas actúan mediante un mecanismo que es parcialmente independiente del dominio C-terminal de la ACS (Kende, 1993; Fluhr y Mattoo, 1996; Chae et al., 2003).

Dentro de los procesos post-transcripcionales de la ACS no debemos de olvidar la fosforilación de la proteína. Se ha sugerido que la regulación post-transcripcional es un aspecto importante en el control de la expresión ACS (Chae et al., 2003). La presencia de un inhibidor de la actividad MAK redujo la producción de etileno en células de tomate; y, la caliculina-A, una proteína fosfatasa, produjo un rápido incremento de la actividad ACS (Spanu et al., 1994). En flores de orquídeas, el ácido okadoico (inhibidor específico de la actividad proteína fosfatasa tipo 1 y 2) indujo la acumulación del transcrito Phal-ACS1 en el estigma y ovario; mientras que la estaurosporina (inhibidor de la actividad proteína kinasa) impidió la acumulación de este mRNA. Estos resultados conducen a la conclusión de que la fosforilación de Phal-ACS1 está implicada en la regulación positiva de la expresión de este gen, provocando un aumento en la producción de etileno y una simultánea aceleración de la senescencia floral (Wang et al., 2001). Sin embargo, la primera evidencia directa de la fosforilación de una ACS se describió al estudiar el gen Le-ACS2 (Tatsuki y Mori, 2001), demostrándose que la fosforilación tenía lugar en la Ser-460 localizada en el extremo C-terminal; si a la proteína le faltaba este lugar de fosforilación (e.j. Le-ACS4), no se fosforilaba. En este trabajo también se demuestra que la fosforilación no afecta a la actividad enzimática; más bien afecta al 'turnover' de la proteína.

En base de la implicación del extremo C-terminal en la estabilidad de la proteína se han distinguido tres tipos de ACS (Argueso et al., 2007): las ACS tipo 1 tienen el extremo C-terminal más largo y contienen tres residuos de Ser que pueden que en *Arabidopsis* pueden ser potencialmente fosforilados por la MPK6 (Liu y Zhang, 2004) y una Ser conservada que es un sitio de fosforilación para CDPK en tomate (Hernandez-Sebastia et al., 2004); las ACS tipo 2 contienen solamente el sustrato Ser para la CDPK y las ACS tipo 3 tiene los extremos C-terminal más cortos sin sitios de fosforilación (Rzewuski y Sauter, 2008). En *Arabidopsis* y tomate, se ha demostrado que la ACS puede ser fosforilada post-transcripcionalmente por una actividad quinasa, inducida por herida, en los residuos de Val y de Ser encontrados en la región conservada del extremo C-terminal (Tatsuki y Mori, 2001; Chae et al., 2003). La proteína ETO1, un regulador negativo de la producción de etileno, interactúa recíprocamente con esta

región C-terminal encontrada únicamente en las proteínas ACS tipo 2, y las degrada a través de la ruta de ubiquitinación en el proteosoma 26S (Chae et al., 2003; Chae y Kieber, 2005; Yoshida et al., 2005). Finalmente, la fosforilación del extremo C-terminal de las proteínas ACS tipo 1 por MAK6 sugiere la implicación de la región C-terminal de la ACS en la regulación post-transcripcional (Liu y Zhang, 2004; Chae y Kieber, 2005).

A nivel biotecnológico, la supresión de la expresión de ACS en frutos de tomate condujo a una fuerte inhibición de la producción de etileno (aprox. 99%) (Oeller et al., 1991). Simultáneamente, se inhibió el desarrollo del color rojo así como el ablandamiento y la producción de aromas. La adición de etileno revirtió esta inhibición. Sin embargo, aunque la producción de etileno fue muy baja ($<0.1 \text{ nL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), fue suficiente como para estimular la expresión de la paligalacturonasa dependiente de etileno (Lelievre et al., 1997; Pech et al., 2008).

b) *ACC oxidasa (ACO)*

Hasta el año 1990, habían fracasado todos los intentos para obtener un sobrenadante con actividad ACC oxidasa (ACO). Sin embargo, a partir de la elección de un cDNA denominado pTOM13 en frutos maduros de tomate se abrieron nuevas perspectivas al conocimiento de la ACO. Este pTOM13 fue escogido como posible candidato de la síntesis de etileno debido a su gran expresión durante la maduración del fruto. Como la expresión en plantas de tomate de una construcción antisentido de pTOM13 condujo a una disminución drástica en la capacidad de producir etileno y una ralentización en la maduración del fruto, se sugirió que pTOM13 debía de ser una ACO (Hamilton et al., 1990). Este hecho se confirmó mediante la expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y oocitos de *Xenopus laevis* (Alexander y Grierson, 2002). Asimismo, experimentos basados en la homología entre los genes pTOM13 y el de la flavanona-3-hidroxilasa (Hamilton et al., 1992) y la demostración de que el Fe^{+2} era un cofactor esencial para la actividad ACO *in vivo*, se consiguió por vez primera una actividad ACO a partir de frutos de melón. Esta actividad fue evaluada en presencia de Fe (II) y ascorbato (Prescott y John, 1996).

La proteína ACO pertenece a la familia de las oxigenasas no hemínicas dependientes de hierro. Es decir, necesitan Fe^{+2} como cofactor y O_2 como co-substrato. Sin embargo, a diferencia de la gran mayoría de los miembros de esta familia, las ACOs no necesitan 2-oxoglutarato como co-substrato sino que lo substituyen por ascorbato, además de ser activadas específica y esencialmente por CO_2 (Prescott y John, 1996). Se ha propuesto que el CO_2 actúa protegiendo el centro activo acomplejándose con el Fe^{+2} (Zhou

et al., 2002). La conversión del ACC en etileno tiene lugar mediante una apertura del anillo ciclopropano: (1) el etileno se origina de los carbonos 2 y 3; (2) el carbono 1 produce CNH. Sin embargo, el mecanismo íntimo de la catálisis no se conoce, aunque está confirmado que: (1) la estequiometría entre ACC consumido/ O₂ utilizado es de 1 (Prescott y John, 1996); (2) el ascorbato se transforma mol a mol en dihidroascorbato (Prescott y John, 1996); (3) 2His y 1Asp sirven como lugares de unión del Fe⁺² (Hegg y Que, 1997); (4) está descartada la formación del intermediario N-hidroxil-ACC como se pensaba (Charrng et al., 2001).

La falta de un péptido señal 'requerido clásicamente para que una proteína atraviese el plasmalema' sugiere que la ACO es citosólica. No obstante, la localización subcelular de esta proteína es un tema de debate. Así, algunos autores la han localizado fundamentalmente en el apoplasto (ej. frutos de tomate y manzana y semillas de garbanzo; Ramasamy et al., 1998; Gómez-Jiménez et al., 2001), mientras que otros demuestran su carácter citosólico (ej. fruto de manzana; Chung et al., 2002). Contrariamente a la ACS, la ACO está a altas concentraciones en la célula productora de etileno; sin embargo, bajo condiciones *in vitro* del laboratorio, la vida media de este enzima es muy corta (Prescott y John, 1996; Barlow et al., 1997).

La ACO está codificada por una pequeña familia multigénica compuesta por 3-4 miembros. En el tomate se conocen Le-ACO1, Le-ACO2, Le-ACO3 y Le-ACO4 (Bidonde et al., 1998; Nakatsuka et al., 1998). En los frutos que están en vías de maduración y en las hojas senescentes se acumulan los transcritos Le-ACO1 y Le-ACO3; es muy probable que Le-ACO3 esté implicado en la producción del etileno climatérico ya que su expresión es transitoria y los genes ACS ya están expresados (Alexander y Grierson, 2002). Por otro lado, en el fruto de melón se aislaron tres ACO que se expresan diferencialmente en diferentes órganos de la planta. El gen Cm-ACO1 se induce en la maduración del fruto y en las hojas, en respuesta a heridas y etileno; mientras que el RNAm Cm-ACO2 se detecta a niveles bajos en hipocótilos etiolados y el Cm-ACO3 se expresa en flores (Lelievre et al., 1997; Pech et al., 2008). Se han obtenido un mayor número de datos sobre la expresión de estos genes mediante la caracterización de sus correspondientes promotores (Lelievre et al., 1997; Pech et al., 2008).

Las construcciones antisentido de ACO Redujeron la producción de etileno durante la maduración de frutos y también efectos muy notables en el proceso de maduración del tomate (Hamilton et al., 1990) y del melón (Ayub et al., 1996). En el caso del melón, los azúcares y los ácidos orgánicos no variaron en relación al tipo silvestre, lo que indica que ambos procesos no son dependientes de etileno (Pech et al.,

2008). En manzana se obtuvieron resultados parecidos a los del tomate y melón. En flores de clavel en flores de clavel (Savin et al., 1995) y col de bruselas (Henzi et al., 1999) se hicieron construcciones antisentido similares a las descritas para tomate y melón. La reducción en la producción de etileno fue del 90% y la sensibilidad al mismo permaneció inalterada como en otras construcciones.

c) *Malonil-ACC-transferasa*

La existencia en plantas de formas conjugadas de hormonas es un hecho conocido. Sin embargo, en el caso del etileno quien se conjuga es su precursor inmediato ACC. De las dos formas conjugadas que se conocen, la más importante cuantitativamente es la que resulta de la unión covalente del ACC con el ácido malónico para formar 1-malonil-aminociclopropano-1-carboxílico (MACC). El MACC fue descubierto por Amrhein y cols. (1981). El enzima que supuestamente cataliza la malonización del ACC con el malonil-CoA es la ACC-maloniltransferasa (ACMT). Este enzima fue purificada en guisante (Guo et al., 1992; Benichou et al., 1995) y en tomate (Martin y Saftner, 1995). En tomate, la ACMT es un monómero de 38 kDa que está regulada por el desarrollo y, a diferencia de la de guisante (Benichou et al., 1995), parece no estar sometida a inhibición por L- o D-aminoácidos (Martin y Safter, 1995). En semillas de garbanzo la ACMT fue también parcialmente purificada y se describieron sus características más importantes: masa de 54 ± 4 kDa, pH óptimo 7,5 K_m (ACC) $400 \mu\text{M}$ y K_m (mal-CoA) $90 \mu\text{M}$ (Martínez-Reina et al., 1996).

La ACMT puede que tenga un importante papel en la regulación de la síntesis de etileno ya que desviaría este precursor de la acción oxidativa de la ACO. Además, la ACMT parece ser capaz de malonizar otros aminoácidos distintos del ACC. Si esto es así, podría tener la función de detoxificación celular ya que impediría que los aminoácidos anormales para la célula y producidos normalmente en ciertas condiciones de estrés, no se integrasen en las cadenas proteicas. Hasta ahora, todos los intentos para purificar y caracterizar molecularmente la ACMT han resultado totalmente infructuosos. La N-malonización del ACC parece clara; sin embargo, no se ha podido demostrar la formación de ACC a partir del MACC. Los escasos resultados que apuntan a ello, se han obtenido bajo condiciones que distaban mucho de ser naturales (Jiao et al., 1986). Hoffman et al. (1983) comprueban en semillas de cacahuete (poseedoras de niveles altos de MACC) que el etileno producido en el proceso germinativo se derivaba casi exclusivamente del ACC sintetizado *de novo*, y menos del 2% provenía del MACC acumulado en la vacuola.

El etileno puede incrementar la actividad ACMT en varios tejidos (Philosoph-Hadas et al., 1985; Gupta y Anderson, 1989). Este efecto puede deberse a la autoinhibición de la producción de etileno. En fruto de tomate verde, el etileno indujo en 60 min un aumento de la actividad ACMT (Liu et al., 1985). Por otra parte, en hipocótilos etiolados de *P. vulgaris* iluminados durante 10 min se produjo una disminución en el contenido de ACC del 37% y un simultáneo aumento del 32% de MACC (Vangronsveld et al., 1988). El ABA provocó un considerable aumento en MACC en espinaca (Philosoph-Hadas et al., 1989).

2.1.2.3. La ruta de señalización del etileno

El descubrimiento de la *triple respuesta* fue crucial para el inicio de los estudios referentes a la señalización del etileno (Bleecker et al., 1988). El análisis epistático de los mutantes relacionados con la respuesta a etileno permitió ordenar los elementos de la cadena de transmisión de la señal (Bleecker y Kende, 2000; Guo y Ecker, 2004; Chen et al., 2005; Kendrick y Chang, 2008; Zhu y Guo, 2008; Lin et al., 2009; Stepanova y Alonso, 2009; Yoo et al., 2009). No obstante, actualmente todavía existen muchas lagunas en la misma. A modo de resumen del conocimiento actual: la ruta de señalización se inicia con una familia de receptores (en *A. thaliana* se conocen ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 y ERS2); a continuación, se encuentra CTR1 (una *Raf-like protein kinase*) que es un regulador negativo y por consiguiente, una mutación en su funcionabilidad provoca una activación constitutiva de la señalización (Bleecker y Kende, 2000; Chang y Stadler, 2001; Guo y Ecker, 2004; Chen et al., 2005). Se ha demostrado que CTR1 se co-localiza en el retículo endoplásmico con ETR1 y otros receptores del etileno (Chen et al., 2002; Chen et al., 2007). CTR1 es homólogo a MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase*) (Kieber et al., 1993; Yoo et al., 2008). El siguiente componente identificado de la ruta fue EIN2 el cual tiene homología con transportadores metálicos tipo Nramp (Alonso et al., 1999; Guo y Ecker, 2004). Probablemente sea una proteína de membrana, y su pérdida de función mediante mutagénesis provoca una insensibilidad completa al etileno. Finalmente se encuentran EIN3 o EIL y ERF1. Ambos son factores de transcripción y EIN3 se une al promotor de ERF1. Por los datos existentes se sabe que ERF1 es un factor de transcripción positivo ya que su sobreexpresión provoca una fuerte respuesta constitutiva a etileno (Guo y Ecker, 2004). En el núcleo, EBF1/2 (EIN3-Binding F-BOX1 y 2) controla coordinadamente la degradación en el proteasoma 26S y de los factores transcripcionales EIN3 y EIL1. La expresión de EBF1/2 es reprimida por EIN5 (Ethylene-Insensitive5), que codifica a la exoribonucleasa XRN4 (Fig. 2.6). Además, EIN3 posee dos sitios de fosforilación por la MAPK que tienen efectos opuestos sobre la estabilidad de EIN3 (Kendrick y Chang, 2008; Yoo et al., 2009).

a) *Los receptores*

Parece evidente que la cascada de señalización debe de iniciarse con una proteína membranosa que reconozca el etileno. Esta proteína debe ser un punto de regulación de la ruta. ETR1 fue la primera proteína descubierta en plantas con características de receptor hormonal y también la primera proteína identificada en eucariotas con una homología a histidín-quinasa (Chang et al., 1993).

En procariotas, ETR1 es homóloga a miembros de una familia de transmisores de señales hormonales conocidos como "*reguladores de dos componentes*". En bacterias, el dominio *sensor* y *regulador* constituyen los dos componentes (Stock et al., 2000). Todos los mutantes de ETR1 confieren una insensibilidad dominante a etileno. Datos bioquímicos y genéticos confirmaron que ETR1 es un receptor que funciona como un dímero y precisa Cu^{+1} para unirse al etileno (Schaller et al., 1995). Forma parte de una familia de 5 miembros: ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 y ERS2 (Bleecker y Kende, 2000). Se han identificado estos 5 genes de receptores de etileno en *Arabidopsis* (Chang et al., 1993; Hua et al., 1995; Hua y Meyerowitz, 1998; Sakai et al., 1998), 5 en arroz (Yau et al., 2004), y, entre las especies frutales, 6 en tomate (Wilkinson et al., 1995; Zhou et al., 1996; Payton et al., 1996; Lashbrook et al., 1998; Klee y Clark, 2004) con una estructura similar a los de *Arabidopsis*, 5 en manzana (Tatsuki et al., 2007; Wiersma et al., 2007), 4 en pera (El-Sharkawy et al., 2003), 3 en melocotón (Rasori et al., 2002; Trainotti et al., 2005), 3 en caqui (Pang et al., 2007) y 3 en melón (Sato-Nara et al., 1999; Owino et al., 2007).

En base a las similitudes estructurales, la familia de receptores puede ser dividida en dos subfamilias (Guo y Ecker, 2004). La *subfamilia 1* incluye *ETR1*, *ERS1* y *NR* (Fig. 2.6), los cuales muestran tres regiones transmembrana en la región N-terminal, donde se produce la unión a etileno y conserva un dominio histidín kinasa en el extremo C-terminal (Schaller y Bleecker, 1995; Hall et al., 2000). La *subfamilia 2*, que incluye *ETR2*, *EIN4* y *ERS2* (Fig. 2.6), contienen un cuarto dominio hidrofóbico en el extremo C terminal y un dominio histidín kinasa degenerado, que carece de uno o más elementos considerados necesarios para la actividad catalítica, por lo que estos receptores pueden funcionar de forma distinta. Los receptores ETR2 no pueden funcionar como histidín quinasa pero sí como serin-treonín quinasa. Los receptores de tomate *LeETR4*, 5 y 6 pertenecen la *subfamilia 2*. *Cm-ERS1* y *Cm-ETR1* estructuralmente pertenecen a la *subfamilia 1* mientras que *Cm-ETR2* pertenece a la *subfamilia 2* de receptores de etileno.

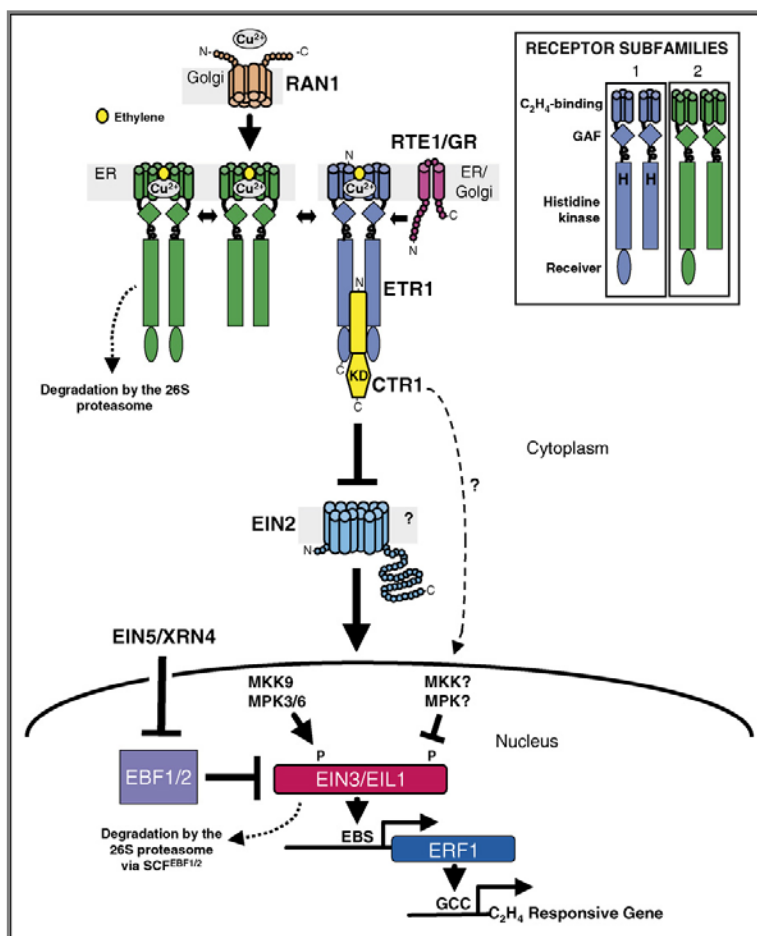


Fig. 2.6. Ruta de la señalización de etileno (Kendrick y Chang, 2008).

A pesar de la homología estructural de los productos de estos genes, existe una diferencia referida al patrón de expresión durante el desarrollo y en respuesta a estímulos externos (Lashbrook et al., 1998; Klee y Clark, 2002). En tomate, *LeETR1* y *LeETR2* se expresa a niveles constantes en todos los tejidos durante el desarrollo, mientras que *NR*, *LeETR4*, *LeETR5* y *LeETR6* se expresan fuertemente en tejidos reproductivos (flores y frutos), con un incremento significativo de *NR*, *LeETR4* y *LeETR5* durante la maduración del fruto. El gen *NR* está presente en todos los tejidos y, en concreto los ovarios muestran altos niveles de ARNm de *NR* durante la antesis, que decaen antes del inicio de la maduración, para volver a aumentar la misma. El incremento de expresión de *NR* coincide con el incremento climatérico de etileno (Lashbrook et al., 1998). El hecho de que *Nr* no se exprese antes del inicio de la maduración, lleva a pensar que un segundo gen de percepción de etileno debe ser transcripcionalmente activo en esta

etapa (fruto verde) para poder explicar su sensibilidad a etileno. Probablemente, *LeETR4* y *LeETR6*, de hecho *LeETR4* es el receptor más abundante receptor en flores y frutos asuman esta función (Tieman y Klee, 1999).

En cuanto al modo de actuación de los receptores de etileno, los resultados del análisis genético de los mutantes de pérdida de función en *Arabidopsis* y tomate han permitido proponer un modelo donde estos receptores actuarían como reguladores negativos de la acción de etileno (Hua y Meyerowitz, 1998; Tieman et al., 2000). En *Arabidopsis*, mutantes simples y dobles de pérdida de la función muestran un fenotipo de insensibilidad poco visible indicando que, a pesar de diferencias estructurales hay una redundancia funcional (o compensación de función) entre los receptores. Sin embargo, plantas con múltiples mutaciones en los receptores muestran una respuesta a etileno constitutiva (Hua y Meyerowitz, 1998). Estos resultados sugieren que los receptores actúan redundantemente para suprimir la respuesta a etileno en ausencia de etileno. Los resultados en tomate apoyan este modelo, con la excepción de que plantas con una pérdida total de la función *Le-ETR4* presentan una respuesta constitutiva a etileno, mostrando un fenotipo de hipersensibilidad a dicha hormona, incluyendo epinastia, abscisión floral y maduración prematura de los frutos, sin que ocurra un incremento en la síntesis de etileno (Tieman et al., 2000). El mecanismo molecular que explica el modo de actuación del receptor sería un modelo en el que la actividad kinasa de éste suprime la expresión de genes inducibles por etileno. La unión del etileno elimina la supresión y se desencadenan las respuestas a esta hormona. El receptor mutado, incapaz de unirse al etileno, no puede ser inactivado, por lo que se mantiene la represión de la respuesta.

b) Elementos de la señalización del etileno

La identificación de mutantes insensibles a etileno y con un fenotipo de respuesta constitutiva a etileno en *Arabidopsis* ha permitido establecer un modelo de reconocimiento y respuesta a etileno. Mediante el análisis genético de la epistasis, se han podido identificar varios componentes de la ruta de transducción de señales, que han sido identificados como CTR1, EIN2, EIN3 y ERF (Fig. 2.6).

El fenotipo del mutante *ctr1* no se ve afectado por inhibidores o antagonistas de etileno. Los datos recogidos mediante el empleo de levaduras dobles híbridas y experimentos de unión *in vitro*, han demostrado que el dominio kinasa de *ETR1* y *ERS1* puede actuar con CTR1 (Clark et al., 1998). Todos estos resultados, junto con el hecho de que no se hayan identificado componentes intermediarios que actúen genéticamente o bioquímicamente entre el receptor y la kinasa CTR1, indican que CTR1 es el

componente más próximo aguas abajo, identificado en la ruta de señalización (Kieber et al., 1993; Huang et al., 2003). La naturaleza recesiva y el fenotipo constitutivo de mutante *ctr1* sugieren que CTR1 es un regulador negativo de los eventos de transducción de la señal (Kieber et al., 1993). El clonaje del gen *CTR1* revela que pertenece a una familia RAF de serin-treonin protein kinasas, lo que sugiere la participación de una cascada de señalización MAP-kinasa en la regulación de la señal de etileno. Mientras que en *Arabidopsis* se ha encontrado una única copia del gen *CTR1*, en tomate se ha caracterizado una pequeña familia (*LeCTR1*, *LeCTR2*, *LeCTR3* y *LeCTR4*). El gen *Le-CTR1* se expresa mucho en los frutos en maduración, teniendo un comportamiento parecido al de los receptores (Klee y Cark, 2004).

Mutantes nulos de *EIN2* muestran una completa insensibilidad a etileno, para todas las respuestas estudiadas a lo largo del desarrollo de la planta, sugiriendo que *EIN2* es un componente principal como regulador positivo en la ruta de señalización (Fig. 2.6). En tomate, la expresión de *Le-EIN2* no se altera durante el desarrollo del fruto y no es inducible por etileno. *EIN2* codifica una proteína transmembrana en la que el dominio N-terminal hidrofóbico muestra similitud con proteínas de la familia de NRAMP, que incluyen a los transportadores de metales; además, la región hidrofílica C-terminal posee motivos involucrados en interacciones proteína-proteína (Alonso et al., 1999). La sobreexpresión de la porción C-terminal de la proteína en mutantes nulos *ein2* produce una activación constitutiva de algunas pero no todas las respuestas a etileno. Estos resultados sugieren que la porción N-terminal de *EIN2* es necesaria para la sensibilidad a etileno por parte de componentes de aguas arriba, mientras que la porción C-terminal se requiere para la transducción de la señal. La reducción de la expresión por tecnología antisentido, retrasa la maduración, como cabría esperar en una pérdida de función. Mutantes *ein2* han sido aislados independientemente en varios escrutinios de mutantes diseñados para identificar componentes de otras rutas de señalización.

Aguas abajo de *EIN2* funciona una pequeña familia de factores de transcripción que incluye a *EIN3* y varias proteínas similares (EIL) (Fig. 2.6). En los mutantes de pérdida de función de *EIL3*, se observa una insensibilidad parcial a etileno. Esta insensibilidad puede ser restaurada por la expresión de *EIN3*, *EIL1* o *EIL2*, indicando que, además de *EIN3*, al menos estos dos *EILs* pueden mediar una respuesta a etileno (Chao et al., 1997). La búsqueda de promotores diana para la familia *EIN/EIL* ha puesto de manifiesto que esta familia reconoce motivos específicos (ERE) presentes en la región promotora de otros factores de transcripción conocidos como factores de respuesta a etileno (ERF, también llamados *EREBP*), estimulando su transcripción (Fig. 2.6). Estos factores de transcripción actúan como activadores de genes

inducidos por etileno y patógenos. La sobreexpresión de *ERF1* en un fondo genético *ein3* conduce a la activación constitutiva de un subconjunto de fenotipos de etileno, lo que parece indicar que ERF1 puede regular una rama de la ruta de respuesta a etileno por debajo de EIN3 (Wang et al., 2002).

EIN3 activa la respuesta del etileno por unión al lugar de unión (EBS, EIN3-binding site) presente en el promotor de ERF1 (Solano et al., 1998). ERF1 codifica un activador de la transcripción que se une a la caja GCC en los promotores de varios genes de respuesta a etileno. Un paso regulador clave en la ruta es la degradación de EIN3 y EIL1 por la ruta dependiente de proteasoma 26S, mediada por un complejo de ligasa SCFEBF1/2 E3 que contienen las proteínas EBF1 y EBF2 (Guo y Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004; Lee et al., 2006; Binder et al., 2007). La estabilidad de EIN3 es promovida por la fosforilación del residuo T174 a través de una cascada de MAP kinasa que va desde la señalización de MKK9 a MPK3/6, mientras que la degradación de EIN3 es promovida por la fosforilación en T592, posiblemente a través de una cascada MAP kinasa que implica a CTR1 (Yoo et al., 2008). La represión de la transcripción EBF1 y EBF2 es mediada por una exoribonucleasa codificada por EIN5/XRN4 (Olmedo et al., 2006; Potuschak et al., 2006; Lin et al., 2009; Yoo et al., 2009).

Los datos expuestos acerca del funcionamiento de los genes de biosíntesis, percepción y respuesta a etileno en distintas especies, unidos a la homología estructural descrita, permite concluir que los determinantes genéticos implicados en la biosíntesis, señales de reconocimiento y respuesta a etileno están altamente conservados y que son susceptibles de ser incorporados a variedades de interés ya sea mediante ingeniería genética o mediante la identificación de nuevas variantes alélicas.

C) *Nuevos reguladores de la señalización del etileno*

Para identificar los factores periféricos que puedan modular la señalización del etileno, un nuevo 'screening' genético de mutantes *eer* (enhanced ethylene response) se ha realizado en *Arabidopsis*. Estos mutantes *eer* realzan típicamente los fenotipos *ctr1* y se les presupone su papel negativo en la señalización del etileno (Larsen y Cancel, 2003; Christians y Larsen, 2007; Robles et al., 2007; Christians et al., 2008). El análisis de epístasis ha demostrado que los EER3 actúan un paso posterior de EIN2, mientras que EER4 y EER5 probablemente actúan un paso anterior. La identificación de cuatro genes de EER sugiere que modulan la respuesta del crecimiento mediado por etileno de diferente manera. Por ejemplo, *eer1* contiene una mutación puntual en ROOTS CURL IN NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID1 (RCN1), una de tres subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). RCN1 se ha

demostrado asociado al dominio kinasa de CTR1 y se requiere para la actividad catalítica de PP2A (Larsen y Cancel, 2003). EER3 codifica una prohibitina, AtPHB3, y su modo de acción no se conoce (Christians y Larsen, 2007). EER4 es un factor de transcripción (*Arabidopsis* TAF12b), homólogo al ser humano TAF12 y levadura TAF61, que interactúa con EIN3, ERF1 y dos subunidades catalíticas de PP2A, y se requiere para la inducción de la expresión ERF1 por etileno y jasmonato (Robles et al. 2007). Parece que EER4 puede actuar no solamente como regulador positivo para tender un puente sobre EIN3 y ERF1 al TFIID complejo para activar la transcripción de respuesta a etileno sino también para controlar los genes que antagonizan las respuestas del crecimiento de etileno. EER5 interactúa directamente con el extremo C-terminal de EIN2 y de CSN8-COP9, y EIN2 interactúa con CSN3, CSN6A y CSN6B (Christians et al., 2008). Investigaciones futuras determinarán si EER1, EER3, EER4, EER5, EIN2 y CSN son todos parte de grandes complejos de señalización que actúan entre el retículo endoplasmático y el núcleo para controlar los factores de transcripción, y modular la señalización de etileno y sus conexiones a otras rutas reguladoras (Yoo et al., 2009).

2.1.3. EL ETILENO EN LA FLORACIÓN

Como el etileno está implicado en una gran variedad de procesos del desarrollo de plantas superiores, no debe de sorprendernos que también afecte al desarrollo floral (Otead, 1992). Los pétalos florales tienen como misión prioritaria la atracción de los organismos polinizadores. Después de la polinización no se precisa el carácter "atractivo" de la flor y ésta se modifica mediante diferentes mecanismos dependiendo de la especie. Sea como fuere, el etileno está implicado en muchos de ellos (van Doorn, 2002a). Las flores que sintetizan etileno son frecuentemente sensibles al mismo. Del mismo modo que sucede en frutos, existen flores que sintetizan niveles basales de etileno (*Sistema 1*) y luego cambian a una síntesis autocatalítica (*Sistema 2*). Para que tenga lugar este cambio es necesario la inducción de genes relacionados con la síntesis de etileno (Woodson, 1994) y que el tejido afectado se vuelva muy sensible al mismo. Aunque con excepciones, la gran mayoría de flores en las que la polinización acelera su abscisión y la caída de los pétalos, son muy sensibles a etileno (Taylor y Whitelaw, 2001).

La polinización floral es la señal con la que se inicia la senescencia. Aunque es normal que la caída de los sépalos tenga lugar haya o no polinización, ésta acelera frecuentemente el proceso. Existe, por otra parte, flores en las que la polinización modifica el color y la forma de los pétalos; estas alteraciones pueden llevarse a cabo añadiendo etileno (van Doorn, 2002b). En plantas de *Pelargonium* la abscisión de los pétalos no tiene lugar si el etileno se añade a flores recién abiertas; sin embargo, los pétalos después

de 2-3 días de post-antesis caen con la presencia de etileno 200 veces menos concentrado (Evensen, 1991; Clark et al., 1997). En otras especies, como petunia, clavel y orquídea se sensibilizan más al etileno conforme avanza el envejecimiento de la flor. Asimismo, también progresa la capacidad de síntesis de gas. La primera síntesis medible de etileno se detecta a los pocos minutos de la polinización y parece estar relacionada con el crecimiento del tubo polínico a través del estigma (Holden et al., 2003). Posteriormente, se produce otra estimulación de la síntesis coincidiendo con la fertilización del ovario: esta síntesis, que es autocatalítica, es llevada a cabo por el ovario y/o los pétalos y es la responsable del desencadenamiento de la senescencia de los pétalos.

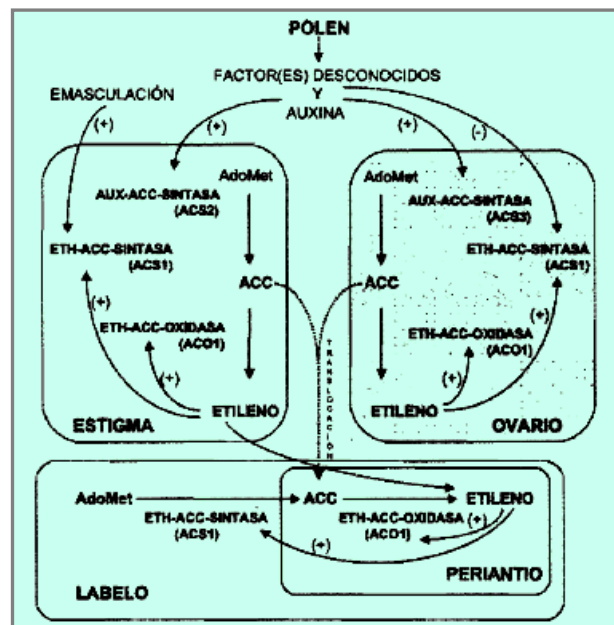


Fig. 2.7. Modelo de regulación de la expresión de la ACS y ACO en órganos florales.

Sin embargo, apenas se conoce quien desencadena la síntesis de etileno durante el proceso de polinización. Se sabe que existe una producción de gas en el estilo conforme el grano de polen camina hacia el ovario. Parece descartado que el propio polen oxide su ACC endógeno (Woltering et al., 1995). Alternativamente, se pensó que las auxinas sintetizadas en el grano de polen indujesen la síntesis de etileno; y también que el proceso estresante producido por el crecimiento del tubo polínico a través del estilo en su acceso al ovario podía desencadenar la síntesis de dicha hormona (Sing et al., 1992; Zhang y O'Neill, 1993). Sea como fuere, la realidad es que durante la polinización se produce etileno, el cual coordina el desarrollo de los órganos florales.

En especies sensibles al etileno como el clavel, se ha asociado la regulación de la senescencia con la expresión de los genes que codifican a las enzimas ACS y ACO (Kende, 1993). Ambas enzimas están reguladas transcripcionalmente con la senescencia de los pétalos (Woodson y otros, 1992; Jones, 2003) y su expresión puede ser, en ciertas especies, rápidamente inducida también por la polinización, por ejemplo, en tabaco (Sánchez y Mariani, 2002; Weterings y otros, 2002), orquídeas (O'Neill y otros, 1993; Bui y O'Neill, 1998), petunia (Clark y otros, 1997), clavel (Jones, 2003), mirabel (Fernandez-Otero et al., 2007) y rosa (Xue et al., 2008). Por lo tanto, se ha sugerido la regulación a nivel transcripcional de la producción de etileno en dichas especies. Esta inducción es también acompañada de un incremento de la expresión de los genes del receptor de etileno (Shibuya et al., 2002; Kuroda et al., 2003, 2004; Xue et al., 2008) y de los genes que codifican a la kinasa CTR (Muller et al., 2002; Kuroda et al., 2004) en algunas especies ornamentales.

En el caso de muchas flores donde se observa un incremento de la síntesis de etileno inducido por el proceso de polinización; primero se detecta en el estigma y estilo y luego la señal se transmite a la corola o a los pétalos. En petunia se conocen tres ACOs implicadas en la polinización, mientras que en tomate el transcrito Le-ACO2 se acumula específicamente en la antera, el Le-ACO3 en el estigma y estilo después de la polinización y el Le-ACO1 al final de la senescencia floral (Fluhr y Mattoo, 1996).

En muchas especies, el etileno parece hacer poco o nada controlando la caída de los pétalos, por ejemplo, en iris (Celikel y van Doorn, 1995). Sin embargo, en especies donde el perianto cae el etileno se ha demostrado que está implicado en el control de proceso de la abscisión. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, el etileno fue esencial para la abscisión normal del órgano floral (Butenko et al., 2003; Patterson y Bleeker, 2004; Lin et al., 2009).

Recientemente, muchos estudios se han llevado a cabo sobre el mecanismo de la apertura floral (van Doorn y van Meeteren, 2003; Yamada et al., 2009; Harada et al., 2010), y sobre la senescencia para desarrollar tecnologías con el fin de retardarla (Hunter et al., 2004; Hoeberichts et al., 2007; van Doorn y Woltering, 2008).

2.1.4. EL ETILENO EN EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DE FRUTOS

La maduración representa la fase final del crecimiento y desarrollo del fruto, en la que tienen lugar una

serie de procesos fisiológicos y bioquímicos, generalmente coordinados, que dan lugar a cambios en la textura y los aromas, que inducen a su consumo. La maduración es crucial para la calidad del fruto ya que la mayoría de los compuestos que promueven la salud y la calidad sensorial se acumulan durante esta última etapa del desarrollo. A pesar de la gran diversidad de procesos que ocurren, algunos aspectos de la maduración de frutos carnosos son comunes entre las distintas especies. Por ejemplo, el inicio de la maduración está asociado con cambios de color, alteración del metabolismo de azúcares, ablandamiento del fruto y síntesis de aromas. Estos eventos comunes sugieren que las rutas bioquímicas centrales, involucradas en el proceso de maduración, están bien conservadas entre frutos de diferentes especies (Giovannoni, 2004).

Desde el punto de vista de la fisiología, las especies frutales han sido clásicamente definidas como climatéricas en base a la presencia de un incremento en la síntesis de etileno (como consecuencia de la inducción de la biosíntesis autocatalítica de etileno) y un incremento en la tasa respiratoria en el inicio de la maduración, incluyendo frutos como tomate, manzana, melocotón y plátano. La velocidad de respiración y la tasa de producción de etileno descienden de nuevo cuando finaliza la maduración. En general, los frutos que maduran relativamente rápido siguen este comportamiento climatérico descrito. Los frutos que no realizan esta transición se clasifican como no climatéricos e incluyen cítricos, uva y fresa, entre otros. Los cambios en la respiración en los frutos no climatéricos son menos drásticos, decreciendo lentamente a partir de la antesis y quizás, incrementando un poco al final de la maduración o en la senescencia (Giovannoni, 2001, 2004; Pech et al., 2008; Payasi y Sanwal, 2010).

El papel del etileno como hormona promotora de los cambios producidos durante la maduración de los frutos climatéricos ha sido demostrado en numerosas especies. Los primeros trabajos realizados en este sentido pusieron de manifiesto que la exposición de los frutos a etileno adelanta los procesos asociados con la maduración, y produce un incremento dramático en la tasa de producción de etileno asociado al inicio de esta etapa del desarrollo. En ellos, el aumento de etileno al principio de la maduración, se considera clave en el inicio de todos los cambios metabólicos que ocurren en el fruto durante este proceso. De hecho, el etileno se utiliza para acelerar la maduración de plátanos y tomates y en la desverdización de cítricos (Wills et al., 1989).

En los frutos la respiración se acelera por la aplicación de etileno exógeno, pero esta respuesta está condicionada por la especie, el cultivar, el estado de desarrollo, el hecho de haber sido recolectado o no y por la concentración y duración del tratamiento. En los frutos climatéricos, la resistencia a la maduración

se supera más fácilmente, el incremento respiratorio se extiende por más tiempo y se estimula el mecanismo de biosíntesis autocatalítica de etileno. En las especies con un comportamiento no climatérico, el aumento en la respiración sólo se produce en presencia de etileno y en función a su concentración (McGlasson, 1970), pero el tratamiento no modifica la producción endógena de etileno, permaneciendo siempre a niveles reducidos, y no acelera la maduración. Según esto, podría esperarse que hubiera una posible relación entre ambos procesos si la acción de la hormona estuviera implicada en alguna de las principales rutas metabólicas. Sin embargo, los estudios realizados sobre la relación temporal entre la producción de etileno y la tasa respiratoria, no han podido establecer un efecto evidente de un sistema sobre el otro. Trabajos realizados en seis cultivares distintos de melón han puesto de manifiesto que las diferencias en las concentraciones de etileno no se reflejan por grandes diferencias en la producción de dióxido de carbono en estos cultivares (Miccolis et al., 1995), lo que sugiere que estos dos aspectos de la maduración pueden ser independientes. Además, la función fisiológica de este incremento respiratorio climatérico todavía está poco conocida ya que algunos frutos no climatéricos (fresa, por ejemplo) tienen lugar eventos bioquímicos similares incluyendo los cambios de color, cambios en el metabolismo de azúcares, ablandamiento del fruto, modificaciones de textura, síntesis de aromas, etc.

El comportamiento de frutos climatéricos inmaduros y frutos no climatéricos es bastante parecido, ambos poseen una baja velocidad de producción de etileno e insensibilidad a la aplicación exógena de la hormona, unida a la ausencia de biosíntesis autocatalítica. En frutos climatéricos maduros la situación es totalmente diferente. Esto llevó a McMurchie et al. (1972) a postular la existencia de dos mecanismos de control de la síntesis de etileno en plantas superiores. En el sistema M1 el etileno es autoinhibido, y ejerce un papel funcional durante el desarrollo de frutos climatéricos y no climatéricos y en la maduración de éstos últimos, en el crecimiento de tejidos vegetativos y es responsable de la producción basal de etileno y en respuesta a estrés. En el sistema M2 el etileno es autocatalítico, el alto rango de producción de etileno producido por este sistema es un evento distintivo de la maduración de los frutos climatéricos y de la senescencia de los órganos (Lelievre et al., 1997; Giovannoni, 2001, 2004; Pech et al., 2008).

La maduración, como otros procesos senescentes de las plantas, está bajo un estricto control genético. Numerosos investigadores han demostrado que el etileno ejerce un papel regulador esencial induciendo cambios en la expresión génica. La obtención de plantas transgénicas con producción de etileno reducida, la utilización de inhibidores de etileno y la identificación de mutantes, han permitido el análisis en mayor profundidad de las relaciones entre etileno y maduración de los frutos a nivel molecular. La

investigación se inició con la identificación de genes específicos involucrados en el proceso de maduración (Grierson et al., 1986; van der Straeten et al., 1990; Hamilton et al., 1990; Hadfield et al., 2000; Pech et al., 2008).

El método de transformación genética en melón está disponible desde los años noventa (Ayub et al., 1996; Guis et al., 1997). Este método ha sido usado para inhibir la biosíntesis de etileno usando un gen antisentido de ACO. Esta construcción antisentido ha permitido discriminar los eventos de la maduración del fruto de melón que son dependientes e independientes de etileno (Ayub et al., 1996; Hadfield et al., 2000; Pech et al., 2008). Estos frutos antisentido ACO de melón mostraron suprimida la producción de etileno en un 99% y no mostraron incremento respiratorio climatérico. Asimismo, en estas líneas transgénicas de melón, la supresión de la producción de etileno dió lugar a una casi completa inhibición del ablandamiento, de lo que se deduce que la degradación de la pared celular es un proceso desencadenado por el etileno. Sin embargo, estas líneas de melón transgénicas muestran un ablandamiento residual significativo, indicando también la presencia de un componente independiente de etileno en el ablandamiento de la pulpa (Pech et al., 2008). Flores et al. (2001) constataron estos resultados mediante la aplicación de niveles crecientes de etileno exógeno a líneas de melón antisentido ACO. En este mismo sentido, estudios de las enzimas específicas involucradas en las modificaciones que ocurren en las paredes celulares de melón, han permitido distinguir entre los procesos relacionados con modificaciones en la pared celular que son dependientes o independientes de etileno (Nishiyama et al., 2007). Estos trabajos apoyan la hipótesis de que enzimas de la familia enzimática reguladas por etileno contribuyen al desensamblaje de la pared celular que acompaña al ablandamiento, mientras que otros miembros de la misma familia, no regulados por etileno, pueden participar en el ablandamiento residual del fruto o no participar directamente en este proceso (Nishiyama et al., 2007; Pech et al., 2008).

El fruto de tomate es el sistema modelo más desarrollado para la comprensión del proceso de maduración y su control hormonal, en particular por etileno (Giovannoni, 2004, 2007). Con respecto a la expresión de estos genes durante la maduración de los frutos, está bien documentado en numerosas especies el incremento en la expresión de ARNm de genes de ACO que precede al incremento de etileno y su acumulación coincide con el climaterio. El análisis de expresión de los genes de biosíntesis de etileno en frutos de tomate revela que al menos cuatro *LeACSs* y tres *LeACOs* son diferencialmente expresados durante la maduración: *LeACS1A*, *LeACS2*, *LeACS4*, *LeACS6*, *LeACO1*, *LeACO2* y *LeACO3* (Fig. 2.8).

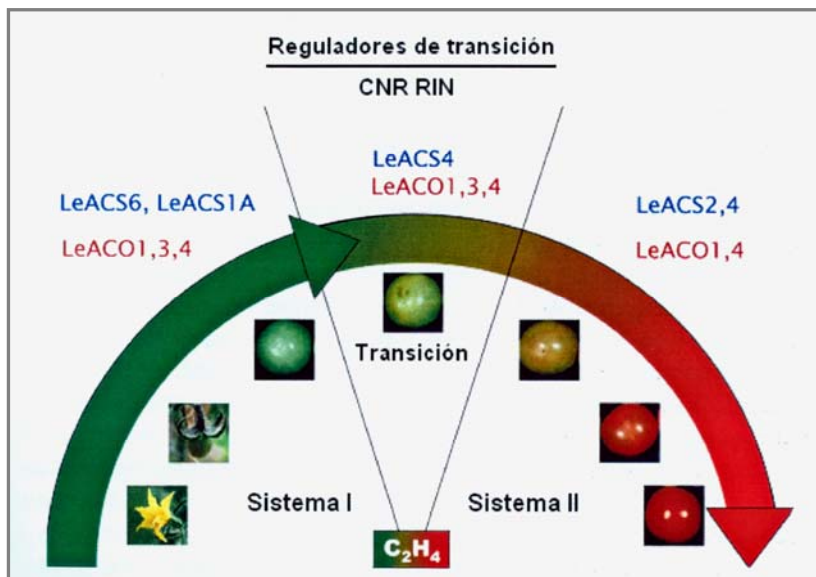


Fig. 2.8. Expresión diferencial de los genes ACS y ACO asociados con la síntesis de etileno del sistema I y sistema II durante el desarrollo y maduración del fruto en tomate (Adaptado de Cara y Giovannoni, 2008).

En base a la expresión diferencial de estos genes durante la maduración en tomate y a sus propiedades enzimáticas, se ha podido establecer un modelo de biosíntesis de etileno durante la maduración de frutos de tomate (Barry y Giovannoni, 2006). El *sistema I* es funcional durante el desarrollo de frutos climatéricos no maduros, está posiblemente mediado por *Le-ACS6*, cuya expresión está negativamente regulada por etileno. Por su parte, los genes *Le-ACS1A*, *Le-ACO1*, *Le-ACO3* y *Le-ACO4* se expresan a bajos niveles en frutos verdes. En la transición a la maduración, desciende la expresión de *Le-ACS6* al mismo tiempo que se induce la expresión de *Le-ACS4* la actividad de RIN y CNR, siendo este un evento independiente de etileno. La inducción de estos genes tiene como consecuencia un aumento en la producción de etileno y ello conlleva a que los transcritos *Le-ACS2* se induzcan y se produzca un aumento en la expresión de *Le-ACO1* y *Le-ACO4* al inicio de la maduración. La expresión de *Le-ACO3* es transitoria, mientras que la inducción de *Le-ACS2*, *Le-ACS4*, *Le-ACO1* y *Le-ACO4* se mantiene durante la maduración (Fig. 2.8). La expresión de estos transcritos causa el marcado incremento en la producción de etileno debido a la síntesis autocatalítica característica del *sistema II* climatérico, y en respuesta a una regulación "feed-back" positiva por etileno (van der Straeten et al., 1990; Nakatsuka et al., 1998; Cara y Giovannoni, 2008).

Por consiguiente, la producción del etileno climatérico en tomate está fundamentalmente controlada por los genes *Le-ACS2* y *Le-ACO1* (Alexander y Grierson, 2002) y el estudio del promotor de *Le-ACO1* condujo a suponer que la predisposición de este fruto a madurar depende de una cascada de procesos independientes de etileno. Es posible que una proteína tipo *zinc finger* se una a una región del promotor para reprimir la transcripción de *Le-ACO1* (Alexander y Grierson, 2002).

Los análisis de líneas de transgénicas y mutantes a nivel de la biosíntesis y percepción de etileno sugieren que la maduración climatérica representa una combinación del control por el etileno y el propio desarrollo (Fig. 2.9). Es decir, el control por desarrollo se refiere a una serie de procesos que regulan la maduración independientemente del etileno (Giovannoni, 2007; Pech et al., 2008). Esta forma de regular la maduración de frutos al margen del etileno tiene un impacto muy importante en una serie de genes relacionados con el proceso de maduración (Giovannoni, 2004, 2007; Pech et al., 2008). Al igual que sucede con otras señales hormonales conocidas, la respuesta al etileno puede estar controlada tanto por cambios en su biosíntesis como por la presencia de percepción celular y ruta de señalización. Los genes correspondientes a ACS, ACO y receptores (ETR) están regulados transcripcionalmente (Adams-Phillips et al., 2004; Giovannoni, 2004).

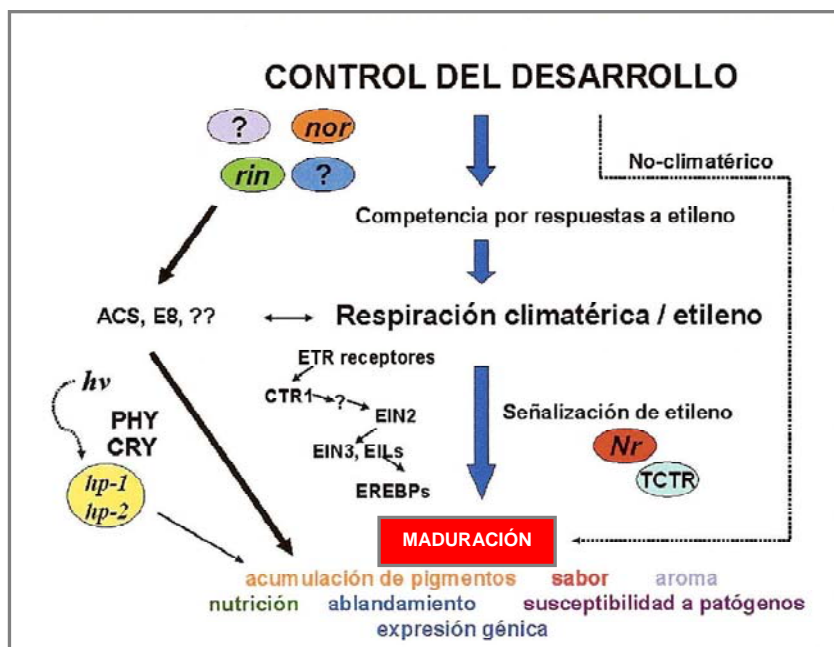


Fig. 2.9. Modelo de mecanismo de señalización durante la maduración del fruto.

Las plantas transgénicas de tomate que expresan un mensajero antisentido de las enzimas responsables de la biosíntesis de etileno se muestran incapaces de sintetizar etileno lo que provoca un bloqueo en la maduración de frutos, proceso que puede ser restaurado por la aplicación exógena de etileno (Oeller et al., 1991). La demostración más clara de la necesidad de etileno en la maduración viene del estudio del mutante *Never-ripe (Nr)* de tomate. Como su nombre indica, esta mutación bloquea totalmente el proceso de maduración de frutos, el mutante no muestra un fenotipo de insensibilidad global a etileno y fue identificado como una mutación alélica en un gen que codifica para un receptor de etileno, *ERS-like* (Lanahan et al., 1994; Wilkinson et al., 1995). La mutación en el gen *Nr* provoca una incapacidad de unión del receptor a la hormona, lo que se elimina la respuesta. Estos experimentos son pruebas inequívocas del papel del etileno en la maduración y abren una puerta a la mejora biotecnológica del proceso de maduración de frutos (Barry y Giovannoni, 2006; Lin et al., 2009).

Con respecto al receptor de etileno, se han descrito 6 genes (Le-ETR1-6). Estos receptores actúan como reguladores negativos a que suprimen la expresión de genes que responden a etileno en ausencia de gas. Todos los genes de la familia ETR se expresan en órganos reproductivos (flores y frutos) siendo el Le-ETR4 el más expresado. No obstante, la expresión de Le-ETR3 es quien más se altera a lo largo del proceso de maduración (Adams-Phillips et al., 2004). La familia ETR en *Arabidopsis* posee cinco miembros (At-ETR1-5). Las proteínas At-ETR1 y At-ERS1 interactúan con At-CTR1, una serín/treonín proteín kinasa (MAPKKK). En tomate, los receptores Le-ETRs también interactúan directamente con algún componente de la familia Le-CTR, la cual posee al menos cuatro miembros (Alexander y Grierson, 2002; Giovannoni, 2004).

Todos ellos se expresan constitutivamente en tomate con la excepción de Le-CTR1 que es inducido por la maduración y etileno exógeno (Bouzayen, 2002; Giovannoni, 2004; Lin et al., 2009). Le-ETR1 interactúa directamente con la región N-terminal de LeCTR2. Ahora bien, por los datos aparecidos en la bibliografía, todas las respuestas inducidas por etileno no comparten una ruta común de señalización ya que Le-ETR3 no interactúa con Le-CTR2 (Alexander y Grierson, 2002; Giovannoni, 2004).



2.2. OBJETIVOS

Existe un vínculo evidente entre la fisiología de la maduración de los frutos y sus calidades organolépticas y nutricionales, ya que éstas varían por las numerosas modificaciones bioquímicas que ocurren particularmente durante la maduración del fruto.

La aparición del fruto dentro de la escala biológica ha sido un logro muy importante a nivel evolutivo ya que este órgano está directamente relacionado con la dispersión de las semillas, las cuales son el órgano de perpetuación de las plantas Espermatofitas. Conceptualmente, y como una consecuencia de la polinización, el fruto es un ovario fecundado; el cual mediante una serie de mecanismos complejos regulados por hormonas se transforma en un fruto maduro. Existe una relación evidente entre la fisiología de la maduración de frutos y sus calidades organolépticas y nutricionales. De hecho, estas últimas están influenciadas por numerosas modificaciones bioquímicas que ocurren más particularmente durante la maduración del fruto. Dependiendo de sus características, este fruto puede tener valores socioeconómicos muy importantes.

La fructificación y el desarrollo del fruto son procesos complejos en los que intervienen muchos factores, entre ellos, la regulación hormonal. La fitohormona etileno producida por los frutos carnosos durante la fase del climaterio es la que desencadena y coordina un conjunto de procesos directamente implicados con la maduración de frutos climatéricos. Tanto, que miembros de las familias multigénicas correspondientes a varias enzimas de la ruta de biosíntesis de etileno así como otro tipo de enzimas implicadas en el ablandamiento y cambios de color del fruto, se expresan espacial y temporalmente

durante el climaterio. No obstante, aunque hay multitud de publicaciones referidas al papel del etileno en el proceso de maduración, son muy escasas las que se refieren a estudios sobre la expresión génica espacial ni tampoco estudios detallados que ayuden a comprender el papel que juega la semilla en el mecanismo de regulación por etileno a lo largo del desarrollo del fruto.

España constituye el principal productor de aceite de oliva y aceituna de mesa a nivel mundial. Su estructura varietal se mantiene con las variedades autóctonas y en el caso de las nuevas plantaciones, éstas se realizan con las mismas variedades o con otras de características agronómicas y de calidad de aceite reconocidas a nivel internacional. Sin embargo, en la actualidad el consumidor aprecia en mayor medida las características organolépticas y nutricionales de los aceites, en definitiva su singularidad. Esta singularidad viene dada además de por su composición acídica, por los componentes minoritarios que varían de forma ostensible entre variedades y que se ven afectados, en su mayoría, por las condiciones agroclimáticas. El estado de maduración del fruto es uno de los factores más determinantes que condiciona la calidad del aceite. La maduración del fruto del olivo es de naturaleza no climatérica, aunque existen resultados dispares en la bibliografía sobre este carácter.

En base a nuestro conocimiento bioquímico y molecular sobre el desarrollo de frutos carnosos, como las cucurbitáceas, dónde la variabilidad en la vida media y carácter climatérico del fruto es un carácter dependiente de la variedad, se ha planificado un complejo protocolo tendente a iniciar el estudio de la regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto del olivo, haciendo hincapié en el papel fisiológico del etileno, relacionados a nivel de biosíntesis en plantas.

El origen del cultivo y de las variedades de olivo de una gran importancia económica, esencialmente debida a sus frutos, ha ocasionado que en la actualidad dispongamos de un amplio número de variedades que presentan una gran variabilidad para todas las características agronómicas de interés. Para este estudio, se han elegido y caracterizado dos variedades de olivo, "Arbequina" y "Picual", por tratarse de dos variedades contrastadas desde el punto de vista de la velocidad de maduración, entre otras características del fruto. "Arbequina" evoluciona lentamente y podría asociarse a una baja producción de etileno, a la inversa de "Picual" cuya evolución rápida podría asociarse a un fuerte desprendimiento de etileno. En consecuencia, estas dos variedades son las variedades elegidas para estudiar la implicación de la hormona etileno en la fructificación y desarrollo del fruto en olivo.

Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. Aislamiento, caracterización y expresión temporal de dos cDNAs correspondientes a enzimas relacionadas con la biosíntesis de etileno, *OeACS* y *OeACO*, durante el crecimiento y maduración del fruto en olivo.
2. Aislamiento, caracterización y expresión temporal de tres cDNAs correspondientes a enzimas relacionadas con la señalización del etileno, *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL*, durante el crecimiento y maduración del fruto en olivo.



2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. MATERIAL VEGETAL

El trabajo recogido en esta Memoria se ha realizado en dos variedades de la Oleácea *Olea europaea* L, “Arbequina” y “Picual”, las cuales fueron cultivadas en el término municipal de Olivenza (Badajoz). En la época apropiada (entre mayo y diciembre) se han recogido ramas, hojas, flores y frutos de 10 árboles para cada variedad durante las diferentes fases del desarrollo a lo largo de dos cosechas consecutivas 2008 y 2009.

Teniendo en cuenta la cantidad variable de frutos recolectados de un estado al otro del desarrollo, unido a las condiciones climáticas variables de un año sobre el otro, se constituyeron lotes de 250 a 300 flores y frutos por distribución aleatoria de 10 árboles para cada variedad y en cada estado de desarrollo. Un lote se congeló en nitrógeno líquido en campo, separando previamente el endocarpo (semilla) del mesocarpo (pulpa) del fruto. Este lote se congeló en nitrógeno líquido hasta el laboratorio, dónde se ha almacenado a -80 °C para el posterior estudio de los contenidos de ACC/MACC y la extracción de ácidos nucleicos. El otro lote se transportó en nevera hasta el laboratorio y permitió determinar las propiedades físico-químicas como las medidas de peso, firmeza, y color del fruto inmediatamente. Un tercer lote, considerado como de referencia, permitió seguir la cinética de desarrollo y maduración del fruto sobre el árbol para cada variedad.

Para el análisis de hojas y brotes de las dos variedades, estas muestras se recogieron desde los mismos árboles. Todas las muestras fueron también inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas hasta su uso a -80°C .



Fig. 2.10. Estadios del desarrollo del fruto de las variedades "Arbequina" y "Picual" de olivo (7, 14, 28, 42, 98, 140, 150 y 217 DPA). DPA: Días Post Antesis.

Para el desarrollo del fruto se recogieron 8 estadios para cada variedad: 7, 14, 28, 42, 98, 140, 150 y 217 días post-antesis (DPA). Desde el estadio 42 DPA se procedió a la separación del mesocarpo y endocarpo (Fig. 2.10).

El estudio del desarrollo floral abarcó los estadios de flor cerrada (-7 DPA) y flor abierta (0 DPA, antesis floral) para cada variedad (Fig. 2.11), recogiendo de 250 a 300 flores en cada estadio. La flor cerrada fue recogida una semana antes de la antesis floral.

En total, los estadios cosechados de la variedad “Arbequina” y “Picual” se han extendido entre -7 (flor cerrada) y 217 DPA, para obtener una representación de los principales estados de la ontogénesis (10 estadios).

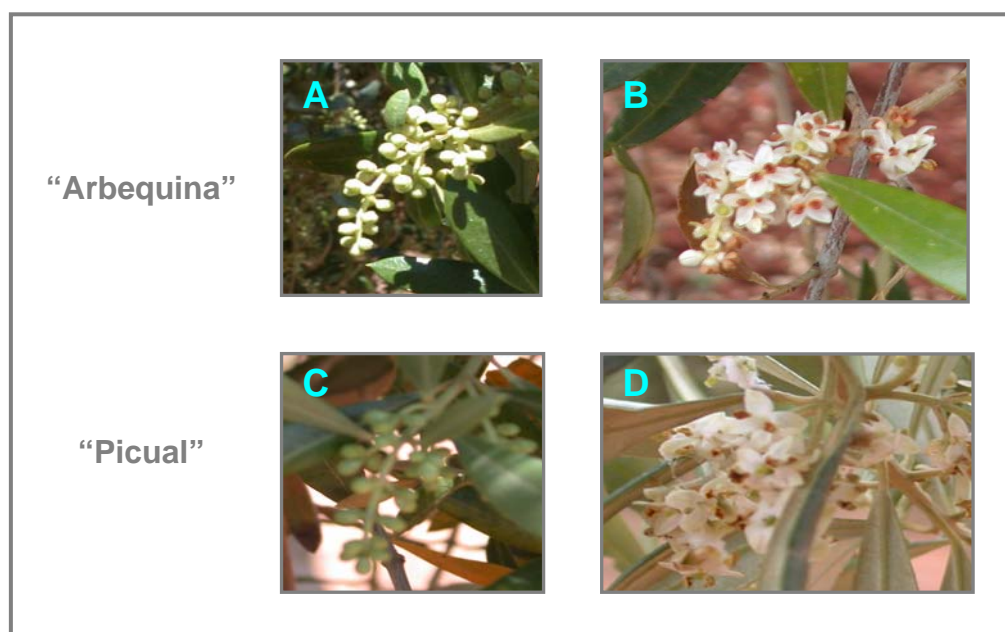


Fig. 2.11. Estadios del desarrollo floral de las dos variedades “Arbequina” (A,B) y “Picual” (C,D) de olivo. Flor cerrada (A,C) y flor abierta (B,D). La flor cerrada fue recogida una semana antes de la antesis o apertura floral.

Los tratamientos de los frutos se realizaron sobre los árboles de olivo en campo abierto (20 árboles por tratamiento y variedad) en las variedades de “Arbequina” y “Picual”. Se seleccionaron cuatro ramas por árbol por tamaño y carga de fruto uniforme y se les aplicaron los correspondientes tratamientos, dejando

una como control. Para cada tratamiento se aplicó con pulverizador a una rama/árbol con las soluciones de 0,1 mM ethefon (Sigma-Aldrich), o inhibidores de la síntesis de etileno [1 mM ácido aminooxiacético (AOA) o 1 mM cloruro de cobalto (CoCl_2), Sigma-Aldrich], incluyendo el control tratado con agua. Todos los tratamientos y el control se aplicaron como una solución acuosa (150 mL por rama) al inicio de la maduración del fruto (154 DPA) sobre un mismo árbol en un total de 20 árboles por variedad. Después del tratamiento, se cosecharon 20 frutos de cada rama a los 7 y 15 días. Un lote de estos frutos fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido en campo para la extracción de ácidos nucleicos, separando previamente el endocarpo (semilla) del mesocarpo (pulpa) del fruto, y otro lote fue transportado en nevera hasta el laboratorio y permitió determinar las propiedades físico-químicas como las medidas de peso, firmeza, color y producción de etileno del fruto.

2.3.2. MÉTODOS

2.3.2.1. Determinaciones bioquímicas

a) *Firmeza del fruto*

La firmeza del fruto fue determinada usando un penetrómetro (DT120, ANAME, España) ajustado con un émbolo de 6 mm de diámetro (Fig. 2.12). Para cada fruto se hicieron dos determinaciones que corresponden a lugares opuestos del mesocarpo. Los resultados se expresaron en N/cm^3 .

b) *Producción de etileno durante el desarrollo del fruto*

Lotes de 3 frutos de cada uno de los diferentes estados del desarrollo se incluyeron en un vial de cristal apropiado que contenía un círculo de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. De cada muestra a analizar se hicieron al menos 6 réplicas. Los viales se sellaron herméticamente y se incubaron en oscuridad a 30 °C. Transcurridos 60 min, se tomó con una jeringa de insulina 1 ml de muestra de la atmósfera interna del vial y se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 Plus (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) con un detector de ionización de llama y una columna pseudocapilar HP-PoraPlotQ (10 m x 0,32 mm) empaquetada con poliestireno-divinilbenzeno (Fig. 2.12). Otras características de la determinación de etileno han sido previamente descritas (Gallardo et al., 1991; Gomez-Jimenez et al., 1998).

c) *Cuantificación de ACC y MACC*

Se partió de 100 mg de material vegetal congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se homogeneizó a 4°C usando arena fina lavada en un mortero con 0,6 mL de etanol al 80%. El mortero se lavó con 0,2 mL de etanol al 80% y el homogeneizado se mantuvo a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un vaso de precipitado en condiciones suaves de agitación durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se secó en un rotavapor a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al sedimento obtenido se le añadieron 3 mL de agua desionizada y 2 mL de cloroformo. Posteriormente se agitó vigorosamente y se centrifugó nuevamente a 10000 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para los análisis de ACC (Gomez-Jimenez et al., 2001). El MACC se valoró a partir de 1 mL del sobrenadante anterior mediante su hidrólisis a ACC en presencia de HCl (6 M) a 100°C durante 3 horas. Las soluciones resultantes se neutralizaron con NaOH en un volumen de 2 mL, y clarificadas por centrifugación. Las diferencias en el contenido de ACC, antes y tras la hidrólisis con HCl, se consideró como la cantidad de MACC en el extracto (Gomez-Jimenez et al., 2001). Los experimentos se repitieron al menos 3 veces con 3 réplicas de cada uno.

d) *Preparación del patrón de etileno*

El patrón se preparó a partir de etileno puro. Para valorar el etileno se preparó una concentración de etileno similar al detectado en nuestras muestras biológicas.

Para ello se utilizó 1 mL de etileno puro que se inyectó en un recipiente con un volumen de aire conocido, herméticamente cerrado y que poseía un tapón perforado recubierto de silicona solidificable y provisto de un septo de silicona sólida en su interior. Entre el septo y la silicona solidificable se depositó una pequeña cantidad de mercurio. Una vez inyectado el etileno puro en este recipiente se mantuvo en posición invertida durante 48 h. A continuación se hizo una nueva dilución del etileno tomando una cantidad conocida del recipiente preparado e inyectándola en otro recipiente de capacidad conocida y con las mismas características que el primero. Este recipiente se mantuvo en posición invertida evitándose las posibles pérdidas del gas contenido en su interior y posibilitándose el uso del mismo patrón durante un tiempo relativamente largo. Este patrón se conservó en las mismas condiciones de presión y temperatura que las muestras a medir.



Fig. 2.12. Penetrómetro usado para determinar la firmeza del fruto (a la izquierda) y cromatógrafo de gases (a la derecha) usado para la producción de etileno y cuantificación de ACC/MACC.

2.3.2.2. Líneas celulares utilizadas

A lo largo de la experimentación han sido empleadas distintas líneas celulares de la bacteria *E. coli*. Las diferentes cepas utilizadas, junto con las características más relevantes, uso y origen o referencia bibliográfica, se detalla en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Líneas celulares utilizadas

CEPA	GENOTIPO	USO	REFERENCIA
DH5 α	F ⁻ , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Subclonar fragmentos de cADN. Obtención de células competentes.	Inoue et al. (1990)
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Subclonar fragmentos de cADN. Obtención de células competentes.	Yanish-Perron et al. (1985)

a) *Crecimiento bacteriano: condiciones y medios de cultivo*

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C. Los cultivos realizados en medio líquido se mantuvieron en agitación constante (aprox. 200 rpm) en un agitador orbital con temperatura controlada. Para estimar el crecimiento de los cultivos, se midió a la DO a 600 nm. Los distintos tipos de medios empleados en la propagación de cepas fueron los siguientes (Sambrook et al., 1989):

LB (medio Luria-Bertani). Es un medio general de crecimiento.

- 1% Bacto-tryptona
- 0,5% Bacto-Yeast-Extract
- 0,5% NaCl
- 0,1% Glucosa
- Ajustado a pH 7,0 con NaOH

En el caso de cultivos en placa (medio sólido) se añadió agar en una proporción del 1,5%.

LBA (medio LB suplementado con ampicilina)

Medio LB suplementado con 1 mL/L de una disolución de ampicilina (50 mg/mL) previamente preparada en agua destilada estéril y conservada en alícuotas a -20 °C. Para su esterilización se han empleado filtros estériles de 0,20 µm de diámetro de poro. Este medio se utilizó para la selección de bacterias que habían sido transformadas con un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina, antibiótico que inhibe una serie de enzimas en la síntesis de la pared celular. El gen que confiere la resistencia a la ampicilina codifica para una enzima que es secretada al espacio periplásmico de la bacteria, donde cataliza la hidrólisis del anillo β-lactámico, y produce así la destrucción del efecto tóxico de la droga.

LBA/X-Gal/IPTG

Son placas LBA suplementadas con X-Gal e IPTG. Para su preparación, aproximadamente 15 min antes de proceder a la siembra de los transformantes, se extendieron sobre las placas 35 µl de una disolución de X-Gal (20 mg/mL) en N,N-Dimetilformamida y 4 µL de una disolución de IPTG (200 mg/ml) en agua destilada estéril. Estas placas se utilizaron para la selección de colonias bacterianas transformadas con

plásmidos que portan el gen *lacZ*, que codifica para el enzima β -galactosidasa de *E. coli*, interrumpido por un fragmento de ADN clonado, de modo que han perdido la capacidad de actuar sobre el sustrato cromogénico y no producen colonias transformantes azules como el plásmido no recombinante.

b) *Método de mantenimiento de las cepas celulares de bacterias*

Las cepas celulares de bacterias se conservaron a corto plazo en placas de agar a 4 °C. La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida, en N₂, de los cultivos crecidos y suplementados con glicerol estéril a una concentración final del 15% (v/v). Los criotubos se almacenaron a una temperatura de -80 °C.

c) *Preparación de células competentes*

Las células de *E. coli* se dejaron crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente se inoculó en 250 mL de LB el 1% de este cultivo (2,5 mL) y se dejó con fuerte agitación a la misma temperatura hasta obtenerse una DO a 600 nm de 0,6. El que las células crezcan rápidamente es un factor importante. A continuación, las células se enfriaron en hielo durante 15-30 min con el fin de detener su crecimiento y se centrifugaron a 7000 g durante 15 min a 4 °C. El pellet celular se resuspendió con fuerte agitación en 200 mL de agua fría estéril. Se centrifugó y se resuspendió nuevamente en las mismas condiciones. Se volvió a centrifugar de la misma forma resuspendiendo esta vez el sedimento con glicerol frío (un 10% del volumen de partida). Se centrifugó de la manera habitual y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente. El sedimento se resuspendió en un 10% de glicerol y se realizaron alícuotas de 80 μ L en tubos fríos, que se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

d) *Transformación*

En la introducción del ADN plasmídico al interior de *E. coli* se utilizaron células competentes, que son más permeables al ADN, a fin de conseguir una transformación eficiente. Las células competentes de la cepa DH5 α se prepararon según se describe en el apartado anterior.

La transformación se llevó a cabo en alícuotas de 100 μ L de células competentes recién descongeladas a las que se les añadió 2 μ L de ADN plasmídico o de la reacción de ligación, dejando incubar en hielo

durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 45 s. Se dejaron 2 min en hielo y trascurrido este tiempo se añadieron 200 µl de medio SOB o SOC. Las células se incubaron durante 45 min a 37 °C con agitación. Se sembraron entre 50 y 150 µL de la transformación en las correspondientes placas selectivas y se dejaron a 37 °C toda la noche.

2.3.2.3. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de hojas, brotes, flores y frutos de olivo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gómez-Jiménez et al. (2010). Para evitar contaminaciones con ARNasas, todo el material a emplear se limpió con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y se esterilizó en un horno durante 2 horas a 180 °C. Las soluciones se trataron con 0,1% (v/v) de DEPC durante al menos dos horas en agitación. Una vez tratadas, las soluciones se autoclavaron (120 °C y 1 bar durante 20 min) para eliminar el DEPC.

Se trituraron entre 0,5 y 2 g de tejido congelado en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta convertirlo en un 'polvo' fino. Una alícuota de 2 mL de tampón de extracción fue adicionado al polvo y macerados durante 1 min junto a 5% de BSA y 1,5 g de PVPP hidratado. El homogenizado se transfirió a un tubo Beckman de 50 mL y se adicionaron 8 mL de tampón de extracción. Una alícuota de 200 µL de la solución de proteinasa K se adicionó al extracto y se incubó a 37 °C con agitación suave de 80 rpm durante 20 min. El extracto se centrifugó a 10 000 rpm en un rotor Beckman JA-20 a 4 °C durante 10 min para descartar los tejidos insolubles y el PVPP. El sobrenadante se transvasó a un tubo nuevo y se extrajo mediante agitación vigorosa con un volumen igual de fenol saturado, hasta obtener una interfaz clara y limpia. Generalmente dos extracciones son suficientes para limpiar el ARN. Después de cada extracción, las fases fueron separadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min y 20 °C.

La solución acuosa se extrajo una vez más con un volumen igual de solución Sevag y las fases se separaron por centrifugación como se describe en el paso anterior. El volumen de la fase superior se midió y se transfirió a un tubo 'Corex' estéril de 15 mL. Se añadió un tercio del volumen medido de LiCl 8 M, y se dejó precipitando a 4 °C durante una noche. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 4 °C durante 20 min a 8 000 g y se retiró el sobrenadante. El precipitado de ARN se lavó con 1 mL de etanol frío 70% (v/v). Se secó el precipitado a temperatura ambiente y se disolvió el ARN en 30 -150 µL de agua tratada con DEPC.

2.3.2.4. Síntesis de ADNc

A 1 µg de ARN libre de ADN se le añadió 1 µL de oligo dT (50 µM) y H₂O Milli-Q hasta un volumen final de reacción de 20 µL. Se mezcló y se aplicaron las siguientes condiciones:

- 10 min a 70° C
- 90 min a 37° C.

Transcurridos 5-10 min se añadieron:

- 2 µL de buffer MMLV (Promega)
- 1 µL ARNsai (inhibidor de ARNsai)
- 2 µL dNTPs (10 mM totales)
- 1 µL MMLV (Promega)
- Se mezcló y se dejó finalizar los 90 min a 37° C.
- 5 min a 95° C.

2.3.2.5. Purificación de fragmentos de ADN

Cuando fue necesario aislar determinados fragmentos de ADN para su uso posterior se utilizó el “*GeneClean kit*” (BIO101). Después de incubar el ADN con las enzimas de restricción adecuadas para liberar el inserto del plásmido en que estaba clonado, se corrió en un gel de agarosa, se recuperó el fragmento de interés con la ayuda de un bisturí, se colocó en un eppendorf con 3 volúmenes de INa (6 M) y se incubó a 55 °C durante 5 min, mezclándolo cada 2 min. Una vez disuelta la agarosa, se añadieron entre 5-12 µL de resina sintética (*glassmilk*) y se mezcló durante 5-10 min por agitación manual, para que se formaran los complejos ADN/resina. Se centrifugó durante 30 s a 25 000 g y el precipitado se lavó 3 veces con 700 µL de la solución de lavado (*New Wash*) que contenía: Tris-HCl pH 7,0-8,5, EDTA, NaCl y etanol 50 %. Se secó el precipitado en una bomba de vacío durante 5 min y finalmente se resuspendió con 5-12 µL de agua destilada estéril, centrifugándose posteriormente durante 2 min para recuperar el ADN separado de la resina, el cual se almacenó a -20 °C.

2.3.2.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos

La cantidad de ARN y ADN obtenidas se determinaron espectrofotométricamente como indicaron Sambrook et al. (1989). Se midió la absorbancia a 260 nm y se tuvo en cuenta que una unidad de

densidad óptica a A_{260} equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN y a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN. La calidad de la muestra ha sido evaluada mediante comparación de las lecturas espectrofotométricas a 230, 240, 260 y 280 nm y análisis electroforético en gel de agarosa.

2.3.2.7. Modificaciones de los ácidos nucleicos

a) Ligaciones

Las ligaciones se realizaron tal y como se describe en el protocolo de la enzima ADN T4 Ligasa (Promega). Esta enzima se encarga de catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre moléculas que presentan tanto extremos cohesivos como romos. El inserto debe de estar en relación 3:1 respecto al vector utilizado. La reacción de ligación se realizó desde 12 hasta 72 horas a 4°C. Posteriormente se realizó la transformación de *E. coli* con el producto de ligación. Las células se sembraron en placas con medio selectivo y se dejaron en incubación a 37°C.

b) Tratamiento con ADNasa

El ARN se trató con ADNasa para eliminar así los posibles residuos de ADN que pudiesen interferir de forma negativa en las muestras.

Se partió de 25-50 μg de ARN a los cuales se les añadió:

- 10 μL de ADNsa RQ1 (Promega)
- 10 μL del buffer correspondiente 10X
- 1 μL de ARNsai (ARNsa inhibidora)
- x μL de H_2O milli-Q (hasta 100 μL)

Se incubó la mezcla a 37 °C un máximo de 30 min. Se añadieron 300 μL de TE estéril a pH 8,0 y 400 μL de fenol:cloroformo (3:1) agitándose posteriormente. Se mantuvo en hielo 5 min. Los tubos se centrifugaron 5 min a 25 000 g para separar las fases y se recogió el sobrenadante. Se precipitaron los ARNs con 40 μL de acetato sódico (3M) pH 4,8 y 500 μL de isopropanol durante 60 min a -80 °C. Se centrifugó 30 min a 4 °C y se lavó precipitado con 1 mL de etanol frío (70%). Se resuspendió en 20 μL de

H₂O Milli-Q y se cuantificó el ARN espectrofotométricamente y se corrieron 0.5 µg en gel de agarosa estéril al 1%. Posteriormente se conservaron a -20 °C.

2.3.2.8. Electroforesis de ácidos nucleicos

El análisis de los fragmentos de ADN y ARN se realizó por electroforesis en geles de agarosa a una concentración entre 1-2% (w/v), según el tamaño del fragmento a separar. Los geles se prepararon con tampón TAE [Tris-acetato (40 mM) y EDTA (2 mM) pH 8] autoclavado.

Para la visualización de los fragmentos de ADN, se añadió al gel bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL, observándose el gel en un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm).

Las muestras se mezclaron con tampón de carga (10X): Tris-HCl (50 mM) pH 8,0, glicerol (50%), azul de bromofenol (0,25%) y xylene cyanole (0,25%). Los voltajes utilizados fueron diferentes dependiendo de la situación. La duración de la electroforesis vendrá determinada por el tiempo que tarde el frente del tampón de carga en llegar a la parte inferior del gel.

Los tamaños de los fragmentos de ADN se estimaron por comparación con diferentes marcadores de ADN (Promega): el “fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*” (para pesos moleculares entre 21-0,5 Kb); el “1 Kb ADN ladder” (para tamaños que oscilan entre 10-0,25 Kb) y el “100 pb ADN ladder” (para tamaños menores, comprendidos entre 1,5-0,1 Kb).

2.3.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa

a) PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para amplificar fragmentos de cADN que se encuentran entre dos regiones conocidas. Se utilizaron para ello distintos termocicladores: *Mastercycler personal* (Eppendorf), *Thermocycler* (Biometer) y *LKB-Gene ARAQ Controller* (Pharmacia).

La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente:

- Tampón de amplificación 10x2,5 μ L
- dNTPs (10 mM).....0,5 μ L
- Oligonucleótido 5' (100 mM).....0,5 μ L
- Oligonucleótido 3' (100 mM)0,5 μ L
- ADN molde (200 ng/ μ L).....1 μ L
- Taq polimerasa (5 U/ μ L).....0,1 μ L
- SO₄Mg (25 mM).....2 μ L
- DMSO1,25 μ L
- Agua destilada estéril (volumen final).....25 μ L

Se empleó DMSO (dimetilsulfóxido) al 5% para aumentar la especificidad de la reacción. Las condiciones modelo de PCR fueron las siguientes:

- *Desnaturalización inicial*: 94 °C durante 5 min.
- *Desnaturalización* : 94 °C – 95 °C durante 30 s.

Estas desnaturalizaciones permiten la separación de las hebras de ADN para permitir los pasos posteriores.

- *Anillamiento* (1min ó 90 s): La temperatura depende de la composición y longitud de los oligonucleótidos utilizados y se calculó utilizando el programa *Gene Runner*. En nuestro caso la temperatura de anillamiento más utilizada fue 56°C.
- *Extensión* (72 °C): El tiempo depende de la longitud del fragmento a amplificar (1min/Kb). Una vez que los oligonucleótidos se anillaron a la secuencia, se produce la extensión de los oligonucleótidos mediante la acción de la polimerasa que sintetiza el nuevo ADN en dirección 5' → 3'.

El número de ciclos fueron generalmente de 30 a 40 (desde el paso 2 al 4).

- *Etapas de terminación* (72 °C durante 7 min): Se realizó esta etapa para favorecer la extensión de las cadenas que no acabaron de sintetizarse.

Estas condiciones se modificaron según la aplicación.

b) *Primers utilizados*

Para la clonación de los diferentes genes obtenidos en esta Memoria (*OeACO*, *OeACS*, *OeERS*, *OeCTR*, *OeEIL*) se han diseñado primers degenerados correspondientes a regiones de aminoácidos de otros genes de plantas altamente conservadas. En la Tabla 2.2 se muestran la pareja de primers degenerados para cada gen.

Tabla 2.2. Primers diseñados para la clonación de los genes de olivo.

PRIMERS	SECIENCIAS 5'--3'
ACO Fw	5'-CGCGGATCCGCNTGYSARAANTGGGGNTT-3'
ACO Rv	5'-AAACTGCAGNGGYTCYTTNGCYTGRAAYTT-3'
ACS Fw	5'-GCTGATCCTGGYGATGCWTT-3'
ACS Rv	5'-ACYCKAAATCCTGGWAAMCCT-3'
ERS Fw	5'-GCTNGTNCAYATHATHCCTG-3'
ERS Rv	5'-CTCATYTCATGRITTCATNAC-3'
CTR Fw	5'-ATGGARCARGAYTTYCAYGCNGA-3'
CTR Rv	5'-GANGGNGKYTTCCANGGYTC3'
EIL Fw	5'-TKGAGARGAGGATGTGGAGRGAC-3'
EIL Rv	5'-ATAATRGCAAGCCADGTWGCAC-3'

c) *Clonación de los productos obtenidos por PCR*

Los productos de PCR amplificados y purificados mediante el *Geneclean kit* fueron clonados directamente en el plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) que contienen timidinas en la posición 3' terminal de ambos extremos y aprovechan la propiedad de las Taq polimerasas (con actividad transferasa terminal) de añadir un único residuo de desoxiadenosina (dATP) a los extremos 3' de los productos obtenidos (Fig. 2.13).

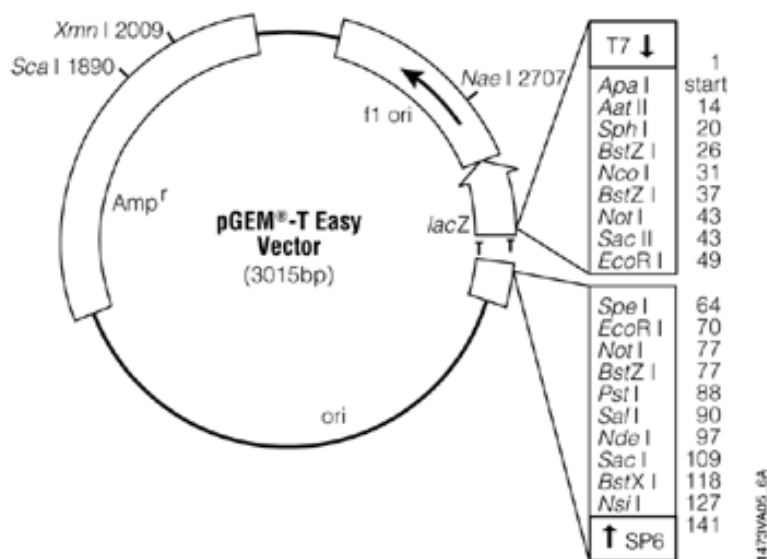


Fig. 2.13. Mapa del vector de replicación en *E. coli* pGEM®-TEasy. *Amp^r*, gen de resistencia a la ampicilina; *ori*, origen de replicación; *f1 ori*, fragmento de la región intergénica del fago f1 (relacionado con M13) que codifica para las funciones requeridas en la replicación y el empaquetamiento del ADN y permite la obtención de ADN de cadena sencilla; *lacZ*, fragmento del operón *lac* de *E. coli* que codifica para la β -galactosidasa.; *T7* y *SP6*, promotores de las ARN polimerasas. Se observa el sitio de clonación el cual proporciona lugares de reconocimiento para las endonucleasas de restricción.

2.3.2.9. Análisis de expresión de diferentes transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR)

La QRT-PCR es una técnica que permite obtener una medida cuantitativa del transcrito de interés. Está basada en las propiedades de ciertos fluoróforos (en nuestro caso SYBR® green I), que al ser excitados con una longitud de onda, emiten fluorescencia en otra longitud de onda, siempre y cuando se encuentre intercalado entre la doble hebra de ADN. Entonces, el aumento de fluorescencia, será directamente proporcional a la cantidad de ADN. De esta forma se podrá determinar en que ciclo exacto empieza la fase exponencial de amplificación, donde los reactivos limitantes no influyen en la eficiencia de PCR, y se podrá tener una idea exacta de la cantidad de transcrito existente en la muestra. Para ello lo que se hace es medir el ciclo umbral (Ct). Este ciclo umbral es el número de ciclos en el cual hay suficiente producto de amplificación acumulado para producir una señal fluorescente detectable frente al ruido de fondo y es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias molde iniciales. En este sistema, un

incremento de 10 veces en el número de copias iniciales produce una diferencia de 3,2 ciclos en el valor de Ct.

Tabla 2.3. Primers usados en la QRT-PCR.

PRIMERS	SECUENCIAS
RT-ACS Fw	5'-GATCCTGGTGATGCTTTGCT-3'
RT-ACS Rv	5'-TCAGCTTCGTTGTATGCTGC-3'
RT-ACO Fw	5'-CGGATCCGCATGTCAGAAAT-3'
RT-ACO Rv	5'-TACTTTCCCAGTCTAAATCA-3'
RT-ERS Fw	5'-AAGTGGAGGGACCATGAGCTT-3'
RT-ERS Rv	5'-TCTTTCAAGAAGTTCATGACG-3'
RT-CTR Fw	5'-GAGCAGGATTTTCATGCTGA-3'
RT-CTR Rv	5'-ACGAGGTAGTTTGTATAGACT-3'
RT-EIL Fw	5'-AGATGATGGAAGTTTGCAAAGCTC-3'
RT-EIL Rv	5'-GTGGAACCTTTCTCTAATGGAA-3'

a) Condiciones de la QRT-PCR

Inicialmente para realizar este estudio fue necesario tratar con ADNsa el ARN total de *Olea europaea* (25-50 µg) procedente de:

- Frutos completos (7, 14 y 28 DPA) y mesocarpo (42, 98, 140, 150 y 217 DPA)
- Flores abiertas y cerradas
- Hojas jóvenes
- Brotes

El ARN ya libre de ADN, se empleó para la síntesis de las diferentes réplicas de cADN para cada tejido y estadio a examen. Los primers empleados para la determinación de los niveles de expresión de la ACO, ACS, ERS, CTR y EIL de olivo mediante QRT-PCR se muestran en la Tabla 2.3.

Para llevar a cabo las QRT-PCR, se usó el kit comercial iQ™ SYBR® Green Supermix de BioRad en una PCR a tiempo real de BioRad “MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System” (www.biorad.com). Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante, pero en un volumen final de reacción de 25 µL (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Mix de reacción de una QRT-PCR.

MIX DE REACCIÓN	VOLUMEN
iQ™ SYBR® Green Supermix 2x	12,5 µL
Primer ‘Sentido’ 10 µM	0,5 µL
Primer ‘Antisentido’ 10 µM	0,5 µL
cADN	1 µL
H ₂ O	hasta 25 µL

El programa de PCR empleado fue el siguiente:

- 2 ciclos a 94 °C de 30 segundos para calibrar la máquina con el ruido de fondo.
- 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 min
- 40 ciclos de:
 - 1 paso de desnaturalización a 94 °C durante 30 s
 - 1 paso de hibridación y extensión a 60 °C durante 30 s. Al final de este paso se toma la fluorescencia de cada pocillo.
- 1 ciclo de extensión 72 °C durante 3 min.
- 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto.
- 1 ciclo de anillamiento a 65 °C.
- Curva de fusión: 60 ciclos de 10 s, aumentando la temperatura en 0,5 °C cada ciclo, y el primero a 65 °C. En cada ciclo se toma la fluorescencia de la muestra.

Como control interno se utilizó el gen constitutivo *Ubiquitina* de olivo (Gomez-Jimenez et al., 2010) amplificado con forward-primer 5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3' y reverse-primer 5'-ACCACCACGAAGACGGAG-3'.

b) Determinación de la eficiencia de los primers

Para poder llevar a cabo el proceso de análisis de los datos obtenidos por QRT-PCR, es necesario saber la eficiencia de los primers empleados. Para ello lo que se hace es una QRT-PCR, en las que se ponen diferentes concentraciones de molde que se quiere amplificar, junto con la pareja de primers usada.

A continuación se hace una QRT-PCR de forma normal, y posteriormente se representa el logaritmo en base 10 (log) de la concentración, frente al C_t obtenido. Se calcula la eficiencia de los primers como: $\text{Eficiencia (\%)} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$. De aquí se deduce que una eficiencia del 100% corresponde a una pendiente de -3,32.

c) Análisis de los valores obtenidos por QRT-PCR

Para la cuantificación de los valores obtenidos por QRT-PCR se emplearon los valores de C_t . El valor de C_t (ciclo umbral) se midió en la fase exponencial de amplificación. Cada reacción se desarrolló por triplicado y, de este modo, el valor de C_t se tomó como el promedio de estas tres reacciones. Además se realizó el mismo análisis para tres ADNc diferentes procedentes de tres extracciones de ARN independientes. El valor de C_t para cada reacción de QRT-PCR se normalizó con el valor de C_t correspondiente al gen *Ubiquitina*. Además, la eficiencia de PCR se calculó para cada pareja de primers diferentes. Estos valores se emplearon para determinar los cambios de expresión de los diferentes genes analizados en las diferentes muestras estudiadas, según el método de Livak (Winer et al., 1999; Livak and Schmittgen, 2001).

La expresión usada es:

$$\text{Diferencia de expresión} = 2^{-\Delta(\Delta C_t)}$$

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen de interés}) - C_t (\text{gen constitutivo})$$

$$\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t (\text{muestra problema}) - \Delta C_t (\text{muestra control})$$

Esta expresión puede usarse si la diferencia en la eficiencia de los primers del gen constitutivo y el gen a analizar es inferior al 5%.

2.3.2.11. Análisis y representación de datos

a) *Secuenciación*

La identificación de las secuencias de los genes aislados en este trabajo se han realizado en el Servicio de Secuenciación de la compañía 'Sistemas Genómicos'. La reacción de secuenciación empleada para la determinación de las secuencias nucleotídicas se realizó usando el kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Las muestras a secuenciar contenían una cantidad de ADN plasmídico de 500 ng y se usaron diversos tipos de primers según la secuencia a analizar

b) *Fotografía*

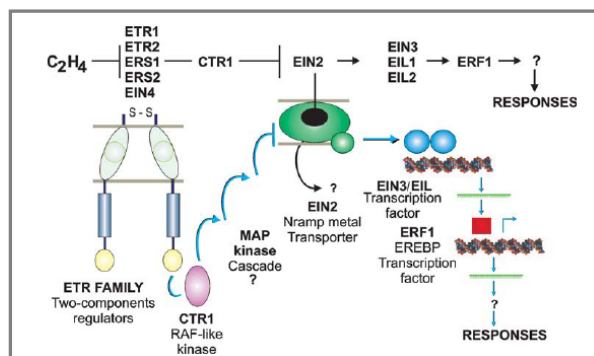
Los geles de agarosa se fotografiaron con la cámara digital DC290 de Kodak. Para la visión de los ácidos nucleicos se emplearon un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20).

c) *Análisis informático*

Se han usado diversos programas:

- La determinación de las secuencias de nucleótidos fue posible a través del uso de la aplicación *EditView* (ABIPRISM™, Perkin Elmer).
- Las bases de datos empleadas fueron: EMBL-EBI-PLANT, UNIPROT, PROCITE y PubMed.
- Para la identificación y comparación de secuencias se ha recurrido a los programas BLASTA y FASTA (Pearson y Lipman, 1998).
- Los árboles filogenéticos, los cuales ilustran la relación entre diferentes proteínas de distintas especies, se obtuvieron del alineamiento final usando el método CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) con el programa *Megalign* del ADN Star.

- El diseño de los oligonucleótidos se efectuó mediante el programa *Gene Runner*.
- Los análisis de proteínas (perfiles hidropáticos, composición de secuencias, tamaños moleculares, etc.) se realizaron mediante el programa *Protean*TM 4.00 del software del Macintosh ADN Star.



2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, para la realización de este trabajo se ha procedido a la recolección y muestreo de las flores y frutos. Los frutos de las dos variedades de olivo elegidas (“Picual” y “Arbequina”), por tratarse de dos variedades contrastadas desde el punto de vista de la velocidad de maduración, han sido recolectados desde la transición flor-fruto hasta la maduración del fruto. Se han recogido lotes de 250 a 300 frutos por distribución aleatoria de 10 árboles para cada variedad y a lo largo de 10 estadios diferentes de desarrollo (ver ‘Materiales y Métodos’).

2.4.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO, CONTENIDO DEL PRECURSOR DE SU SÍNTESIS (ÁCIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO, ACC) Y SU CONJUGADO (Malonil-ACC, MACC) DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL FRUTO EN EL OLIVO

Por una parte, se estudiaron las alteraciones de los contenidos de algunos intermediarios de la ruta de la síntesis del etileno (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, ACC y su conjugado Malonil-ACC, MACC) y la producción del mismo en los órganos reproductivos y por otra, se determinó la contribución del endocarpo y el mesocarpo al contenido del ACC/MACC del fruto durante los diferentes estados del crecimiento y maduración del mismo. Previos a estos resultados ha sido necesario llevar a cabo la caracterización del proceso de crecimiento y maduración que siguen los frutos en las dos variedades de olivo elegidas. Además, se ha puesto a punto la metodología necesaria, en particular, la referente a la

extracción y cuantificación de ACC libre/conjugado de tejidos reproductivos de olivo en términos de la descripción del metabolismo del etileno, y de su posible papel fisiológico.

2.4.1.1. Características del fruto de olivo en desarrollo

Se estudió en este trabajo la formación del fruto de las dos variedades de olivo elegidas (“Arbequina” y “Picual”) a través de 8 etapas de desarrollo (ver ‘Materiales y Métodos’, Fig. 2.10). Para una mejor comprensión fisiológica de los procesos del desarrollo del fruto hemos dividido el mismo en las cuatro fases clásicas: S1, S2, S3 y S4 (Fig. 2.14).

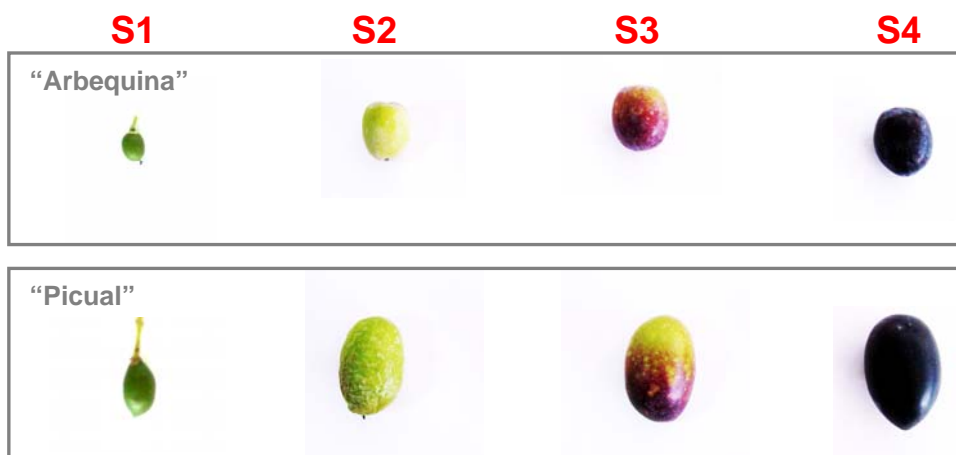


Fig. 2.14. Estadios del fruto de la variedad “Arbequina” y “Picual” de olivo.

Considerando que la fase S1 engloba los estadios 7, 14, y 28 días post antesis (DPA) dónde predominan los procesos de división celular y también elongación en la fase final, la S2 abarca los estadios 42 y 98 DPA (un desarrollo notable de la semilla sin crecimiento del mesocarpo y después elongación celular del mesocarpo), la S3 comprende 140-150 DPA (el fruto alcanza su máximo tamaño y comienza el cambio de color), y la S4 que engloba los estadios 200-250 DPA (maduración y adquisición del ablandamiento). Por su pequeño tamaño, los frutos correspondientes a los estadios 7, 14 y 28 DPA se han procesado enteros por su dificultad de dividirlos en mesocarpo y endocarpo. La flor abierta corresponde al estadio 0 DPA y la flor cerrada al -7 DPA del desarrollo del fruto (ver ‘Materiales y Métodos’, Fig. 2.11).

a) *Largo del fruto*

Estas medidas se tomaron sobre la línea de sutura del fruto. Como se observa en la Fig. 2.15, la variación de este parámetro de crecimiento adquiere una curva típica doble sigmoïdal en ambas variedades de olivo. Es decir, rápido crecimiento en las fases S1 y S3, y ralentización en las fases S2 y S4.

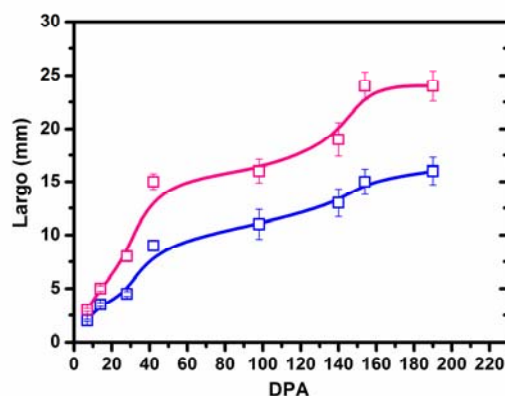


Fig. 2.15. Representación gráfica del crecimiento a lo largo del fruto de “Picual” (línea rosa) y “Arbequina” (línea azul). DPA: días post-antesis.

b) *Ancho del fruto*

El crecimiento a lo ancho se realizó midiendo de forma perpendicular a la sutura del fruto (Fig. 2.16). Este crecimiento, a diferencia del observado en la Fig. 2.16, tiene lugar de una manera más gradual y progresiva y es próximo a la linealidad.

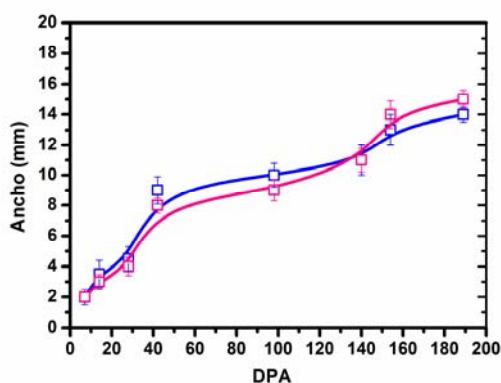


Fig. 2.16. Representación gráfica del crecimiento a lo ancho del fruto de “Picual” (línea rosa) y “Arbequina” (línea azul). DPA: días post-antesis.

c) Forma del fruto

En la Fig. 2.17 se representa la forma del fruto, expresada como la relación longitud/anchura del fruto de olivo "Picual" y "Arbequina". El fruto de la variedad "Arbequina" es de forma esférica y simétrica mientras que el de la variedad "Picual" es de forma ovoidal y asimétrica (Fig. 2.17).

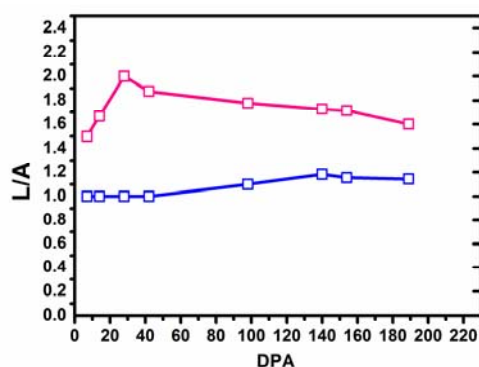


Fig. 2.17. Representación gráfica de la forma del fruto (relación longitud/anchura) de "Picual" (línea rosa) y "Arbequina" (línea azul). DPA: días post-antesis.

d) Peso del fruto

El PF (expresado por $\text{mg} \cdot \text{unidad}^{-1}$ de crecimiento) se determinó durante el desarrollo del fruto entero y endocarpo (semilla) (Fig. 2.18).

El peso del fruto incrementa lentamente en la fase S1, linealmente en S2 y S3 y tiende a disminuir en la fase S4 debido probablemente a la deshidratación de la semilla, la cual posee un crecimiento exponencial en las fases S1 y S3 muy parecido al observado en el fruto entero. El peso del fruto de la variedad "Picual" es 2 veces superior al de la variedad "Arbequina" (Fig. 2.18).

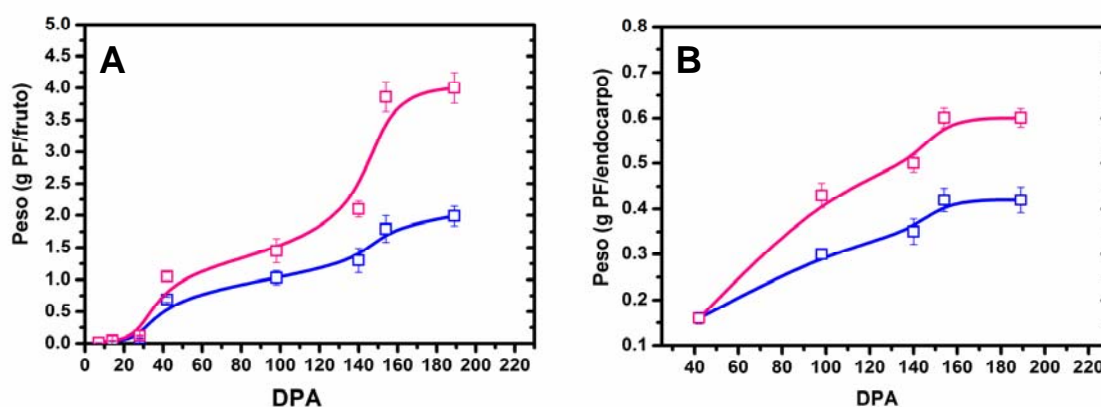


Fig. 2.18. (A) Variación del peso fresco (PF) del fruto y (B) variación del PF del endocarpo (semilla) durante el crecimiento del fruto de “Picual” (línea rosa) y “Arbequina” (línea azul). DPA: días post-antesis.

e) Firmeza del fruto

Debido al tamaño del fruto, la firmeza se ha determinado a partir del estadio 42 DPA. Con el fin de realizar una medición representativa se han estudiado 30 muestras para cada estadio. Los resultados aparecen en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Valores de firmeza ($N \cdot cm^{-3}$) del fruto de olivo a lo largo de su desarrollo. DPA: días post-antesis.

	42 DPA	98 DPA	140 DPA	150 DPA	217 DPA
“Arbequina”	1200±20	1170±10	930±60	840±10	590±40
“Picual”	1260±30	1150±40	830±20	510±30	155±20

Como era de esperar, la firmeza del fruto “Picual” comienza a descender en la fase S3 adquiriendo valores bajos en los días en que el fruto ha adquirido un importante ablandamiento debido al inicio de la maduración, por el contrario, valores intermedios son encontrados en la variedad “Arbequina” durante su maduración.

2.4.1.2. Metabolismo de etileno durante la floración, el desarrollo y maduración del fruto en olivo

a) *Contenido de ACC y MACC durante la floración y el desarrollo temprano del fruto en olivo*

Previo al estudio del papel del etileno durante el desarrollo del fruto y con el fin de conocer el contenido de ACC y su conjugado MACC durante el desarrollo floral se cuantificaron éstos en la flor cerrada y abierta (probablemente polinizada), recogidas en un intervalo de 7 días. La flor abierta corresponde al estadio 0 DPA del desarrollo del fruto. Como se indicó anteriormente, debido al tamaño del ovario recién fecundado, las determinaciones llevadas a cabo en este estudio durante el período entre -7 y 28 DPA se realizaron en el órgano entero (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Contenido de ACC (nmol ACC/g PF) y MACC (nmol MACC/g PF) durante el desarrollo temprano del fruto de olivo de “Arbequina” y “Picual” (flor cerrada -7, flor abierta 0, fruto 7, fruto 14 y fruto 28 DPA). Media de 3 experimentos \pm DE. DPA: días post-antesis.

		-7 DPA	0 DPA	7 DPA	14 DPA	28 DPA
“Arbequina”	ACC	14,14 \pm 1,0	11,78 \pm 0,9	16,49 \pm 2,3	14,14 \pm 2,5	37,7 \pm 0,9
	MACC	43,21 \pm 1,5	50,29 \pm 2,1	210,57 \pm 6,8	135,14 \pm 3,6	122,58 \pm 4,2
“Picual”	ACC	23,56 \pm 0,7	12,96 \pm 0,4	18,85 \pm 0,6	13,19 \pm 1,2	11,78 \pm 0,6
	MACC	32,22 \pm 1,3	56,18 \pm 1,2	84,85 \pm 2,8	74,8 \pm 3,7	66,79 \pm 1,9

En ambas variedades, la antesis floral coincidió con un descenso del contenido de ACC y un aumento del contenido de MACC, expresados en nmol/g peso fresco (PF). A los 7 DPA, vuelven a aumentar los niveles de ACC y MACC en el fruto de ambas variedades. Desde 7 a 28 DPA, los contenidos ACC y MACC varían en y entre las dos variedades de olivo. En la variedad “Picual”, los contenidos de ACC y MACC descienden aproximadamente un 38 y 21%, respectivamente; mientras que en la variedad “Arbequina” aumenta 2,2 veces el contenido de ACC y desciende el contenido de MACC en un 42% de 7 a 28 DPA.

La aceituna es una drupa, clasificada dentro del grupo de los frutos carnosos con hueso. Durante su desarrollo, la aceituna experimenta considerables cambios físicos y bioquímicos, con cinco fases distinguibles (Conde et al., 2008). La primera fase implica la fertilización y el cuajado del fruto, desde la floración hasta aproximadamente 30 días después, y se caracteriza por una rápida división celular que promueve el crecimiento del embrión (Conde et al., 2008). La duración y la intensidad de esta primera fase de división celular han sido relacionadas con el tamaño final del fruto (Rapoport y Manrique, 2004). En muchas especies, a menudo se han asociado QTLs (Quantitative Trait Loci) para el tamaño final del fruto con los procesos de división celular (Bertin et al., 2003; Quarrie et al., 2006). También, se atribuyeron diferencias en el tamaño del fruto entre tomate salvaje y tomate domesticado a discrepancias en la división celular (Kortstee et al., 2007). Las especies cultivadas de olivo presentan variación fenotípica significativa de tamaño y forma de fruto (por ejemplo, "Arbequina" tiene fruto pequeño y redondo mientras que "Picual" tiene fruto más grande y ovalado). Trabajos previos en nuestro grupo han mostrado que la causa principal de la diferencia de tamaño del fruto entre estas dos variedades es un número distinto de células en el pericarpo del fruto de olivo (Gómez-Jiménez et al., 2010), así como en genotipos de melón y de melocotón (Higashi et al., 1999; Yamaguchi et al., 2002). El distinto número de células en el pericarpo en las dos variedades ocurre durante la primera etapa división celular que varía según la variedad de olivo (M.C. Gómez-Jiménez y M.A. Paredes, datos no mostrados). "Arbequina" presenta un número de células menor en el pericarpo que "Picual" y cesa la división celular a los 28 DPA, mientras que las células del pericarpo de "Picual" continuaron dividiéndose hasta 28 DPA (M.C. Gómez-Jiménez y M.A. Paredes, datos no mostrados). En nuestro trabajo, la discrepancia más notable entre las variedades ocurrió a los 28 DPA, donde el contenido de ACC aumentó en el fruto de "Arbequina" y siguió disminuyendo en él de "Picual". Por consiguiente, el contenido de ACC parece correlacionarse negativamente con la división celular durante el desarrollo del fruto de olivo, disminuyendo en los tejidos en división y aumentando cuando ésta cesa.

b) Producción de etileno durante la maduración del fruto del olivo

La medida de la producción de etileno se efectuó en el fruto entero y en cada uno de los estadios del desarrollo del fruto de las variedades de olivo "Arbequina" y "Picual" (42, 98, 140, 150, 217 DPA). En la variedad de "Arbequina" la producción de etileno no fue detectada en los estadios de desarrollo y aumentó levemente durante la maduración (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Producción de etileno ($\text{nL} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$) durante el desarrollo del fruto de olivo de “Picual” y “Arbequina”. Los resultados son la media de 3 extracciones diferentes \pm DE. (ND: no detectado). DPA: días post-antesis.

	42 DPA	98 DPA	140 DPA	150 DPA	217 DPA
“Arbequina”	ND	ND	ND	$0,20 \pm 0,5$	$0,21 \pm 0,1$
“Picual”	ND	ND	ND	$1,93 \pm 0,6$	$2,72 \pm 0,8$

Teniendo en cuenta los resultados de la producción de etileno del fruto entero de “Picual” observamos que, al igual que en “Arbequina”, durante el crecimiento de éste no se detecta la producción de etileno (42, 98, 140 DPA) y a medida que el fruto inicia su maduración se activa la producción de etileno, alcanzándose, en el estadio 217 DPA, el nivel más elevado detectado en fruto maduro de “Picual”, 10 veces superior al encontrado en el fruto maduro de “Arbequina” (Tabla 2.7).

c) Contribución del endocarpo y el mesocarpo al contenido de ACC y MACC

Los resultados referentes a la cuantificación de ACC durante el desarrollo de la semilla aparecen en la Tabla 2.8. La cantidad de ACC, expresado en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ PF, alcanza el nivel más alto (103,4 y 196,2 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ PF en “Arbequina” y “Picual”, respectivamente) a los 98 DPA que se corresponde supuestamente con la lignificación del endocarpo, disminuyendo posteriormente y de forma gradual. El contenido de ACC detectado en el endocarpo fue siempre mayor en “Picual” que en “Arbequina”.

Tabla 2.8. Contenido de ACC (nmol ACC/g PF) y MACC (nmol MACC/g PF) en el endocarpo del fruto de olivo de “Arbequina” y “Picual” durante su desarrollo. Media de 3 experimentos \pm DE. DPA: días post-antesis.

		42 DPA	98 DPA	140 DPA	150 DPA	217 DPA
“Arbequina”	ACC	$16,17 \pm 1,4$	$103,4 \pm 4,9$	$58,3 \pm 2,3$	$23,86 \pm 1,5$	$21,21 \pm 1,9$
	MACC	$9,68 \pm 1,5$	$2,38 \pm 1,1$	$0,5 \pm 0,8$	$29,03 \pm 0,7$	$50,7 \pm 1,2$
“Picual”	ACC	$143,17 \pm 4,9$	$196,2 \pm 5,5$	$143,17 \pm 3,1$	$92,79 \pm 4,2$	$82,19 \pm 3,6$
	MACC	$162,43 \pm 3,3$	$38,88 \pm 3,6$	$28,33 \pm 2,9$	$1,24 \pm 2,6$	$47,1 \pm 1,8$

Por otra parte, el contenido de MACC en la semilla ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) (Tabla 2.8), a lo largo del desarrollo del fruto experimenta diferencias entre las dos variedades: “Arbequina” presenta un máximo en la última fase (fruto maduro) mientras ‘Picual’ presenta un notable máximo a 42 DPA dónde aún no se encuentra lignificado el endocarpo y otro durante la maduración 217 DPA.

En cuanto a los niveles de ACC y MACC en el mesocarpo se muestran en la Tabla 2.9. “Picual” es la única variedad en que existen niveles importantes de ACC en el mesocarpo del fruto ($34,4 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) o bien es la climatérica a 150 DPA (Tabla 2.9). Los últimos estadios del desarrollo del mesocarpo se caracterizan por un descenso importante en el contenido en ACC.

En el mesocarpo, el contenido de MACC ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) es muy variable a lo largo del desarrollo (Tabla 2.9). Se observa un incremento desde el inicio del desarrollo hasta los 42 DPA ($310,14 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) en “Arbequina” y hasta los 98 DPA ($129,73 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) en “Picual”; disminuyendo posteriormente el MACC hasta la maduración del fruto, 217 DPA, dónde vuelve a incrementar en ambas variedades. “Arbequina” es la variedad que más MACC acumula.

Tabla 2.9. Contenido de ACC (nmol ACC/g PF) y MACC (nmol MACC/g PF) en el mesocarpo del fruto de olivo de “Arbequina” y “Picual” durante su desarrollo. Media de 3 experimentos \pm DE. DPA: días post-antesis.

		42 DPA	98 DPA	140 DPA	150 DPA	217 DPA
“Arbequina”	ACC	$10,16 \pm 1,6$	$5,3 \pm 0,9$	$11,49 \pm 1,3$	$8,01 \pm 0,5$	$7,95 \pm 0,9$
	MACC	$310,14 \pm 7,3$	$299,73 \pm 6,1$	$168,35 \pm 4,8$	$180,15 \pm 5,5$	$214,36 \pm 7,2$
“Picual”	ACC	$9,7 \pm 0,8$	$4,42 \pm 1,1$	$15,03 \pm 1,3$	$34,4 \pm 2,2$	$12,0 \pm 0,7$
	MACC	$100,79 \pm 5,3$	$129,73 \pm 3,6$	$100,16 \pm 3,9$	$83,11 \pm 2,5$	$122,8 \pm 1,9$

Los datos recogidos acerca de la caracterización agronómica y fisiológica de las dos variedades elegidas de olivo corroboraron diferencias para el color externo, el peso, el tamaño, la forma, la firmeza, la velocidad de maduración, la producción de etileno y el contenido ACC/MACC del fruto. En la actualidad, la mayoría de las variedades de olivo caracterizadas muestran una típica maduración no climatérica. Por el contrario, los datos obtenidos en relación a la producción de etileno revelaron que en el momento de la maduración, los frutos de la variedad “Picual” producen 10 veces más etileno que los frutos de la variedad “Arbequina”. Esta diferencia en la producción de etileno entre las dos variedades, encontrada en este

trabajo, podría ser la causa de la diferente velocidad del proceso de maduración. Generalmente, se observan diferencias en el proceso de maduración entre distintas especies, siendo el olivo singular en el sentido de que estas diferencias ocurren dentro de la misma especie. En este contexto, el olivo podría ser considerada una especie modelo habida cuenta de la variabilidad que ofrece este proceso, solamente encontrada en algunas especies.

Por consiguiente, los datos obtenidos han reflejado las diferencias entre ambas variedades en relación a la producción de etileno, lo que sin duda, constituye un buen punto de partida para la caracterización hormonal de este proceso.

2.4.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS DE LA SÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL FRUTO EN OLIVO

Para comprender el posible papel del etileno durante el desarrollo floral y del fruto en olivo, hemos caracterizado y analizado la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno en tejidos reproductivos de olivo a diferentes estados de desarrollo.

2.4.2.1. Aislamiento, caracterización y expresión de cDNAs relacionados con la biosíntesis de etileno en tejidos reproductivos de olivo

En este apartado se muestran una serie de datos sobre las propiedades bioquímicas y moleculares de dos clones de cDNA directamente implicados en la biosíntesis de etileno: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa) y 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACC oxidasa).

a) Caracterización de clones de cDNA que codifican OeACO y OeACS

Con el fin de aislar cDNAs que codifican a la ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO) de *Olea europaea* se diseñaron oligonucleótidos degenerados correspondientes a regiones de aminoácidos conservadas de otras ACOs y ACSs de fruto descritas con anterioridad (ver 'Materiales y Métodos'). Los oligonucleótidos

sintetizados se utilizaron para amplificar el cDNA obtenido a partir de ARN total extraído del mesocarpo del fruto maduro de la variedad “Picual” de olivo.

Mediante RT-PCR se obtuvo un fragmento de 387 pb que una vez secuenciado y comparado con otras secuencias existentes en la base de datos se comprobó que se trataba de una secuencia correspondiente a una ACO. Este fragmento lo hemos denominado *OeACO* (HQ008853).

En la Fig. 2.19 se observa la secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de *OeACO*. Este clon de cDNA no codifica la proteína completa de la ACO de olivo, faltando un resto de aminoácidos en los extremos N- y C-terminal (Fig. 2.19).

1	CGC	GGA	TCC	GCA	TGT	CAG	AAA	TGG	GGT	TTC	TTT	GAG	CTG	GTG	AAT	45
1	R	G	S	A	C	Q	K	W	G	F	F	E	L	V	N	15
46	CAT	GGG	ATT	TCT	CCC	GAA	TTC	ATG	GAC	ACT	GTA	GAG	AGG	CTG	ACT	90
16	H	G	I	S	P	E	F	M	D	T	V	E	R	L	T	30
91	AAG	GAG	CAC	TAC	AGA	AAA	TGC	ATG	GAA	CAA	AGA	TTT	AGG	GAA	ATG	135
31	K	E	H	Y	R	K	C	M	E	Q	R	F	R	E	M	45
136	ATG	GCG	AGT	AAA	GGA	CTT	GAA	GCT	GTT	CAA	TCT	GAT	GTC	AAT	GAT	180
46	M	A	S	K	G	L	E	A	V	Q	S	D	V	N	D	60
181	TTA	GAC	TGG	GAA	AGT	ACC	TTT	TTC	CTC	CGC	CAT	CTT	CCG	GTT	TCA	225
61	L	D	W	E	S	T	F	F	L	R	H	L	P	V	S	75
226	AAC	ATA	GCA	GAA	GTC	CCT	GAT	CTT	GAA	GAT	GAA	TAC	AGG	AAG	ACT	270
76	N	I	A	E	V	P	D	L	E	D	E	Y	R	K	T	90
271	ATG	AAG	GAA	TTT	GCA	GCA	CAA	CTA	GAG	AAT	AAA	GAC	TTG	TAC	CCA	315
91	M	K	E	F	A	A	Q	L	E	N	K	D	L	Y	P	105
316	AAA	TTC	GTG	TTT	GAG	GAC	TAC	ATG	AAG	CTC	TAT	GCT	GGT	CTC	AAA	360
106	K	F	V	F	E	D	Y	M	K	L	Y	A	G	L	K	120
361	TTT	CAG	GCT	AAG	GAG	CCT	CTG	CAG	TTT						387	
121	F	Q	A	K	E	P	L	Q	F							

Fig. 2.19. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del clon *OeACO*.

El análisis del perfil hidropático (Kyte y Doolittle) de la proteína *OeACO* (Fig. 2.20) evidencia una gran predominancia de regiones hidrofílicas, indicativo del posible carácter soluble de la proteína.



Fig. 2.20. Perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon *OeACO*.

La secuencia que codifica *OeACO* es altamente conservada, presentando una alta identidad (77-83%) con las secuencias de ACOs de otras especies vegetales. En la Tabla 2.10 se muestra la identidad en % con otras secuencias de aminoácidos de ACOs conocidas. La ACO de olivo presenta la mayor homología con la ACO de *Orobancha ramosa* (83% de identidad).

Tabla 2.10. Homología (%) de la secuencia de aminoácidos de la ACO de olivo (*OeACO*) respecto a la de otras conocidas.

Nombre de la especie (n° accesión)	% Identidad aminoácidos <i>OeACO</i> (HQ008853)
<i>Orobancha ramosa</i> (AB219095)	83
<i>Plantago major</i> (AJ843131)	81
<i>Gossypium hirsutum</i> (DQ116442)	81
<i>Vitis vinifera</i> (AY211549)	80
<i>Prunus persica</i> (AF129074)	79
<i>Prunus domestica</i> (AJ890087)	78
<i>Ficus carica</i> (AB307720)	78
<i>Medicago sativa</i> (DQ512473)	78
<i>Pisum sativum</i> (AB128037)	77

A diferencia de otras ACOs (Balagué et al., 1993; Lasserre et al., 1996; Gómez-Jiménez et al., 1998; Fernández-Otero et al., 2006), en la secuencia proteica deducida de *OeACO* no se ha encontrado ningún posible sitio de de glicosilación (NIS) y no parece que en el entorno del extremo N-terminal exista una secuencia relacionada con el comportamiento del retículo endoplásmico. Es decir, el mecanismo por el que la ACO se moviliza intracelularmente y la localización subcelular es materia de amplio debate.

Existen autores que opinan que la ACO está relacionada con el plasmalema (Yang y Hoffman, 1984; Ramassamy et al., 1998); otros la ubican en ambientes extracelulares apoplásticos (Bouzayen et al., 1990) o en compartimentos intracelulares de carácter soluble (Ververidis y John, 1991). Rombaldi et al. (1994) demuestran que los anticuerpos de ACO están localizados en la pared celular en frutos en fase de maduración. Contrariamente, Reinhardt y cols. (1994) demuestran el carácter intracelular y soluble de esta proteína; resultados diametralmente opuestos a los de Peck y cols. (1992) que dicen haber demostrado para el mismo material (la ACO no tiene carácter soluble y está en la fracción particulada celular). Ramassamy et al. (1998), mediante métodos inmunocitoquímicos y el empleo de protoplastos, demuestran una localización de la ACO de manzana en la pared celular; y más concretamente unida a la cara externa del plasmalema. Sin embargo, actualmente todavía sigue existiendo controversia con respecto a la localización de la ACO: aunque la actividad bioquímica se recobró en la fase soluble de semillas de garbanzo, la enzima *Ca-ACO1*, que posee motivos transmembrana, se localizó en la pared celular (Gómez-Jiménez et al., 2001) y en melón, *Cm-ACO1* y *Cm-ACO3* parece que están asociadas a membrana, mientras que *Cm-ACO2* (la cual no posee la región hidrofóbica entre los aminoácidos 280 y 300) no lo está (Lasserre et al., 1996).

La ACO es la única entre todas las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato de plantas que requiere CO_2 como un activador esencial para su actividad (Smith y John, 1993), aunque también requiere ascorbato como cosustrato en lugar de 2-oxoglutarato (Prescott y John, 1996). Aunque no se conoce el mecanismo de estimulación de la actividad ACO por el CO_2 , se ha considerado como miembro de las enzimas que requieren CO_2 para su activación, entre las que la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es la más conocida.

En este caso, el CO_2 se une a un residuo de lisina formando un carbamato (Andrews y Lorimer, 1987). En el caso de la ACO, se ha sugerido que la activación por CO_2 puede estar implicada la formación del carbamato (Yang et al., 1993), y que solo una lisina está involucrada en esta activación (Ververidis y Dilley, 1994).

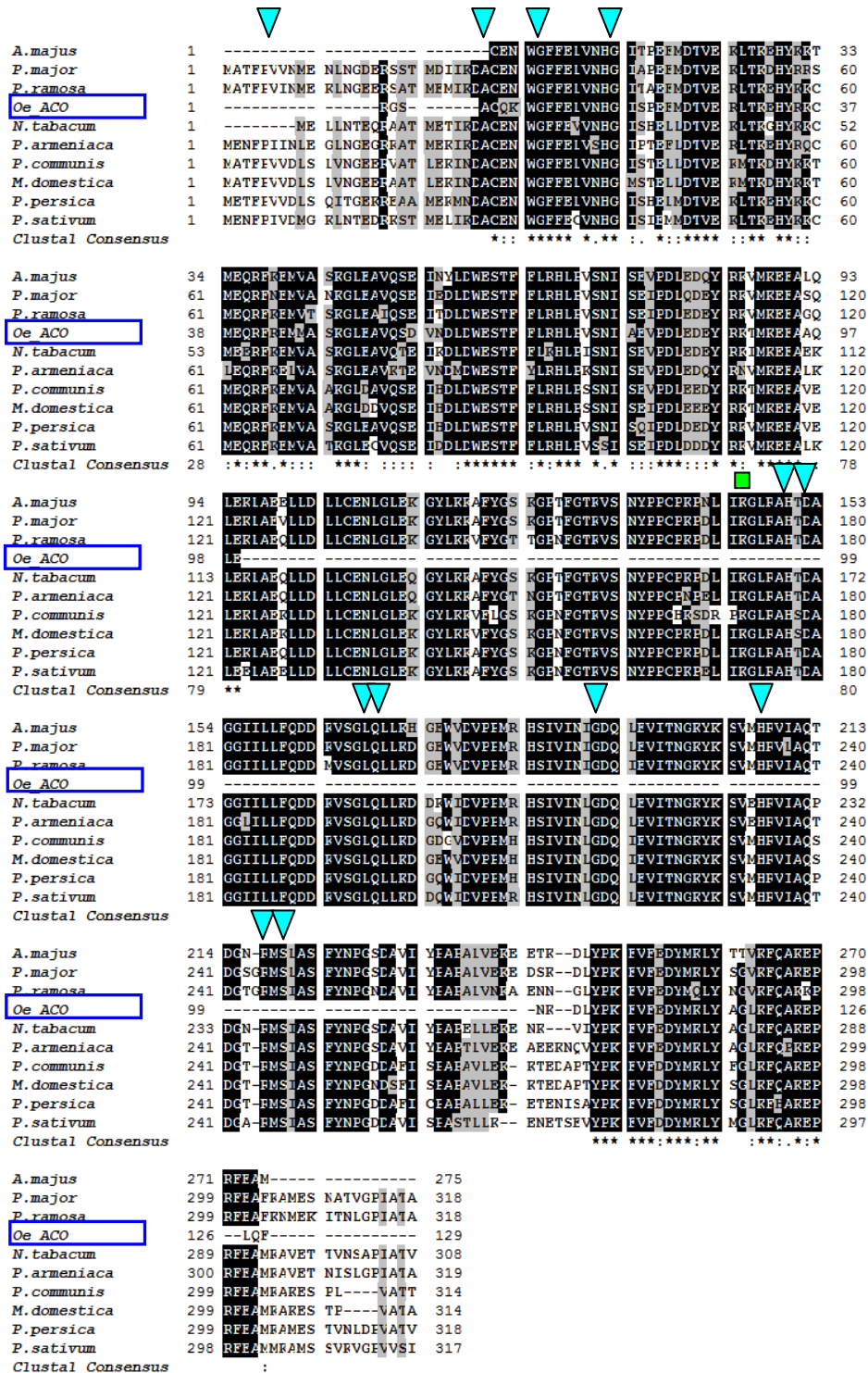


Fig. 2.21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de *OeACO* con otras secuencias de ACOs de plantas. Las secuencias usadas son: *Antirrhinum majus* (AY333926), *Plantago major* (AJ843131), *Phelipanche ramosa* (AB219095), *Olea europaea* (este trabajo, HQ008853), *Nicotina tabacum* (X83229), *Prunus armeniaca* (AF026793), *Pyrus communis* (AJ504857), *Malus domestica* (DQ137848), *Prunus persica* (AF129074) y *Pisum sativum* (M98357). Los aminoácidos idénticos y similares aparecen sombreados en negro y gris, respectivamente. Los aminoácidos conservados en la familia de enzimas que requieren Fe (II) se indican con triángulos.

Lay et al. (1996) observaron que de los 7 residuos de lisina que se conservan entre las secuencias ACOs publicadas, únicamente un residuo de lisina (cuadrado, Fig. 2.21) es exclusivo de las ACOs, no encontrándose en las secuencias de otras dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, pudiendo formar este residuo un carbamato en la activación por CO₂.

En todos los miembros de la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y que requieren Fe (II) para ser activas existen 12 residuos conservados (Imaseki, 1999). Estos 12 aminoácidos conservados se indican con flechas (Fig. 2.21) y corresponden a los restos: P5, A27, G32, H39, H177, D179, L195, Q196, G218, H234, R244 y S246. Cuando se procedió al análisis de la comparación de la secuencia que codifica *OeACO* con respecto a las ACOs de otras especies (Fig. 2.21), se pudo comprobar la existencia de 3 de estos 12 residuos (A27, G32 y H39).

El análisis filogenético fue realizado por comparación de los dominios conservados de las secuencias ACOs de nueve especies vegetales (Fig. 2.22).

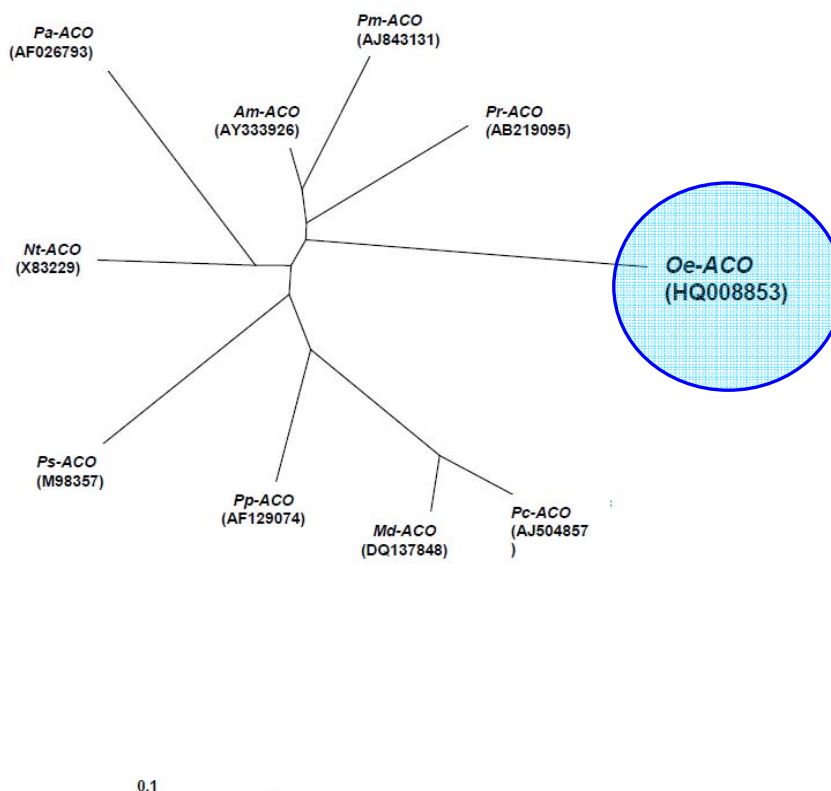


Fig. 2.22. Análisis filogenético de distintas ACOs descritas en plantas siguiendo el método CLUSTALW.

En relación con la ACC sintasa (ACS) en fruto de olivo se obtuvo mediante RT-PCR un fragmento cDNA de 444 bp usando cebadores degenerados correspondientes a regiones de aminoácidos de otras ACSs de plantas altamente conservadas, al que hemos denominado *OeACS* (Fig. 2.23).

El centro activo de la ACS ha sido identificado en todas las especies estudiadas (Kende, 1993). La secuencia de aminoácidos del centro activo de *OeACS* es 135-SLSKDLGLPGFR-146 (Fig. 2.23), similar al de otras ACS aisladas.

1	gct gat cct ggt gat gct ttg ctt att cca act cca tac tat cca	45
1	A D P G D A L L I P T P Y Y P	15
46	ggg ttt gat aga gac ttg agg tgg aga aca ggt gtt aag ata gtt	90
16	G F D R D L R W R T G V K I V	30
91	cca gtt cac tgt gat agt tct aat aat ttt gag atc act cct caa	135
31	P V H C D S S N N F E I T P Q	45
136	gct tta gaa gca gca tac aac gaa gct gaa tcc atg aac att aaa	180
46	A L E A A Y N E A E S M N I K	60
181	gtt aga gga gtt ctc ata aca aat cca tca aat cca ctt gga gcc	225
61	V R G V L I T N P S N P L G A	75
226	acc att aaa aga tct acc ctt gaa gag att ctt gaa ttc gtt acg	270
76	T I K R S T L E E I L E F V T	90
271	cgt aaa aac atc cat ctt gtt tct gat gaa atc tat tca gga tcg	315
91	R K N I H L V S D E I Y S G S	105
316	aca ttt tct ggc gac gaa ttt gta agc gtt gca gaa gtt ctt gaa	360
106	T F S G D E F V S V A E V L E	120
361	gct caa gac tac aaa gat tgt gaa aga gtt cac att gtt tat agc	405
121	A Q D Y K D C E R V H I V Y S	135
406	ctg tcg aaa gat tta ggt tta cca gga ttt agg gta atc	444
136	L S K D L G L P G F R V I	

Fig. 2.23. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del clon *OeACS* (HQ008854). La secuencia de aminoácidos correspondiente al centro activo de la ACS está destacada en color amarillo y sitios fosforilables están en color gris. Ocho de los once residuos de aminoácidos que son invariables entre las ACSs y las aminotransferasas se muestran en negrita.

La ACS es una enzima que contiene coenzima piridoxal 5'fosfato, y en tales enzimas se conoce la existencia de un residuo de lisina (K) en su centro activo (Hayashi et al., 1990) donde el grupo e-amino de la lisina forma la base de Schiff con el piridoxal 5'fosfato. En el centro activo de la ACS de olivo existe este residuo de lisina (K-138) responsable de la unión al piridoxal 5'fosfato y de la caracterización de la

reacción enzimática, como en las otras ACS (Yip et al., 1990). Además de un único sitio de unión al piridoxal fosfato que está presente en las aminotransferasas de tipo I, aparece en esta secuencia diversos sitios fosforilables por proteína kinasas dependientes de AMPc y cMPC y caseína kinasa II y lugares de miristilación (aminoácidos destacados en color gris, Fig. 2.23).

Al realizar el análisis del perfil de hidropatía (Kyte y Doolittle) de la proteína deducida del clon *OeACS* (Fig. 2.24) se observa la alternancia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, siendo estas últimas las que más predominan. Como otras ACS, quizás se trata de una proteína soluble en el citoplasma.

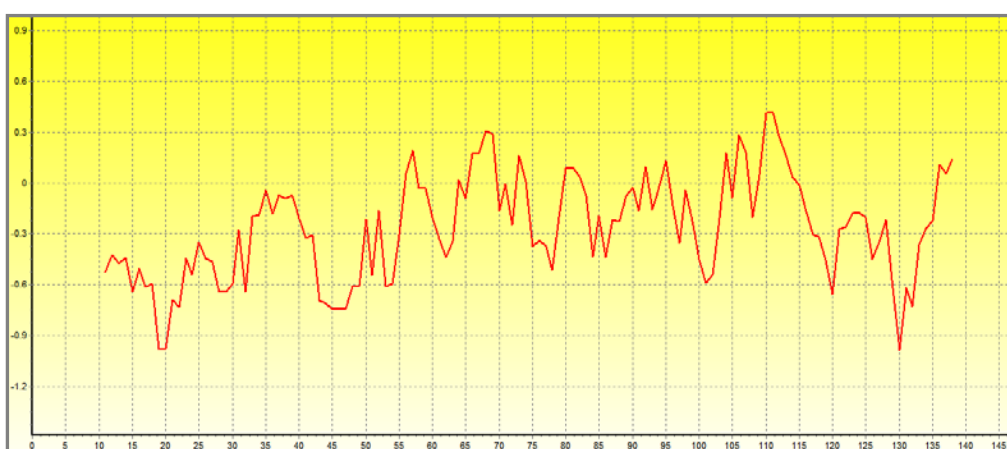


Fig. 2.24. Perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon *OeACS*.

La secuencia que codifica *OeACS* es altamente conservada, presentando una alta identidad (70-89 %) con las secuencias de ACSs de otras especies vegetales (Tabla 2.11). La ACS de olivo presenta la mayor homología con la ACS de *Antirrhinum majus* (90% de identidad).

Del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducida de *OeACS* con otras proteínas ACS se observa que presentan regiones altamente conservadas (Fig. 2.25). A pesar de la alta homología de las secuencias el extremo C-terminal de la ACS presenta una alta variabilidad en longitud y secuencia (Fig. 2.25). Sin embargo, a pesar de ser hipervariable (Theologis, 1992; Bradford, 2008), todos los dominios C-terminal presentan como característica común, su carga positiva. La mayoría de los residuos conservados en las isoformas de la familia ACS están localizados en la superficie del dímero y localizados cerca del sitio activo de la enzima.

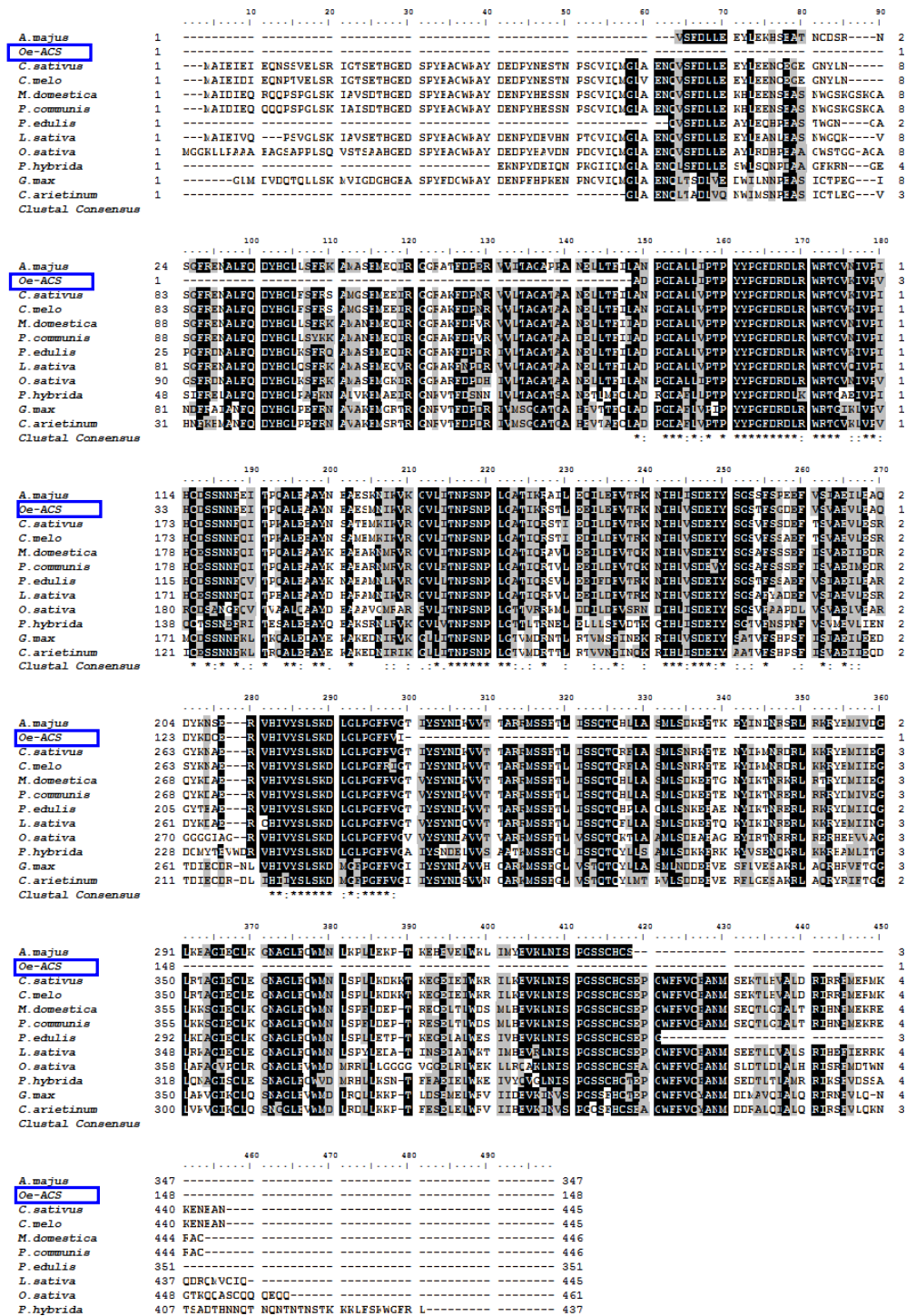


Fig. 2.25. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para *OeACS* con las secuencias de ACS de plantas. Las secuencias usadas son: *Antirrhinum majus* (AF083815), *Olea europaea* (este trabajo, HQ008854), *Cucumis sativus* (FJ971628), *Cucumis melo* (EU791280), *Malus domestica* (U73816), *Pyrus communis* (AY442145), *Passiflora edulis* (AB015494), *Lactuca sativa* (AF380837), *Oryza sativa* (X97066) y *Petunia x hybrida* (DQ090003). Los aminoácidos idénticos y similares aparecen sombreados en negro y gris, respectivamente.

Tabla 2.11. Homología (%) de la secuencia de aminoácidos de la ACS de olivo (*OeACS*) respecto a la de otras conocidas.

Nombre de la especie (n° accesión)	% Identidad aminoácidos OeACS (HQ008854)
<i>Antirrhinum majus</i> (AAC70352.2)	90
<i>Lactuca sativa</i> (AAP14020.1)	86
<i>Passiflora edulis</i> (BAA37134.1)	86
<i>Lupinus albus</i> (AAF22108.1)	85
<i>Cucumis sativus</i> (BAF79596.1)	86
<i>Cucumis melo</i> (ACG70850.1)	84
<i>Malus x domestica</i> (AAB67989.1)	83
<i>Solanum tuberosum</i> (CAA81749.1)	83
<i>Prunus domestica</i> (CAI64501.1)	83

En la Fig. 2.26 se muestra el análisis filogenético fue realizado por comparación de los dominios conservados de las secuencias ACSs de once especies vegetales.

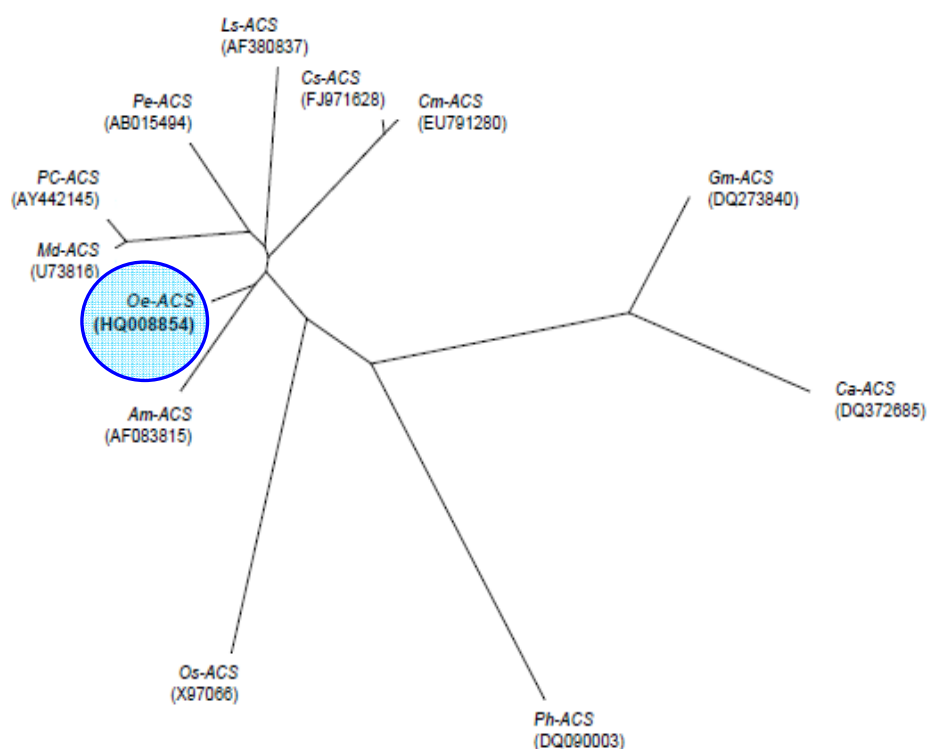


Fig. 2.26. Análisis filogenético de distintas ACSs descritas en plantas siguiendo el método CLUSTALW.

En especies donde se han caracterizado múltiples genes de ACS, cada gen parece tener un modo único de regulación transcripcional y/o post-traducciona (Wang et al., 2002). Asimismo, se ha demostrado también bajos % de identidad entre los miembros de la familia de genes ACS de la misma especie en *Arabidopsis* (Liang et al., 1992). Por consiguiente, el análisis de este fenómeno sugiere que el polimorfismo entre las diferentes genes de una familia debe haber ocurrido evolutivamente antes de la separación entre mono y dicotiledoneas (Pech y otros. 2004), puesto que los genes correspondientes a la ACS son más similares entre diferentes especies que entre los miembros de la misma especie (Liang et al., 1992).

b) Análisis de la expresión génica de OeACO y OeACS durante el desarrollo floral y temprano del fruto

Aunque el papel regulador del etileno en la senescencia floral haya sido bien documentado en muchas plantas, como orquídea (Bui y O Neill, 1998), petunia (Tang et al., 1994, 1996), clavel (Jones y Woodson, 1997, 1999), tomate (Llop-Tous et al., 2000), y tabaco (Roeder et al., 2009) poco se conoce sobre el mecanismo molecular por el que el etileno regula la apertura de la flor y el desarrollo temprano del fruto. En este trabajo, se realiza un estudio detallado sobre la expresión temporal de los genes de *OeACO* y *OeACS* durante el desarrollo de la flor y fruto en olivo. Debido al tamaño del pistilo fecundado durante los tres primeros estadios de desarrollo temprano estudiados (7, 14, 28 días post-antesis DPA), no ha sido posible realizar la separación en endocarpo (semilla) y mesocarpo (pulpa). Por consiguiente, el análisis de expresión referente a estos estadios se ha llevado a cabo con el ARN total extraído del órgano entero.

Los patrones de expresión de los genes *OeACO* y *OeACS* han demostrado que la expresión se incrementó diferencialmente durante la apertura floral y el desarrollo temprano del fruto. Como se observa en la Fig. 2.27, la expresión de ambos genes *OeACO* y *OeACS* se inducen coincidiendo con la antesis floral en ambas variedades, probablemente como consecuencia de la polinización. En el caso de la flor abierta de "Arbequina" los cambios fueron más pronunciados que en la de "Picual", detectándose un aumento de 8 y 3 veces superior en mRNA de *OeACO* y *OeACS*, respectivamente (Fig. 2.27) en la transición de flor cerrada (-7 DPA) a abierta (0 DPA) de "Arbequina".

Inmediatamente después de la antesis, se produce un importante descenso transcripcional del gen *OeACO* y *OeACS* junto con el inicio de la división celular en el fruto de ambas variedades (Fig. 2.27).

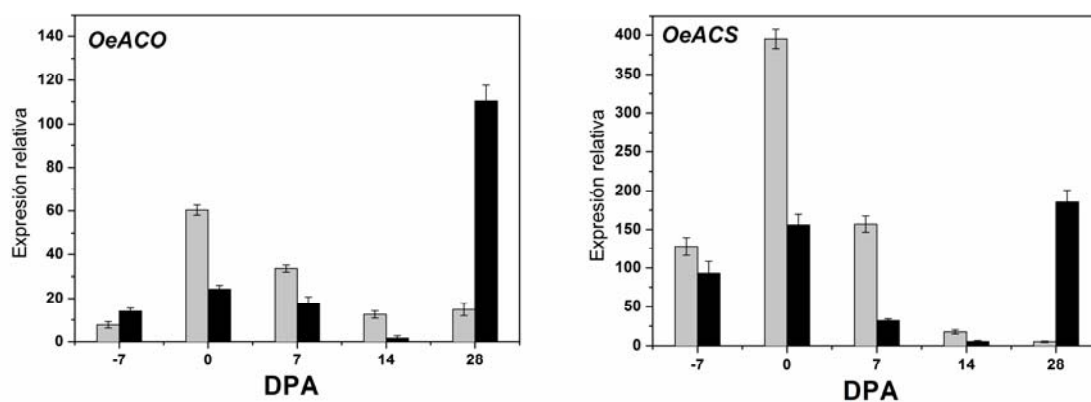


Fig. 2.27. Análisis de la expresión de los genes *OeACO* y *OeACS* mediante QRT-PCR durante el desarrollo temprano del fruto de olivo. RNAs totales son aislados de flores (-7 DPA, flor cerrada, and 0 DPA, flor en antesis) y frutos (7, 14 and 28 DPA) de la variedad "Arbequina" (barra gris) y "Picual" (barra negra). Los niveles de expresión están normalizados a la expresión del gen *O. europaea Ubiquitina* (control interno). Los datos están relativizados al nivel de expresión más bajo que se le ha dado el valor de 1. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE. DPA: días post-antesis.

En plantas ornamentales, estudios previos han mostrado que el etileno influye en la apertura floral (Reid et al., 1989; Yamamoto et al., 1994), polinización (O'Neill et al., 1993; Bui and O'Neill, 1998; Dervinis et al., 2000), senescencia (Shibuya et al., 2000; Nukui et al., 2004) y abscisión de los pétalos (Kuroda et al., 2003, 2004).

El proceso de polinización provoca e inicia el desarrollo del fruto y la senescencia de los órganos florales. En muchas flores, la polinización desencadena la estimulación de la producción de etileno en el estigma y posteriormente en el pistilo y los pétalos (Jones y Woodson, 1997; Bui y O'Neill, 1998; Dervinis et al., 2000; Llop-Tous y cols., 2000; Klee y Clark, 2004). Los resultados de Llop-Tous et al. (2000) indican que la síntesis de etileno en el pistilo de tomate se detecta a las 4 h de producirse la polinización, alcanza un máximo a las 6 h y disminuye pasadas las 12 h. Esta producción de etileno es medible una vez que el grano de polen ha germinado y el tubo polínico ha recorrido la cuarta parte de la longitud del estilo. Contrariamente, otros trabajos previos demuestran que el etileno se produce antes del proceso germinativo o al mismo tiempo (Larsen et al., 1995; Tang y Woodson, 1996). Sin embargo, aunque no se conoce en profundidad el papel que desempeña el etileno durante el desarrollo de la flor, parece fuera de toda duda que la polinización, además de inducir la síntesis de gas, también provoca alteraciones en la expresión génica de la ACS y ACO (Jones y Woodson, 1997; Bui y O'Neill, 1998; Llop-Tous et al., 2000; Klee y Clark, 2004). Por otra parte, la producción de etileno y la sensibilidad al mismo varía

sustancialmente tanto a nivel temporal como espacial dependiendo del tipo de flor: Lo que sí parece claro es que todas las flores que tienen la capacidad de sintetizar etileno también tienen la capacidad de responder al mismo. Muchas flores sintetizan niveles basales de etileno (*Sistema I*) y luego se desencadena la síntesis autocatalítica del mismo (*Sistema II*) (Klee y Clark, 2004).

En este trabajo se caracteriza un miembro de la familia multigénica de ACO (*OeACO*) y otro de la ACS (*OeACS*). Los genes *OeACO* y *OeACS* se expresan tanto en flores cerradas como abiertas, aunque en este último estadio con mucha mayor intensidad. Es decir, la expresión de ambos genes es inducida con la antesis en la flor de olivo. Estos resultados encontrados son similares a los observados en otras especies (Bui y O'Neill, 1998; Jones, 2003; Fernandez-Otero et al., 2006), donde la apertura floral está asociada con la regulación transcripcional de los genes ACS y ACO.

El etileno puede sustituir al proceso de la polinización en tanto en cuanto su presencia provoca el inicio de la senescencia y abscisión de la corola. Este etileno desencadena la síntesis autocatalítica del mismo y la aparición de los procesos posteriores a la polinización (O'Neill y cols., 1993; Bui y O'Neill, 1998; Klee y Clark, 2004).

En algunas especies, los genes de la biosíntesis de etileno se expresan diferencialmente en distintas partes de la flor. Con respecto a la ACS, existen sistemas modelo, en los cuales la polinización induce la expresión de otras ACS, como las *ACS2*, en las diferentes partes del pistilo (Clark et al., 1997). Sin embargo, el mRNA *Le-ACS2* de tomate se acumula en anteras maduras y senescentes y también en los pétalos totalmente senescentes. Pero no se detecta transcripción alguna en el pistilo (Rottmann et al., 1991). En flores de orquídeas se ha descrito la expresión de al menos tres miembros de la familia ACS relacionada con el proceso de polinización (Bui y O'Neill, 1998). Mientras que el gen *Phal-ACS1* está regulado por etileno y es el único que participa en la ampliación y transmisión de la señal de polinización, *Phal-ACS2* y *Phal-ACS3* son inducidos por auxinas las cuales simulan el proceso de polinización en orquídeas. En flores de tomate, la regulación de *Le-ACS1*, *Le-ACS2* y *Le-ACS3* es dependiente de etileno, mientras que *Le-ACS4* es independiente. La polinización produce el incremento de la expresión de *Le-ACS1* y *Le-ACS3*; por el contrario, *Le-ACS2* y *Le-ACS4* disminuyen con la misma (Llop-Tous et al., 2000). En rosas, se ha demostrado que el etileno está implicado en la regulación de la apertura de flor (Reid et al., 1989) y que el tratamiento con etileno induce la expresión de la *Rh-ACS3* en pétalos (Ma et al., 2005), mientras que 1-MCP no fue capaz de suprimir la producción del etileno o la expresión *Rh-ACS3* en pétalos, aunque si fue capaz de impedir la apertura completa la flor eficazmente (Ma et al.,

2006). Por lo tanto, no parece existir un feedback positivo en la biosíntesis de etileno inducida por etileno en pétalos de rosa.

Con respecto a la ACO, en flores de tomate, la expresión de *Le-ACO1* y *Le-ACO3* se estimulan con la polinización, mientras que *Le-ACO2* y *Le-ACO3* disminuyeron y las alteraciones en la expresión de *Le-ACO1*, *Le-ACO2* y *Le-ACO3* son dependientes de etileno después de la polinización (Llop-Tous et al., 2000). En flores de petunia, *Ph-ACO3* y *Ph-ACO4* están relacionadas con el desarrollo del pistilo mientras que *Ph-ACO1* se han localizado en corolas en estado senescente (Tang et al., 1993). En la otra planta modelo *Cucumis melo*, *Cm-ACO1* se induce durante la maduración y *Cm-ACO3* es el único gen que tiene altos niveles de expresión en flores, mientras que *Cm-ACO1* apenas se detecta y *Cm-ACO2* está ausente (Lasserre et al., 1996).

Determinadas hormonas vegetales desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del fruto, desde la fructificación hasta la maduración. De hecho, se asume que las fitohormonas sintetizadas por las semillas, ya desde la fertilización y durante su desarrollo, son responsables tanto del inicio del desarrollo del fruto como de su crecimiento y maduración. Numerosas observaciones apoyan esta hipótesis: las semillas en desarrollo sintetizan hormonas (Talón et al., 1990; García-Martínez et al., 1991; Ben-Cheikh et al., 1997; Rodrigo et al., 1997), la aplicación exógena de hormonas (García-Martínez y Carbonell, 1980; Alabadí et al., 1996, Vivian-Smith y Koltunow, 1999) o de inhibidores de síntesis o transporte de hormonas (Robinson et al., 1971; Beyer y Quebedeaux, 1974) permiten inducir partenocarpia en distintas especies. Por lo que a la síntesis de etileno se refiere, las semillas son muy activas durante las primeras fases del desarrollo (Matilla et al., 2000). El etileno producido en la fase temprana (S1) del desarrollo del fruto probablemente está directamente implicado en la gran actividad mitótica que tiene lugar en este período inicial del crecimiento y posterior lignificación del endocarpo.

En frutos enteros de olivo, la expresión de *OeACO* y *OeACS* es inducida a los 28 DPA en la variedad "Picual", lo que podría implicar a ambos genes en la síntesis de etileno de la semilla en ese momento. El hecho de que la actividad transcripcional detectada de *OeACO* y *OeACS* en fruto entero a los 28 DPA desaparezca en el mesocarpo un estadio más tarde del desarrollo (42 DPA, Fig. 2.28), refuerza la posibilidad de que haya una contribución importante del endocarpo en la expresión de estos genes en la fase S1 del desarrollo del fruto de olivo. Es decir, la semilla parece tener una colaboración muy notable en la síntesis de etileno en las fases S1 y S2. En apoyo de esto, no se ha podido cuantificar actividad transcripcional *OeACO* y *OeACS* en el mesocarpo entre los días 42 a 98 DPA (Fig. 2.28). Encontrando

que el momento de la inducción de esta actividad transcripcional *OeACO* y *OeACS* en el endocarpo, atribuida al crecimiento activo de la semilla, podría variar en las dos variedades de olivo, probablemente sea anterior en la variedad “Picual” que en “Arbequina”.

Asimismo, un hecho significativo es el descenso de expresión del gen *OeACO* y *OeACS* en el fruto de “Arbequina” a los 28 DPA donde más contenido de ACC hay, y aumento de expresión de la *OeACO* y *OeACS* en el fruto de Picual a los 28 DPA (Fig. 2.27), coincidiendo con un descenso de ACC (Tabla 2.6). Esto podría indicar que otros genes que codifican la misma actividad enzimática ACS pueden ser responsables de la síntesis de ACC en este órgano a 28 DPA de “Arbequina”, que hay menor “consumo” del ACC por lo que la síntesis es inferior, que hay más disponibilidad de precursores por lo que el flujo metabólico de su síntesis requiere menos enzima o que existe una hidrólisis desde el MACC, y por tanto requiere menos síntesis de novo.

*c) Análisis de la expresión génica de *OeACO* y *OeACS* durante la maduración del fruto*

Como se ha mostrado anteriormente, durante el proceso de maduración del fruto de la variedad “Picual” de olivo ocurre un incremento en la producción de etileno (Tabla 2.7) y el contenido de ACC (Tabla 2.9). Por tanto, se procedió a estudiar mediante QRT-PCR la expresión de los genes de biosíntesis de etileno durante los diferentes estados de desarrollo y maduración de olivo previamente descritos (Fig. 2.28). El objetivo era conocer si la expresión de alguno de estos genes se correlaciona con la producción de etileno y el contenido de ACC.

Cuando se realizaron los estudios de QRT-PCR para analizar la expresión del gen *OeACO* en el fruto de “Arbequina” y “Picual”, se observó que la expresión de *OeACO* aumenta con la maduración solamente en el caso de “Picual”, la variedad que produce más etileno, observándose una expresión muy baja en fruto verde hasta alcanzar su máxima expresión en fruto maduro, coincidiendo con el mayor contenido de ACC del fruto a lo largo de todo el desarrollo del fruto (Fig. 2.28). Además, si se considera el nivel de expresión del gen *OeACO* en “Arbequina” y “Picual”, es concebible pensar que sea la causa en parte de la diferencia de producción de etileno observada entre las dos variedades. En “Picual”, la expresión del gen *OeACO* es probablemente asociada con el etileno de la maduración. El fruto de “Picual” muestra un fuerte incremento en el nivel de expresión de *OeACO* asociado con la maduración del fruto (217 DPA), cuando las dos variedades son comparadas (Fig. 2.28) y su nivel evoluciona con la producción de etileno. Estos resultados sugieren una implicación del etileno en la regulación del gen *OeACO*.

En el caso de “Arbequina”, no se observó variación significativa en la expresión *OeACO* a lo largo del desarrollo. Sin embargo, la expresión del gen *OeACS* aumenta durante la maduración del fruto en ambas variedades (Fig. 2.28), siendo más pronunciado en el caso de “Picual” y coincidiendo con el mayor contenido de ACC y MACC (Tabla 2.9) en el fruto de “Picual” y “Arbequina”, respectivamente.

El perfil de expresión del gen *OeACS* es similar a la producción de etileno en las dos variedades (Fig. 2.28). Además, cuando se compara la evolución cuantitativa del ARNm *OeACS* en “Arbequina” y “Picual”, se observa una correlación entre la expresión del gen *OeACS* y la diferencia de etileno emitido por las dos variedades. Se observa una diferencia significativa en el estadio de maduración (217 DPA), donde la expresión del gen *OeACS* en “Picual” es 4 veces superior al de “Arbequina”. Estos resultados sugieren una implicación del etileno en la regulación del gen *OeACS*. Sin embargo, en “Picual”, el gen *OeACS* se expresa antes de que se detecten las primeras trazas de etileno. Por lo tanto, es posible que la inducción del gen *OeACS* sea el resultado de una sensibilidad tisular a muy escasas dosis de etileno endógeno presentes en este estadio anterior, que la baja sensibilidad del cromatografo no permite detectar o que la expresión del gen *OeACS* sea regulada tanto por el etileno como también por factores del desarrollo durante la maduración del fruto en “Picual”. La coexistencia de dos factores en la regulación del gen *OeACS* es igualmente posible en la medida donde estos factores no son mutuamente excluyentes.

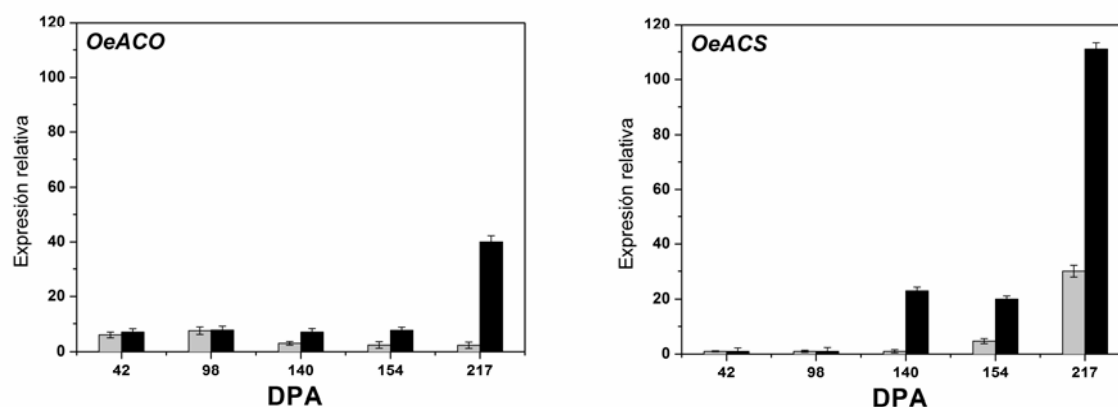


Fig. 2.28. Análisis de la expresión de los genes *OeACO* y *OeACS* mediante QRT-PCR durante el desarrollo y maduración del fruto de olivo. RNAs totales son aislados de mesocarpos de frutos (42, 98, 140, 154 y 217 DPA) de la variedad “Arbequina” (barra gris) y “Picual” (barra negra). Los niveles de expresión están normalizados a la expresión del gen *O. europaea Ubiquitina* (control interno). Los datos están relativizados al nivel de expresión más bajo que se le ha dado el valor de 1. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE. DPA: días post-antesis.

La presencia en el mesocarpo de olivo de la variedad "Picual" de transcritos de *OeACO* y *OeACS* en la fase final del desarrollo puede ser debido a una implicación del etileno en la síntesis de componentes metabólicos relacionados con el inicio de la maduración. No obstante, dada la poca información sobre este aspecto, es preciso una investigación más detallada y sistematizada al respecto para saber si existe una relación entre el etileno y otras rutas de señalización durante la maduración del fruto (Alba et al., 2000).

En frutos verdes de tomate se detectó un nivel basal de transcritos correspondiente al gen *Le-ACO1*; sin embargo, el nivel de los mismos aumentó de forma considerable cuando el fruto comenzó a madurar y, del mismo modo que sucede en el fruto de "Picual" respecto a *OeACO* (Alexander y Grierson, 2002). En flores y frutos de melón en estado de maduración los genes *Cm-ACO1* y *Cm-ACO3* se expresan diferencialmente en ambos órganos (Lelievre et al., 1997; Pech et al., 2008). Una vez estudiado el nivel de mRNA correspondiente a *OeACO* durante el desarrollo del fruto de olivo se observa que es muy coincidente con la producción de etileno, lo que parece sugerir una regulación génica a nivel de transcripción. A idénticas conclusiones han llegado otros grupos de investigación con respecto a frutos de melón (Lasserre et al., 1996), garbanzo (Gomez-Jimenez et al., 1998; Gomez-Jimenez y Matilla, 2006), kiwi (Xu et al., 1998), melocotón (Rupert et al., 2001), y banana (Choudhury et al., 2008), entre otros.

Las diferencias marcadas de expresión entre dos variedades de olivo sugieren que los dos genotipos estudiados puedan diferenciar no sólo en la producción de etileno y en sus niveles de ACC/MACC, sino también sugiere un diferente papel de la *OeACS* en estas variedades. En este sentido, hemos encontrado que el contenido de ACC en el mesocarpo del fruto de olivo depende de la actividad transcripcional de *OeACS* en ambas variedades, llevando a un aumento en la producción de etileno en "Picual" y a una acumulación del conjugado MACC en "Arbequina".

En resumen, la expresión de los genes *OeACO* y *OeACS* no es constitutiva y que el control de su transcripción participa en la regulación de los niveles de ACC y producción de etileno durante los procesos estudiados. Sin embargo, son precisos estudios más detallados del nivel de regulación así como la elección de estrategias experimentales para llevar a cabo los mismos. Esto último es el abordaje actual de nuestro grupo de investigación.

2.4.2.2. Aislamiento, caracterización y expresión de cDNA relacionados con la señalización de etileno en tejidos reproductivos de olivo

Se ha estudiado la implicación del etileno en los procesos de polinización y desarrollo del fruto principalmente a nivel de los genes de señalización ERS, ETR y CTR (Ma et al., 2006; Yin et al., 2008) y la regulación de la función EIL aún sigue siendo desconocida. En este estudio, se investigó la regulación transcripcional de ERS, CTR, EIL durante la apertura floral y el desarrollo del fruto en olivo, con el objetivo de identificar los componentes genéticos dominantes cuya expresión contribuye a la regulación de estos procesos.

a) Caracterización de clones de cDNA que codifican OeERS1, OeCTR1 y OeEIL

Para aislar cDNAs que codifican al receptor ERS1, a la kinasa CTR1 y al factor de transcripción EIN3 de *Olea europaea* se diseñaron oligonucleótidos degenerados correspondientes a regiones de aminoácidos conservadas de otras ERS1, CTR1, y EIN3/EIL de plantas descritas con anterioridad. Los oligonucleótidos sintetizados se utilizaron para amplificar el cDNA obtenido a partir de ARN total extraído del mesocarpo del fruto maduro de la variedad "Picual" de olivo.

Utilizando cebadores degenerados, ERS-Fw y ERS-Rv, se ha amplificado un fragmento de cDNA de 121 pb. Este clon de cDNA, al que hemos llamado *OeERS* (HQ008857), no codifica la proteína completa de la ERS1 de olivo, faltando un resto de aminoácidos en los extremos C- y N-terminal.

El análisis filogenético fue realizado por comparación de los dominios conservados de secuencias de ERS1 de varias especies (Fig. 2.29).

Mediante los cebadores degenerados CTR-Fw y CTR-Rv se ha amplificado un fragmento de cDNA de 651 pb. Para la obtención del extremo 5' de la CTR1 se utilizó la técnica 5'RACE, obteniendo un fragmento de ADN de 355 pb. Mediante esta reacción 5'RACE no ha sido posible conseguir el extremo 5' completo posiblemente como consecuencia de la poca abundancia del ARNm de la CTR en la preparación de ARN Poly(A)*.

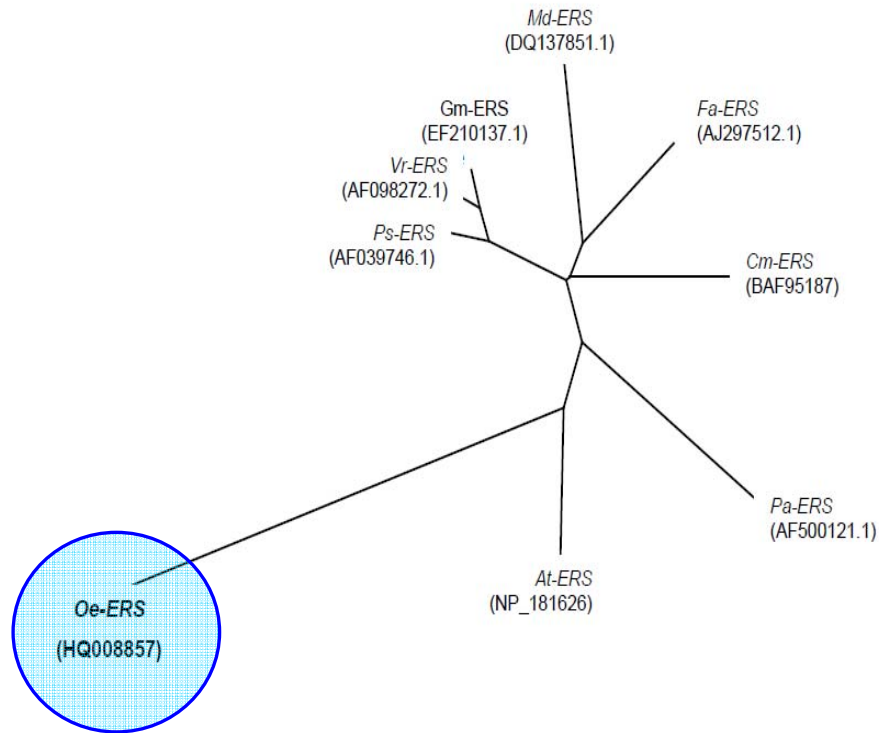


Fig. 2.29. Análisis filogenético de distintas ERS1 descritas en plantas siguiendo el método CLUSTALW.

Este clon de cDNA, al que hemos llamado *OeCTR*, no codifica la proteína completa de la CTR de olivo, faltando un resto de aminoácidos en el extremo N-terminal. El clon *OeCTR* presenta una longitud de 978 pb (HQ008855) y codifica a 326 aminoácidos (Fig. 2.30).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *OeCTR* con otras proteínas CTR1 es mostrado en la Fig. 2.31.

1	AAA GAA CCA TCA GTT TTG GAC CCA TCT AAT CCT CAT AAT ATT TTT	45
1	K E P S V L D P S N P H N I F	15
46	AGC TCC ACA GAT GTG ACC AAT GAT TTG ATC CCT GTA AAG CAT ATT	90
16	S S T D V T N D L I P V K H I	30
91	CCT CCA ACC AGA CAC AAA GAC AAC CTA TTG GAT CCA AGA CTA AAA	135
31	P P T R H K D N L L D P R L K	45
136	ACA AAT GAA GAT TTG AGC TTT GTT GGA GGA GTT CAA CTG GCT CCA	180
46	T N E D L S F V G G V Q L A P	60
181	TCG AAA ACA AGT GAA CTT GCA ATT GAT GTT GCA GAT TTC AGG ATT	225
61	S K T S E L A I D V A D F R I	75
226	CCC TGG AGT GAT CTT GTT ATA AAG AAG AGA ATT GGG GCA GGT TCA	270
76	P W S D L V I K K R I G A G S	90
271	TTT GGT ACG GTC CAC CAT GCT GAG TGG AAT GGT TGT GAT GTT GCT	315
91	F G T V H H A E W N G C D V A	105
316	GTG AAG ATT CTC ATG GAG CAG GAT TTT CAT GCT GAG CAA TAC AAG	360
106	V K I L M E Q D F H A E Q Y K	120
361	GAA TTT TTA CGG GAG GTG GCA ATT ATG AAA CGC TTG CGC CAT CCC	405
121	E F L R E V A I M K R L R H P	135
406	AAT ATT GTA CTT TTT ATG GGT GCT GTA ACA GAG CCG CCA AAC TTG	450
136	N I V L F M G A V T E P P N L	150
451	TCC ATA GTC ACA GAA TAT TTA TTA CGA GGT AGT TTG TAT AGA CTC	495
151	S I V T E Y L L R G S L Y R L	165
496	TTA CGT AGA CCT GAT GCA AGA GAA GTG CTG GAC GAG AGG CGT CGG	540
166	L R R P D A R E V L D E R R R	180
541	TTG TGC ATG GCT TAT GAT GTT GTG AAG GGG ATG AGC TAC CTT CAT	585
181	L C M A Y D V V K G M S Y L H	195
586	AAA CAC AAT CCT CCC ATT GTT CAT CGG GAC TTG AAA TCT CCT AAT	630
196	K H N P P I V H R D L K S P N	210
631	CTT TTA GTT GAT AAA AAG TAT ACA GTG AAG GTC TGT GAT TTT GGT	675
211	L L V D K K Y T V K V C D F G	225
676	CTT TCT CGT TTA AAA GCA AAC ACA TTT CTT TCA TCA AAG TCA GCT	720
226	L S R L K A N T F L S S K S A	240
721	GCT GGA ACT CCG GAG TGG ATG GCA CCC GAA GTT CTC CGT GAT GAA	765
241	A G T P E W M A P E V L R D E	255
766	CCA TCA AAT GAA AAA TCA GAT GTA TAC AGC TTT GGT GTG ATT TTG	810
256	P S N E K S D V Y S F G V I L	270
811	TGG GAG TTG GCA ACA CTG CAG CCA CCT TGG AGG AAC TTA AAT CCT	855
271	W E L A T L Q P P W R N L N P	285
856	GCA CAG GTT GTA GCA GCT GTT GGT TTC AAG GGA AAA CGG CTT GAA	900
286	A Q V V A A V G F K G K R L E	300
901	ATT CCA TCT GAT GTG AAT CCT CAA GTA GCG GCT TTA ATT GAA GCC	945
301	I P S D V N P Q V A A L I E A	315
946	TGC TGG GCC AAA GAG CCC TGG AAA CCA CCA TCA	978
316	C W A K E P W K P P S	

Fig. 2.30. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del clon *OeCTR*.

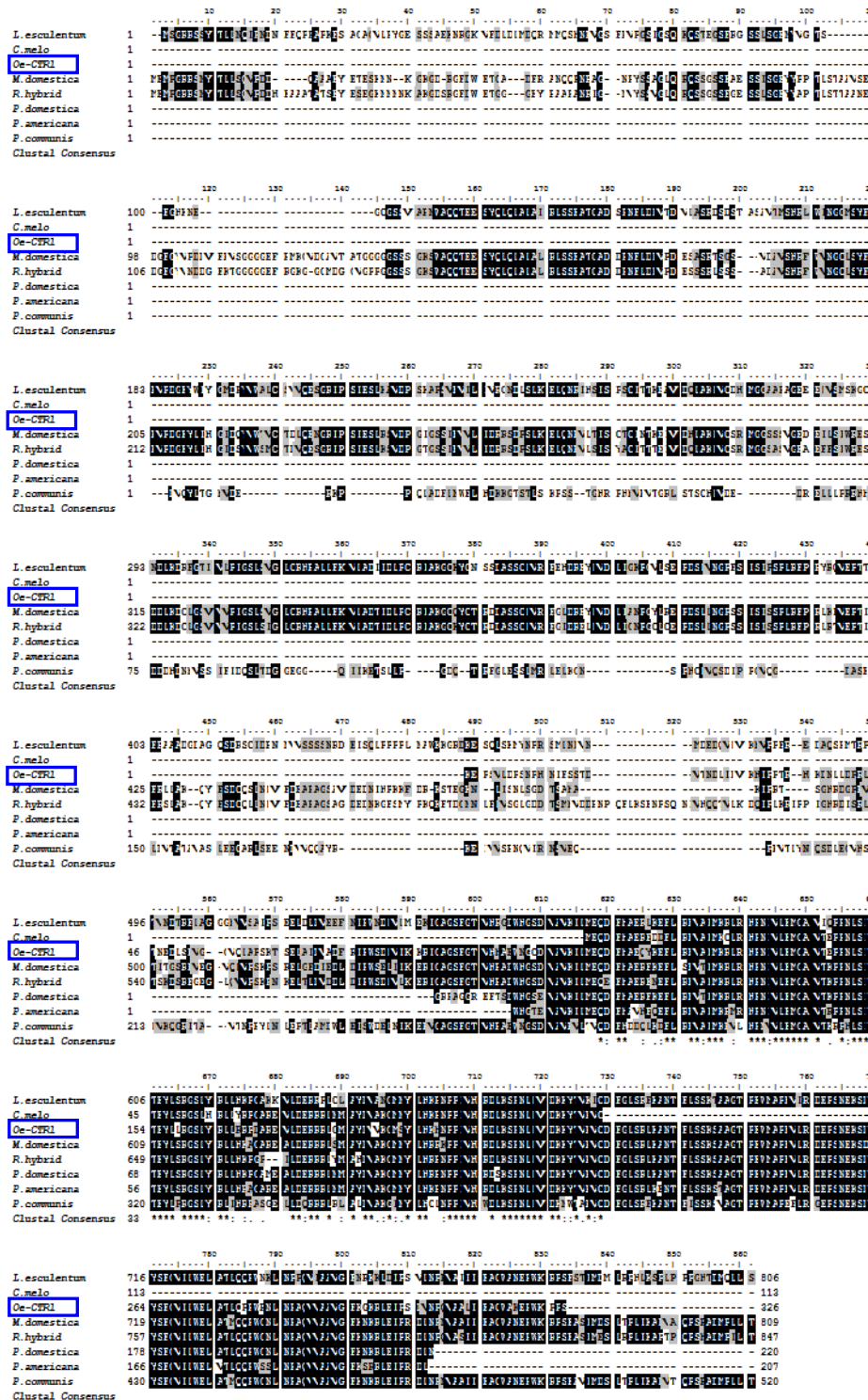


Fig.2.31. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para *OeCTR1* con las secuencias de CTR1 de plantas. Las secuencias usadas son: *Lycopersicon esculentum* (AF110519), *Cucumis melo* (AF387794), *Olea europaea* (este trabajo, HQ008855), *Malus domestica* (DQ847147), *Rosa hybrid* (AY032953), *Prunus domestica* (AJ890089), *Persea americana* (EU417962) y *Pyrus communis* (AF386508). Los aminoácidos idénticos y similares aparecen sombreados en negro y gris, respectivamente.

La secuencia que codifica *OeCTR* es altamente conservada, presentando una alta identidad con las secuencias de CTRs de otras especies vegetales (Tabla 2.12). La CTR de olivo presenta la mayor homología con la CTR de *Prunus salicina* (78 % de identidad).

Tabla 2.12. Homología (%) de la secuencia de aminoácidos de la CTR de olivo (*OeCTR*) respecto a la de otras conocidas.

Nombre de la especie (n° accesión)	% Identidad aminoácidos <i>OeCTR</i> (HQ008855)
<i>Prunus salicina</i> (ABU68270.1)	78
<i>Prunus persica</i> (ACR23642.1)	77
<i>Malus x domestica</i> (ABI58289.1)	76
<i>Solanum lycopersicum</i> (AAR89820.1)	76
<i>Oryza sativa</i> (BAD46666.1)	77
<i>Eriobotrya japonica</i> (ACM89300.1)	68
<i>Actinidia deliciosa</i> (ABY28268.1)	67
<i>Prunus domestica</i> (CAI64502.1)	65
<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_194179.1)	65

Al realizar el análisis del perfil de hidropatía (Kyte y Doolittle) de la proteína deducida del clon *OeCTR* (Fig. 2.32) se observa una predominancia de regiones hidrofílicas. Aún en ausencia de la totalidad de la secuencia, es probable que se trate de una proteína soluble.

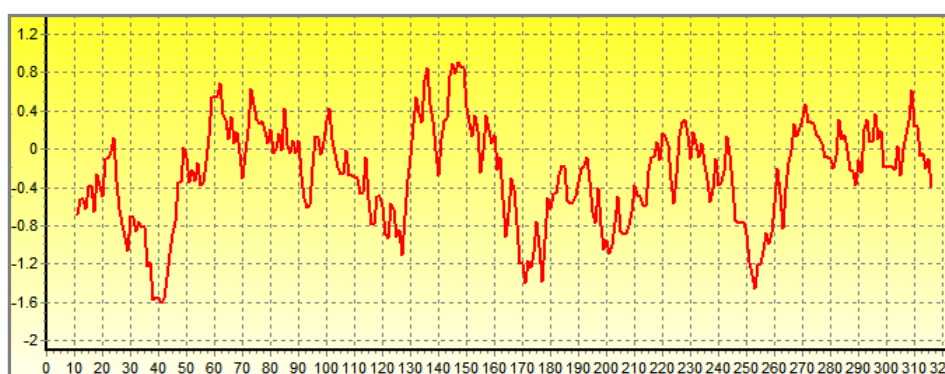


Fig. 2.32. Perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon *OeCTR*.

El análisis filogenético fue realizado por comparación de los dominios conservados de secuencias de CTR1 de varias especies (Fig. 2.33).

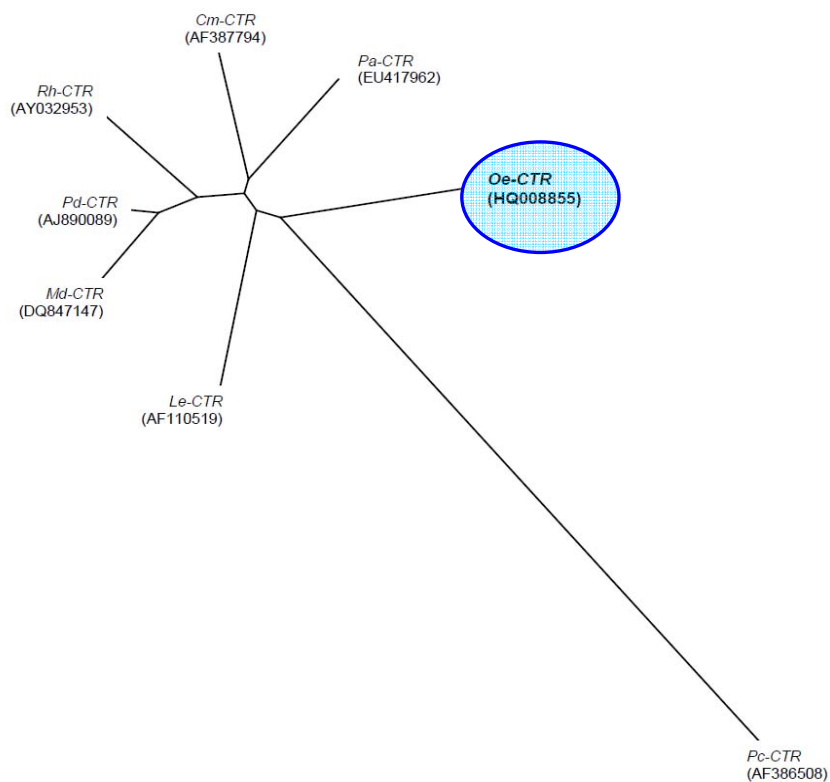


Fig. 2.33. Análisis filogenético de distintas CTR1s descritas en plantas siguiendo el método CLUSTALW.

Un fragmento de cDNA de 339 bp de fruto de olivo fue obtenido por RT-PCR usando los cebadores degenerados EIL-Fw y EIL-Rv (ver 'Materiales y Métodos'). Este cDNA, llamado *OeEIL*, codifica 113 aminoácidos (Fig 2.34).

La secuencia deducida de *OeEIL* es altamente conservada, presentando una alta identidad con las secuencias de EILs de otras especies vegetales (Tabla 2.13). La EIL de olivo presenta la mayor homología con la EIL de *Nicotiana tabacum* (97% de identidad).

1	TTG AAG ATG ATG GAA GTT TGC AAA GCT CAA GGT TTT GTT TAT GGA	45
1	L L M M E V C K A Q G F V Y G	15
46	ATT ATC CCT GAG AAG GGC AAG CCG GTG AGT GGG GCA TCT GAC AAT	90
16	I I P E K G K P V S G A S D N	30
91	CTT CGG GAG TGG TGG AAG GAT AAG GTC CGA TTT GAT CGT AAT GGA	135
31	L R E W W K D K V R F D R N G	45
136	CCG GCT GCC ATA GCA AAA TAC CAA ACA GAG AAT GCA ATC CCG GGG	180
46	P A A I A K Y Q T E N A I P G	60
181	AAG AAT GAG GGG TCA AAT CCC GTT GGT CCA ACC CCT CAC ACG CTG	225
61	K N E G S N P V G P T P H T L	75
226	CAG GAA CTC CAG GAT ACA ACC CTC GGA TCA CTT TTG TCC GCT CTT	270
76	Q E L Q D T T L G S L L S A L	90
271	ATG CAG CAC TGT GAT CCC CCT CAG AGG CGG TTT CCA TTA GAG AAA	315
91	M Q H C D P P Q R R F P L E K	105
316	GGA GTT CCA CCT CCG TGG TGG CCA	339
106	G V P P P W W P	

Fig 2.34. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del clon *OeEIL*.

Al realizar el análisis del perfil de hidropatía (Kyte y Doolittle) de la proteína deducida del clon *OeEIL* (Fig. 2.35) se observa una predominancia de regiones hidrofílicas. Aún en ausencia de la totalidad de la secuencia, es probable que se trate de una proteína soluble.

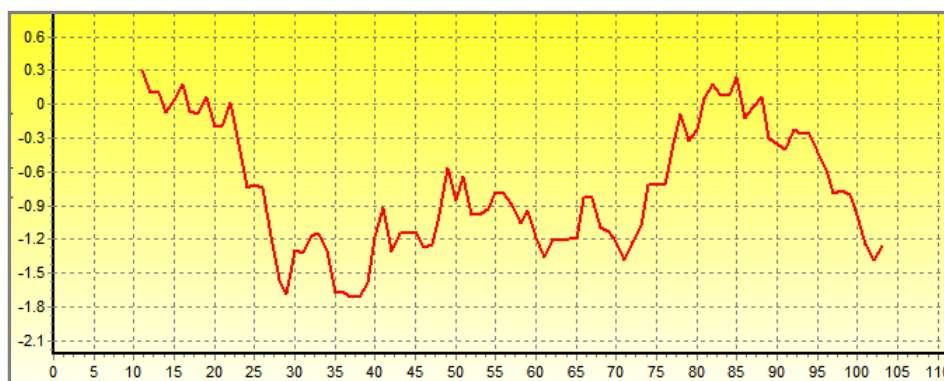


Fig. 2.35. Perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon *OeEIL*.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *OeEIL* con otras proteínas EIL es mostrado en la Fig. 2.36, siendo altamente conservadas en el extremo N-terminal.

Resultados y Discusión

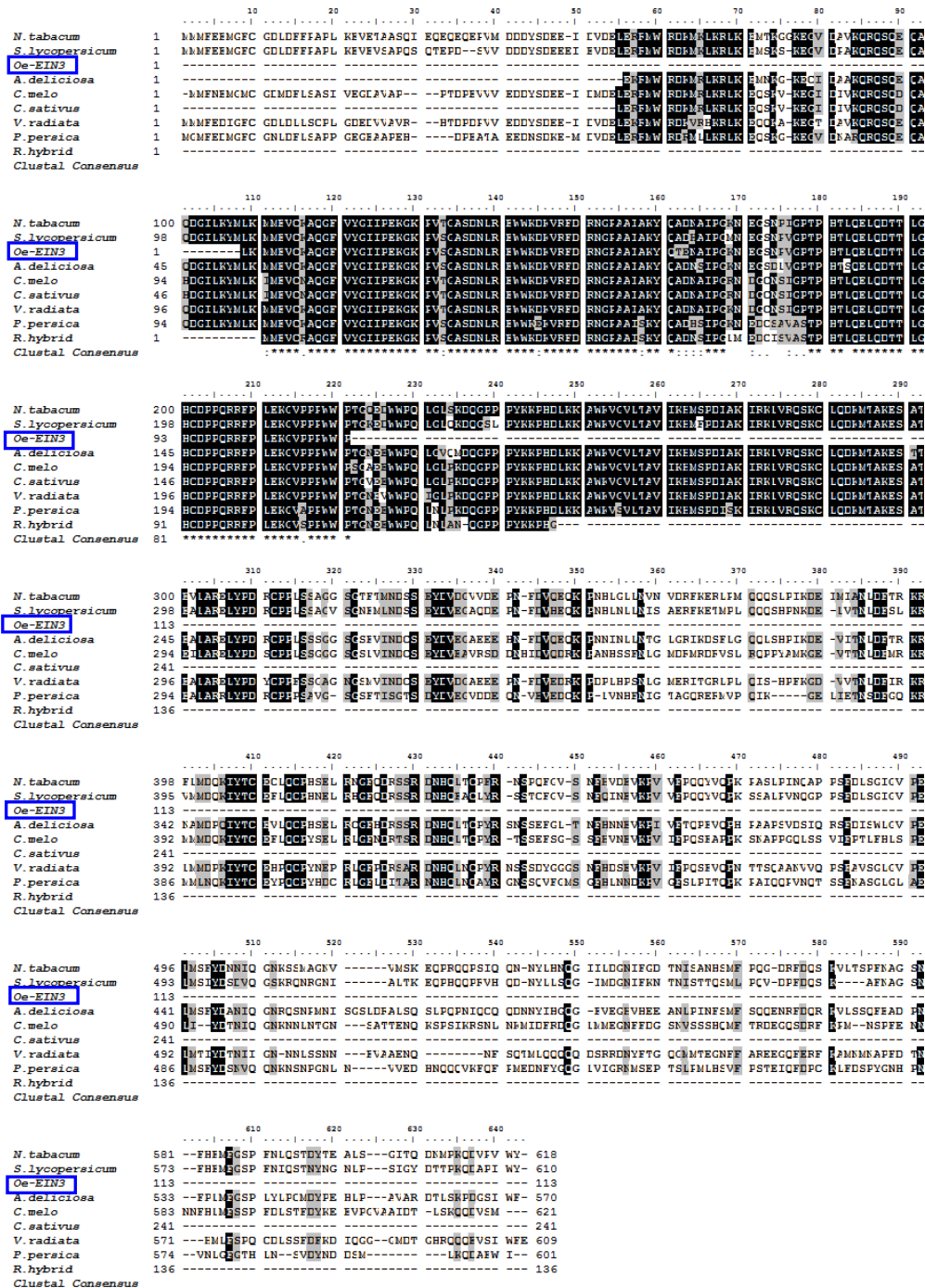


Fig. 2.36. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para *OeEIL* con las secuencias de EIL de plantas. Las secuencias usadas son: *N. tabacum* (*Nicotiana tabacum*, AY248903), *S. lycopersicum* (*Solanum lycopersicum*, AF328784), *Oe-EIN3* (*Olea europaea*, HQ008856 este trabajo), *A. deliciosa* (*Actinidia deliciosa*, EU170633), *C. melo* (*Cucumis melo*, AY973275), *C. sativus* (*Cucumis sativus*, AF387795), *V. radiata* (*Vigna radiata*, AF467784), *P. persica* (*Prunus persica*, EF031066) y *R. hybrid* (*Rosa hybrid*, AY052825). Los aminoácidos idénticos y similares aparecen sombreados en negro y gris, respectivamente. Secuencias altamente conservadas en el extremo N-terminal de estas proteínas son mostradas.

Tabla 2.13. Homología (%) de la secuencia de aminoácidos de la EIL de olivo (*OeEIL*) respecto a la de otras conocidas.

Nombre de la especie (n° accesión)	% Identidad aminoácidos OeEIL (HQ008856)
<i>Nicotiana tabacum</i> (BAA74714.1)	97
<i>Solanum lycopersicum</i> (AAK58858.1)	95
<i>Medicago truncatula</i> (ACX54782.1)	94
<i>Ricinus communis</i> (XP_002530192.1)	94
<i>Vigna radiate</i> (AAL76272.1)	94
<i>Actinidia deliciosa</i> (ACJ70675.1)	95
<i>Cucumis melo</i> (AAK67355.1)	92
<i>Solanum lycopersicum</i> (BAC99307.1)	95
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AAC49746.1)	93

El análisis filogenético fue realizado por comparación de los dominios conservados de secuencias de EIL de varias especies (Fig. 2.37).

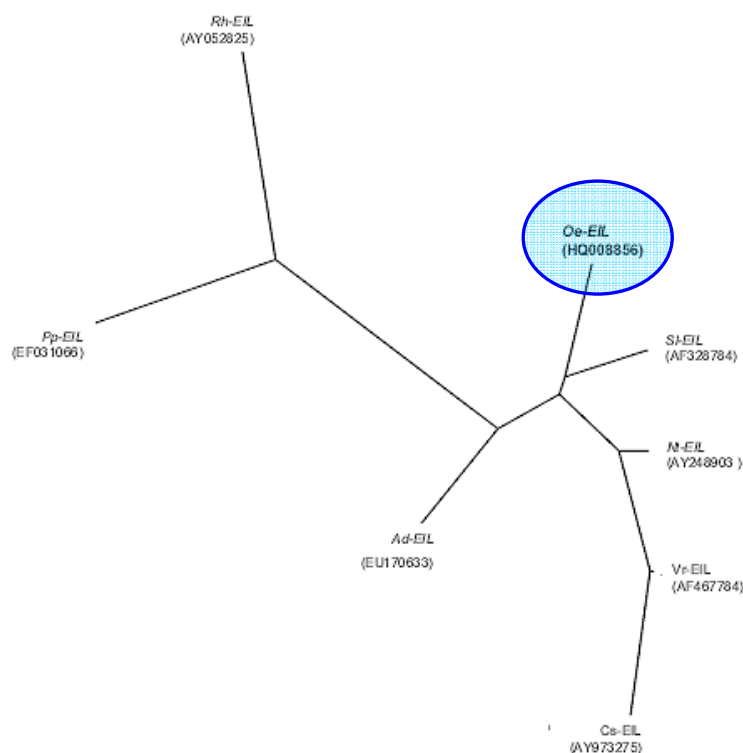


Fig. 2.37. Análisis filogenético de distintas EILs descritas en plantas siguiendo el método CLUSTALW.

b) Análisis de la expresión génica de *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* durante el desarrollo floral y temprano del fruto

En la Fig. 2.38 se observa el análisis de expresión de los genes *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* mediante QRT-PCR durante el desarrollo floral y temprano del fruto (7, 14 y 28 DPA) en la variedad “Arbequina” y “Picual”.

Se observa como la apertura floral provoca patrones de expresión diferentes de los genes de señalización de etileno en función de la variedad estudiada: en “Arbequina” se induce la expresión de los genes *OeCTR* y *OeEIL*, mientras que en “Picual” el nivel de expresión de *OeCTR* en flor abierta es similar a la expresión en flor cerrada y la expresión *OeEIL* disminuye durante este proceso. Por el contrario, no se observó variación en la expresión de *OeERS* entre variedades, ni tampoco durante la apertura floral y desarrollo temprano del fruto.

A los 7 DPA, disminuye la expresión de los genes *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* en ambas variedades. En la fase final del desarrollo temprano del fruto tiene lugar una inducción de la expresión de los genes *OeCTR* y *OeEIL*, mientras la expresión de *OeERS* permanece invariable en ambas variedades (Fig. 2.38).

En *Arabidopsis* se aisló por primera vez el gen CTR (Kieber et al., 1993). La expresión de *AtCTR1*, único gen CTR dentro *Arabidopsis*, es constitutiva y no se ve afectada por estímulos externos, incluyendo el etileno (Gao et al., 2003). En tomate, la expresión de *LeCTR1* aumenta durante la senescencia floral y la maduración del fruto, y es inducida además por etileno (Zegzouti et al., 1999; Leclercq et al., 2002; Adams-Phillips et al., 2004), mientras que el patrón de la expresión de *LeCTR2* era igual que *AtCTR1* (Alexander y Grierson, 2002). En este trabajo, de acuerdo con los perfiles de expresión parece que la regulación transcripcional del gen *OeCTR* puede jugar un importante papel en la apertura floral de olivo. Trabajos previos han indicado que el etileno regula la apertura floral principalmente a través de la expresión de genes de los receptores y CTR (Shibuya et al., 2002; Muller et al., 2002; Kuroda et al., 2003, 2004; Xue et al., 2008). En rosa, se encontraron 2 genes de receptores (*Rh-ETR1* y *Rh-ETR3*) y 2 genes de CTR (*Rh-CTR1* y *Rh-CTR2*), y solamente la expresión del gen *Rh-ETR3* era regulada por etileno y 1-MCP mediante un feedback positivo (Ma et al., 2006). Estos resultados difieren de los encontrados en otras especies, como clavel, geranio y *Delphinium* (Shibuya et al., 2002; Dervinis et al., 2000; Tanase e Ichimura, 2006).

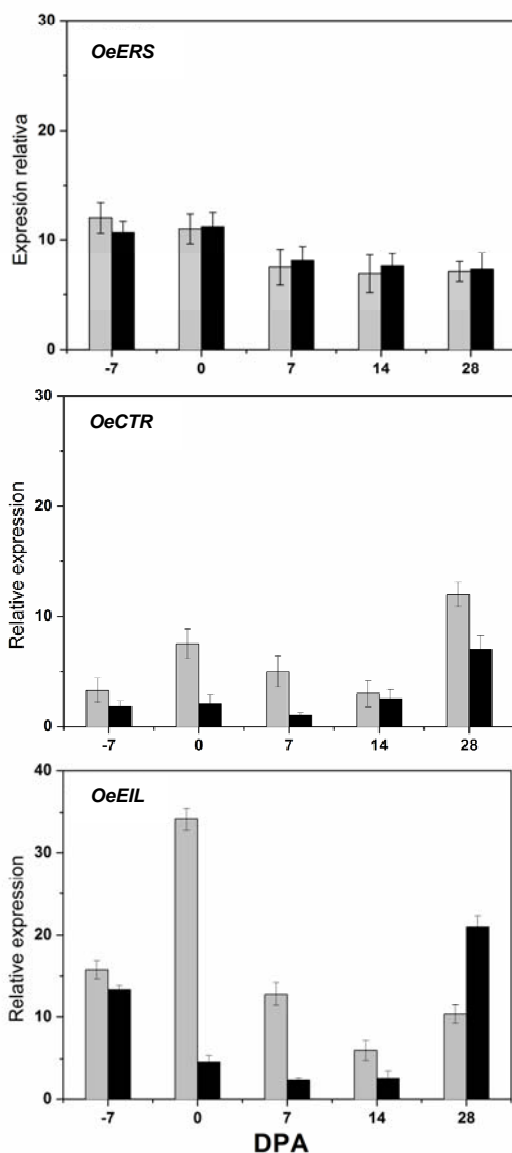


Fig. 2.38. Análisis de la expresión de los genes *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* mediante QRT-PCR durante el desarrollo temprano del fruto de olivo. RNAs totales son aislados de flores (-7 DPA, flor cerrada, and 0 DPA, flor en antesis) y frutos (7, 14 and 28 DPA) de la variedad “Arbequina” (barra gris) y “Picual” (barra negra). Los niveles de expresión están normalizados a la expresión del gen *O. europaea Ubiquitina* (control interno). Los datos están relativizados al nivel de expresión más bajo que se le ha dado el valor de 1. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE. DPA: días post-antesis.

En pétalos de clavel, *DC-ETR1* y *DC-ERS1* son expresados constitutivamente a niveles imperceptibles en todos los tejidos; y la expresión de *DC-ERS2* no es afectada por el tratamiento de etileno, aunque

después del tratamiento del etileno, su expresión crece levemente en ovarios, disminuye en pétalos, y no varía en los estilos (Shibuya et al., 2002). En geranio, el tratamiento de etileno indujo la abscisión de pétalos, mientras que no afectó la expresión de *PhETR1* y de *PhETR2* en pistilos y receptáculos (Dervinis et al., 2000). En *Delphinium*, el etileno exógeno incrementa la expresión de los genes de los receptores en sépalos, que provoca su abscisión, pero no en gineceo ni receptáculos, que producen etileno (Kuroda et al., 2003, 2004; Tanase e Ichimura, 2006). Estos resultados indicarían que la influencia del etileno sobre la senescencia floral en estas plantas puede no proceder a través de la regulación de la expresión de genes de los receptores de etileno.

EIN3 es un regulador positivo en la ruta de señalización del etileno. Existen evidencias para indicar que EIN3 puede ser regulado por ACC o etileno en *Arabidopsis* (Chao et al., 1997), tomate (Tieman et al., 2001), melón (Perin et al., 2002), tabaco (Kosugi y Ohashi, 2000; Rieu et al., 2003), o rosa (Muller et al., 2003). En este trabajo, *OeEIL* es inducido por la apertura floral en olivo, en concordancia con otros resultados obtenidos en clavel donde la regulación transcripcional de un gen *DC-EIL3* juega un importante papel en crecimiento y el desarrollo del clavel (Iordachescu y Verlinden, 2005). Aunque, en rosa, *Rh-EIN3-1* y *Rh-EIN3-2* mostraron una expresión constitutiva. En este mismo sentido, varios estudios han mostrado que EIN3 está regulado más a nivel post-transcripcional, que a nivel de transcripción (Guo y Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004).

c) *Análisis de la expresión génica de OeERS, OeCTR y OeEIL durante la maduración del fruto*

El patrón de la expresión de *OeERS* a lo largo del desarrollo del fruto de “Picual” tiene la misma tendencia que en el fruto de “Arbequina”, observándose una expresión muy baja durante la maduración del fruto (Fig. 2.39). Los niveles de expresión de *OeERS* fueron mayores en “Arbequina” que en “Picual” en todos los estadios estudiados.

En la expresión de *OeCTR* se observó una variación en el curso del desarrollo del fruto entre ambas variedades. En “Picual”, la expresión *OeCTR* disminuye durante el proceso de maduración, teniendo su máximo de expresión en fruto verde, mientras en “Arbequina” ocurre lo contrario (Fig. 2.39).

OeEIL se expresó constantemente durante el desarrollo en ambas variedades, mostrando un aumento de la expresión con la maduración del fruto a 217 DPA, que fue máximo en la variedad “Picual” coincidiendo

con la mayor producción de etileno (Fig. 2.39). Por lo tanto, el proceso de maduración en el fruto de “Picual” provoca un aumento de expresión en los genes *OeACS*, *OeACO* y *OeEIL* y un descenso de la expresión de los genes *OeERS* y *OeCTR*, asociados con un aumento de la producción de etileno, cuando se compararon las dos variedades (Figs. 2. 28 y 2.39; Tabla 2.7).

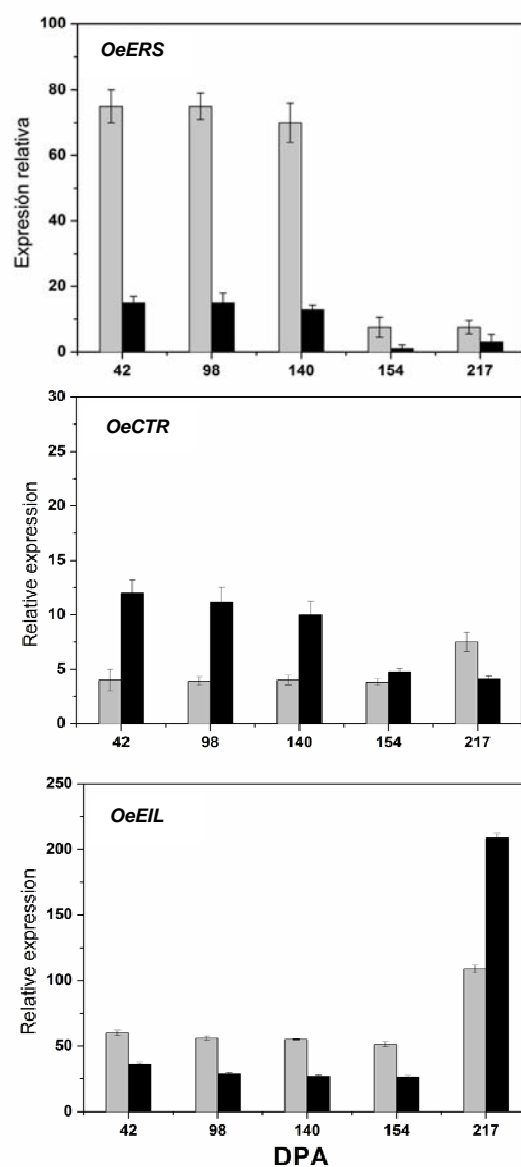


Fig. 2.39. Análisis de la expresión de los genes *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* mediante QRT-PCR durante el desarrollo y maduración del fruto de olivo. RNAs totales son aislados de mesocarpos de frutos (42, 98, 140, 154 y 217 DPA) de la variedad “Arbequina” (barra gris) y “Picual” (barra negra). Los niveles de expresión están normalizados a la expresión del gen *O. europaea Ubiquitina* (control interno). Los datos están relativizados al nivel de expresión más bajo que se le ha dado el valor de 1. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE. DPA: días post-antesis.

Todos los receptores del etileno tienen una estructura muy similar (Chang y Stadler, 2001). Al menos mutantes de un solo receptor de etileno muestran poco o nada de fenotipo de las plantulas de *Arabidopsis* (Hua y Meyerowitz, 1998), sugiriendo que los receptores parecen tener un grado de redundancia funcional. Algunos de los receptores exhiben patrones de la expresión específicos asociados a diferentes estados de desarrollo, por ejemplo la expresión de los genes NR en tomate, *CmETR1*, *CmERS1* en melón, y *MdERS1* en manzana aumenta durante la maduración del fruto (Wilkinson et al., 1995; Sato-Nara et al., 1999; Dal Cin et al., 2006). Otra característica de los receptores es su diferencial sensibilidad de los receptores y capacidad de amplificación. Algunos genes tales como *AtERS1*, *AtETR2*, *AtERS2*, *NR*, *LeETR4*, *LeETR6*, *PpERS1*, *OsETR2*, y *OsERS1* están fuertemente regulados por el etileno, mientras que *AtETR1*, *AtEIN4*, *LeETR1*, *LeETR2*, y *PpETR1* muestran una respuesta más débil (Hua et al., 1998; Rasori et al., 2002; Yau et al., 2004; Kevany et al., 2007). Si bien también existen evidencias que los genes tales como *OsERS2* se reprimen levemente por el tratamiento del etileno (Yau et al., 2004). La expresión de *OeERS* disminuye notablemente en los frutos de olivo durante el proceso de maduración. Sin embargo, estos resultados se diferencian de otros encontrados en otras especies frutales; se ha encontrado un marcado aumento en la expresión de receptores en el melocotón climatérico (*PpERS1*; Rasori et al., 2002), pera (*PcETR1a*, *PcERS1a*, y *PcETR5*; EL-Sharkawy et al., 2003), manzana (*MdETR1*; Dal Cin et al., 2006), y fresa (*FaERS1*; Trainotti et al., 2005).

La expresión de *OeCTR* varía notablemente en los frutos de olivo durante el proceso de maduración según la variedad de olivo estudiada. Los datos publicados sobre los genes CTR en frutos durante la maduración son muy variables dependiendo de la especie, aunque, el mRNA de CTR1 se expresa de forma constitutiva en *Arabidopsis* (Adams-Phillips, 2004). Por ejemplo, la expresión *PcCTR1* aumenta durante la maduración del fruto de pera como en el caso de *OeCTR* durante la maduración en la variedad "Arbequina". *MdCTR1* y *PpCTR1* apenas varían su expresión durante la maduración del fruto de manzana y del melocotón, con diferentes respuestas a 1-MCP (Dal Cin et al., 2006). *PpCTR1* no demostró ninguna respuesta a 1-MCP, y *MdCTR1* fue suprimido en una última etapa en la maduración, como ocurre en el caso de *OeCTR* durante la maduración del fruto de "Picual".

La implicación del etileno en la señalización en la maduración del fruto se ha estudiado principalmente en el nivel de ERS, ETR y CTR en frutos (Rasori et al., 2002; Dal Cin et al., 2005; Li y Yuan, 2008). Sin embargo, la regulación de la función de EIL ha sido poco estudiada en frutos carnosos. Se ha sugerido un papel regulador positivo de los genes EILs durante el desarrollo de la planta de tomate (Tieman et al., 2001). Recientemente, se examinó la expresión de EILs durante el desarrollo del fruto de kiwi, donde los

genes *AdEIL2* y *AdEIL3* activaron la transcripción de genes relacionados con la maduración como *AdACO1* y *AdXET5* (Yin et al., 2010). Hasta la fecha, *OeEIL* es el primer gen de EIN3-like que se ha aislado del fruto de olivo y ha presentado una identidad a nivel de aminoácidos del 94-96% con EILs del fruto de tomate. Uno de los resultados relevantes del análisis ha sido la inducción de la expresión del gen *OeEIL* durante la maduración del fruto de olivo. Resultados similares se han demostrado en mesocarpos de frutos durante la maduración en melón climatérico (Périn et al., 2002), tomate (Yokotani et al., 2003) y plátano (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 2008), donde el gen *EIL2* es el único gen de la familia génica EIL inducible por la maduración y el etileno.

En conclusión, la comparación del nivel de expresión de los genes *OeACO*, *OeACS* y *OeEIL* entre las dos variedades sugiere que la rápida evolución del proceso de maduración del fruto en “Picual” es caracterizada por un mayor nivel de expresión *OeACO*, *OeACS* y *OeEIL*, cuando los comparamos con lo observado en la variedad “Arbequina” de lenta evolución. Sin embargo, como estas dos variedades no son isogénicas, las diferencias observadas pueden ser debidas a otros procesos genéticos y fisiológicos no relacionados directamente con sus diferencias en la velocidad de maduración. No obstante, las diferencias encontradas en los perfiles de expresión de estos genes, la producción de etileno y los contenidos de ACC/MACC entre las dos variedades de olivo indican que la biosíntesis y señalización de etileno está sujeta a variación entre las variedades de olivo.

2.4.3. ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO EN OLIVO

Como se ha mostrado anteriormente, durante el proceso de maduración del fruto de olivo ocurre una expresión diferencial de los genes de biosíntesis y señalización de etileno en y entre los frutos de las dos variedades de olivo.

Para establecer la especificidad tisular de los patrones de expresión de *OeACS*, *OeACO*, *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* se procedió a estudiar su expresión mediante QRT-PCR en brotes, hojas, flores, y frutos maduros de las variedades de “Arbequina” y “Picual”. El objetivo era conocer si la expresión de alguno de estos genes era específica de los tejidos reproductivos en olivo.

Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Fig. 2.40. La expresión de ninguno de los cinco genes es específica de los tejidos reproductivos (flor y fruto), aunque sus patrones de expresión fueron significativamente diferentes en brotes, hojas, flores, y frutos.

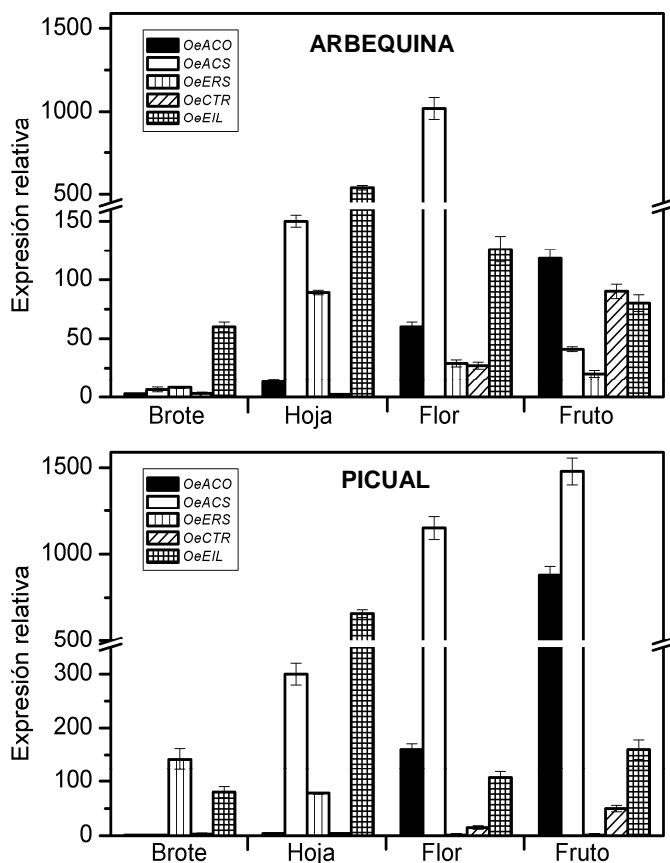


Fig. 2.40. Análisis de la expresión de los diferentes componentes de las rutas de biosíntesis y señalización mediante QRT-PCR en diferentes tejidos de la variedad “Arbequina” y “Picual” de olivo. Los niveles de expresión están normalizados a la expresión del gen *O. europaea Ubiquitina* (control interno). Los datos están relativizados al nivel de expresión más bajo que se le ha dado el valor de 1. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE.

Estos patrones de expresión entre los distintos tejidos podría deberse a diferencias en la demanda de etileno. *OeACS* mostró una expresión muy baja en brotes en ambas variedades, mientras alcanzó altos niveles de expresión en hoja y flor en ambas variedades (Fig. 2.40). Por el contrario, el nivel de expresión de *OeACS* en fruto varió entre las variedades: alto y bajo nivel de expresión en fruto de “Picual” y “Arbequina”, respectivamente (Fig. 2.40). La expresión de los genes *OeACO* y *OeCTR* fue más abundante en tejidos reproductivos (flor y fruto), mientras que *OeEIL* alcanzó su máxima expresión en la

hoja de ambas variedades (Fig. 2.40). La expresión *OeERS* varió entre los diferentes tejidos y variedades. En “Arbequina”, la expresión de *OeERS* fue más abundante en hoja, en tanto que tiene su máximo de expresión en brotes en la variedad “Picual” (Fig. 2.40).

Puesto que el etileno regula múltiples funciones en las plantas superiores, los genes relacionados con el etileno no se expresan exclusivamente en un solo tejido (Gomez-Jimenez et al., 1998; Bleecker y Kende, 2000; El-Sharkawy et al., 2003, 2007; Yin et al., 2008; Wang et al., 2010). Por consiguiente, nuestros resultados confirman los observados en otras especies, donde ninguno de estos genes relacionados con el etileno en olivo fue específico de los tejidos reproductivos.

Entre los genes relacionados con etileno del fruto de olivo, solamente *OeACO* y *OeCTR* son expresados al máximo nivel en tejidos reproductivos, mientras *OeEIL* es expresado al máximo nivel en tejidos vegetativos en ambas variedades, sugiendo un papel específico de estos genes en estos tejidos. Contrariamente, las expresiones de *OeACS* y *OeERS* también varían entre las dos variedades de olivo. Estos patrones de la expresión diferentes entre variedades encontrados aquí son generalmente similares a los encontrados entre variedades de otras especies, tales como ciruelo, plátano, y níspero japonés, donde *PsETR1*, *PsERS1*, *PsCTR1* y *PsERF*, *MaACS1* y *MaACO1*, y *EjERS1a*, *EjERS1b*, *EjETR1*, *EjCTR1* y *EjEIL1*, respectivamente, también fueron expresados diferencialmente en y entre diferentes variedades (El-Sharkawy et al., 2007; Choudhury et al., 2008; Wang et al., 2010). Esta discrepancia podía ser debida a una síntesis y respuesta diferenciada de la variedad de olivo. Así pues, estas marcadas diferencias de expresión encontradas sugieren que los dos genotipos estudiados se diferenciarían no sólo en sus niveles de ACC/MACC y la sensibilidad a etileno, sino también en un diferente papel de *OeACS* y de *OeERS* en estas variedades. Sin embargo, debido a que estos genes pertenecen a familias mutigénicas y la expresión observada no es específica (otros mRNAs de ACS, ACO, ERS, CTR y EIL se pueden estar detectando), no podemos descartar que otros miembros de la familia de ACS, ACO, ERS, CTR y EIL puedan estar implicados en la maduración del fruto de olivo.

2.4.4. INTERACCIÓN ENTRE ETILENO Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA BIOSÍNTESIS Y SEÑALIZACIÓN DE ETILENO DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO

Numerosos estudios han demostrado, en varias especies y sistemas, que el etileno exógeno o etefón promueve eficazmente la maduración del fruto (Brown, 1997; Perin et al., 2002; Pech et al., 2008),

mientras que los inhibidores de la biosíntesis o señalización de etileno retrasan la maduración por reducir la producción o acción de etileno (Brown, 1997; Yuan y Carbaugh, 2007; Pech et al., 2008; Li y Yuan, 2008). Con el fin de determinar la implicación del etileno en la maduración del fruto y en la expresión de los genes relacionados con etileno durante la maduración, se analizaron la firmeza, el color, la producción de etileno, los contenidos ACC/MACC del fruto y los patrones de expresión de los 5 genes en frutos de las dos variedades cosechadas después del tratamiento con etefón e inhibidores de la síntesis de etileno durante 7 y 14 días sobre el árbol. Los tratamientos de etefón, ácido aminooxiacético (AOA) y CoCl_2 se aplicaron por spray (150 mL/rama de árbol) sobre el mismo árbol al inicio de la maduración (154 DPA). Los frutos control se trataron con agua durante 7 y 14 días, y se recogieron de las ramas de los mismos árboles tratados (ver 'Materiales y Métodos').

Las variaciones en el color y la firmeza del fruto inducidas por el etefón e inhibidores de la síntesis de etileno, a los 7 y 14 días después del tratamiento se muestran en la Fig. 2.41. La aplicación de AOA y CoCl_2 , inhibidores específicos de ACS y ACO, respectivamente, no tuvo efecto sobre el color y la firmeza en los frutos tratados comparados con los control en ambas variedades. Por el contrario, cuando aplicamos 0,1 mM de etefón (etileno exógeno) sobre los árboles en las dos variedades, el color y la firmeza de los frutos tratados variaron en comparación con los controles, aunque el efecto fue más pronunciado a los 14 días que a los 7 días. En "Arbequina", la firmeza en los frutos tratados con etefón descende en un 14% y un 26% respecto a los frutos control a los 7 y 14 días, respectivamente. En "Picual", la firmeza en los frutos tratados con etefón descende en un 33% y un 41% respecto a los frutos control a los 7 y 14 días, respectivamente. Por lo tanto, el impacto del etileno exógeno sobre la firmeza del fruto depende de la variedad de olivo, siendo más sensible al tratamiento la variedad "Picual".

Para determinar si la aplicación de etileno exógeno afectaba a la producción de etileno y los contenidos de ACC y MACC del fruto, se procedió su determinación tanto en los frutos tratados con etefón, AOA y CoCl_2 , como en los frutos control en las dos variedades de olivo (Fig. 2.42). En ambas variedades, el contenido de ACC incrementó en presencia de etefón a los 14 días de tratamiento, si bien tiene un mínimo, o no tiene efecto, sobre el contenido de ACC a los 7 días, coincidiendo con un aumento de la producción de etileno solamente en el caso de "Picual" (Fig. 2.42 A, B). En "Arbequina", las diferencias inducidas por etefón sobre el contenido de MACC del fruto son más pronunciadas y son máximas a los 14 días de tratamiento comparado con los frutos control, mientras se detectan incrementos leves sobre el contenido MACC en "Picual" a lo largo de todo el tratamiento (Fig 2.42 C). En los frutos tratados con AOA, no se detectaron cambios significativos en la producción de etileno ni en los contenidos ACC y

MACC comparados con los frutos control. Por el contrario, el tratamiento con CoCl_2 tuvo un efecto diferente sobre los contenidos en ACC y MACC en ambas variedades, aunque no se vió afectada la producción de etileno (Fig. 2.42).



Fig. 2.41. Valores de firmeza ($\text{N}\cdot\text{cm}^{-3}$) del fruto de olivo cosechados después del tratamiento sobre el árbol con etefón, AOA y CoCl_2 durante 7 y 14 días de tratamiento. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE.

En “Arbequina”, el CoCl_2 exógeno provoca un aumento significativo del contenido de MACC, mientras que, en “Picual”, este tratamiento disminuye significativamente los contenidos de ACC y MACC comparados con los frutos control a los 14 días. (Fig. 2.42 B, C).

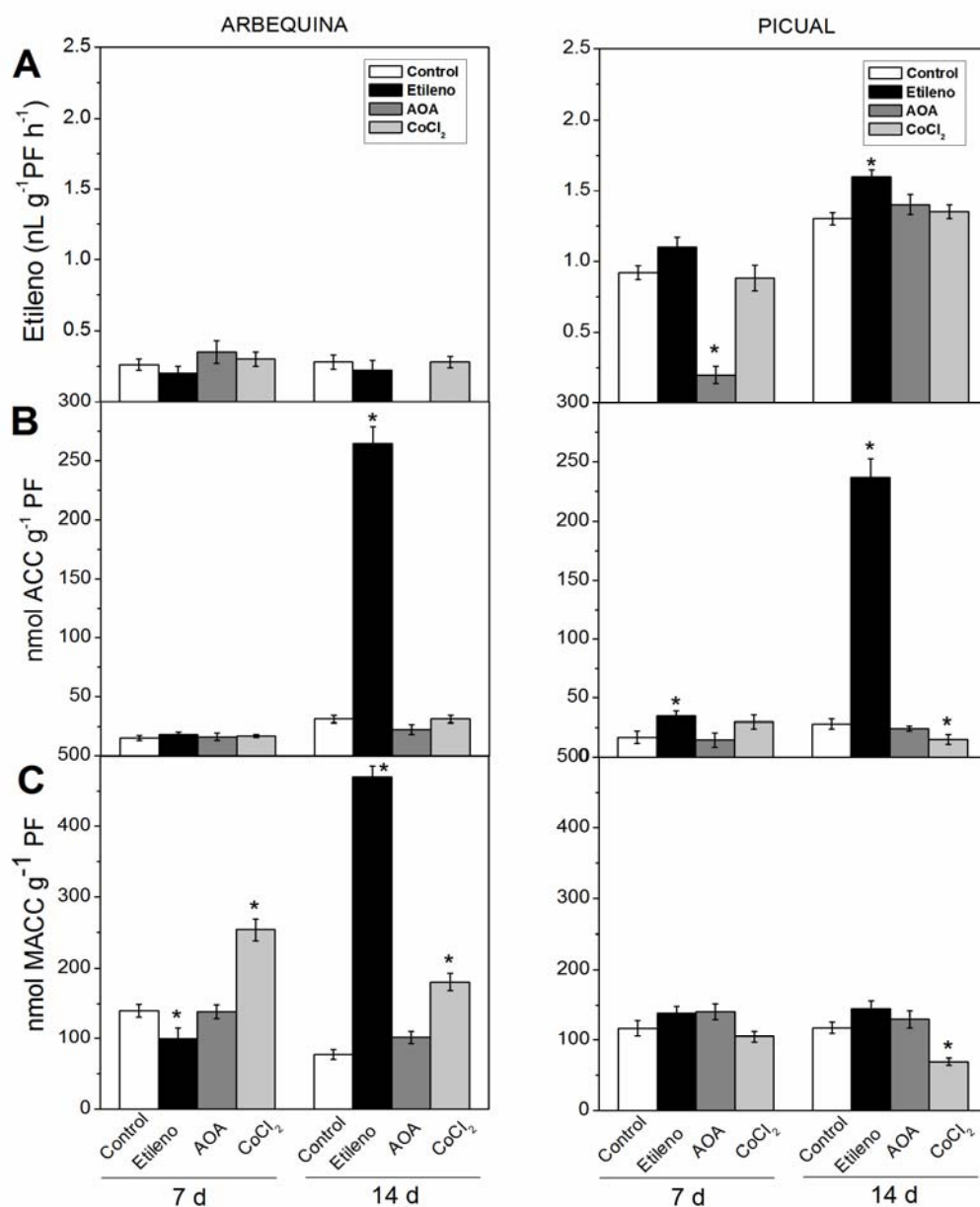


Fig. 2.42. Variaciones de la producción de etileno (A), el contenido de ACC (B) y MACC (C) en frutos de olivo de la variedad “Arbequina” y “Picual” tratados con agua (control), 0.1 mM etefón (etileno exógeno), 1 mM ácido aminooxiacético (AOA) y 1 mM cloruro de cobalto (CoCl₂) después de 7 y 14 días de tratamiento. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes ± DE. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) respecto al control.

Dado que la inducción de la expresión de la mayoría de los genes estudiados era paralela a la maduración del fruto en la variedad “Picual”, se procedió a estudiar las interacciones entre el etileno y la

expresión de genes relacionados con esta hormona después de la aplicación de etileno e inhibidores de su síntesis. La Fig. 2.43 muestra los patrones de expresión de *OeACS*, *OeACO*, *OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL* en respuesta a etileno exógeno (etefón), AOA, y CoCl_2 en frutos de las dos variedades, “Arbequina” y “Picual”.

Después de 7 días de tratamiento, la expresión *OeACS* fue inducida por etileno exógeno y no se vio afectada por el AOA en ambas variedades, aunque mostró diferentes patrones de expresión en presencia de CoCl_2 (Fig. 2.43 A). En los frutos de la variedad “Arbequina”, los niveles de expresión de *OeACS* disminuyeron fuertemente mientras que se mantuvieron en un nivel constante en los frutos de “Picual” tras la aplicación de CoCl_2 . Contrariamente, se encontró un patrón de expresión de *OeACS* diferente en las dos variedades después de 14 días con los tratamientos de etefón, AOA, y CoCl_2 (Fig. 2.43 A): en los frutos de la variedad “Arbequina”, la expresión *OeACS* fue inducida por etileno y no se vio afectada por los tratamientos de AOA y CoCl_2 , mientras que, en los frutos en “Picual”, su expresión no fue afectada por etileno aunque fue disminuida por los tratamientos de AOA y CoCl_2 .

La expresión *OeACO* no fue afectada significativamente por el tratamiento de AOA, aunque el etileno provocó un aumento de su expresión en ambas variedades, especialmente en los frutos de “Arbequina” tratados con etileno durante 7 días, cuando el tratamiento de CoCl_2 provocó un descenso de su expresión (Fig. 2.43 B), y un aumento del conjugado MACC (Fig. 2.42 C).

Las expresiones de *OeERS* y *OeCTR* disminuyen en respuesta a etileno, mientras que no cambian significativamente entre los frutos tratados con AOA y CoCl_2 y los frutos control después de 7 y 14 días en las dos variedades (Fig. 2.43 C, D).

La expresión de *OeEIL* mostró diferentes patrones de expresión después de 7 días de tratamientos. En los frutos de “Picual”, los niveles de expresión de *OeEIL* fueron inducidos por etileno y se mantuvieron constantes con los tratamientos AOA y CoCl_2 respecto a los frutos control, mientras que en los frutos “Arbequina”, mantuvieron niveles constantes con la aplicación de etileno y disminuyeron con los tratamientos de AOA y CoCl_2 (Fig. 2.43 E).

Por otra parte, la expresión *OeEIL* fue muy similar en ambas variedades después de 14 días de tratamientos: los niveles de expresión de *OeEIL* permanecen prácticamente invariables durante el

tratamiento de AOA y CoCl_2 , aunque su expresión fue inducida fuertemente por etileno a los 14 días en ambas variedades (Fig. 2.43 E).

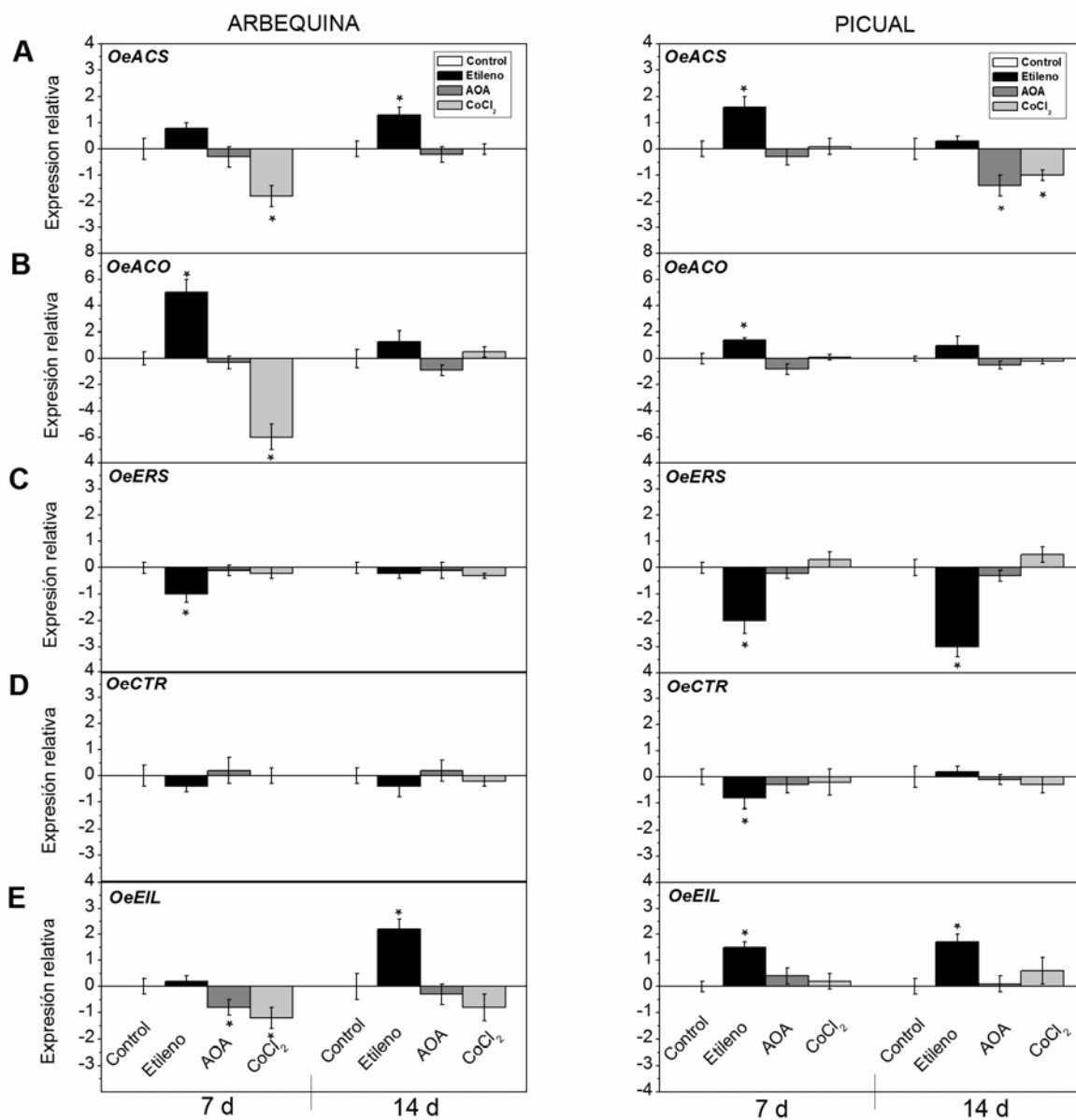


Fig. 2.43. Análisis de la expresión de los genes *OeACS* (A), *OeACO* (B), *OeERS* (C), *OeCTR* (D), y *OeEIL* (E) mediante QRT-PCR en frutos de olivo de la variedad de “Arbequina” y “Picual” tratados con agua (control), 0.1 mM etefón, 1 mM ácido aminooxiacético (AOA) o 1 mM cloruro de cobalto (CoCl_2) después de 7 y 14 días de tratamiento. Los datos están relativizados al nivel de expresión del Control que se le ha dado el valor de 0. Los datos son la media de al menos 3 experimentos diferentes \pm DE. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) respecto al control.

En el olivo, trabajos previos han mostrado que el etileno y el fosfato derivados de la descomposición del etefón son eficaces en promover la abscisión del fruto (Banno et al., 1993; Goren et al., 1998; Barranco et al., 2004). En este trabajo, el etefón y los inhibidores de la biosíntesis de etileno se han utilizado para determinar la implicación del etileno en la expresión de los genes relacionados con esta hormona durante la maduración del fruto. Aplicando etileno exógeno, hemos observado que *OeACS* y *OeACO* están regulados por etileno en los frutos maduros de olivo. Por otra parte, Karz et al. (2004) demostraron que las expresiones de ACS1 y de ACO en fruto maduro no son afectadas por etileno o propileno exógeno. El tratamiento con etileno induce diferencialmente la expresión de *OeACS* y *OeACO* durante la maduración en las dos variedades de olivo. Nuestro estudio ha mostrado una fuerte inducción de *OeACS* y de *OeACO* en respuesta a etileno junto con un aumento simultáneo en el contenido de ACC en ambas variedades. Sin embargo, el efecto del etileno sobre de la expresión de *OeACO* en la variedad "Picual" es menos pronunciado que en "Arbequina". En cambio, los niveles de expresión de *OeACS* y *OeACO* disminuyen en respuesta a CoCl_2 en la variedad "Arbequina", coincidiendo con un aumento de ACC y MACC en los frutos tratados, mientras que se observó poco o ningún efecto por la aplicación de CoCl_2 en variedad "Picual". En esta última, la represión de la expresión ACS por AOA no coincidió con cambios en el contenido de ACC, lo que puede ser debido a una regulación post-transcripcional o traduccional sobre la ACS en el fruto de olivo al igual que ocurre en otros tejidos de otras especies (Gómez-Jiménez y Matilla, 2006).

Los receptores de etileno regulan negativamente la señalización de etileno, y una reducción en el número de receptores parece conferir alta sensibilidad al etileno (Hua y Meyerowitz, 1998; Hall y Bleecker, 2003). Los perfiles de expresión en respuesta a los inhibidores de la biosíntesis de etileno al inicio de la maduración del fruto indican que la expresión de *OeERS* es regulada negativamente por etileno en este estadio de desarrollo del fruto. Sin embargo, un subgrupo de genes de receptores han sido inducidos por etileno durante la maduración del fruto (El-Sharkawy et al., 2007). Además, la expresión de los genes de receptores como *EjETR1*, *EjERS1a*, y *EjERS1b* en níspero japonés, y *FaERS1* en fresa puede ser inducida por etileno (Trainotti et al., 2005; Wang et al., 2010), pero *CsETR1* y *CsERS1* en cítricos han mostrado poca respuesta al etileno y a tratamientos con MCP (Katz et al., 2004). El patrón de expresión ERS encontrado en olivo, sin embargo, sea quizás el que cabría esperar de un fruto no-climatérico que mostrara bajas respuestas estimulantes al etileno exógeno. El nivel de expresión constante de *OeCTR* en presencia de etileno exógeno fue similar al encontrado en melocotón *PpCTR1* (Dal Cin et al., 2006) pero distinto del encontrado en el fruto de tomate, *LeCTR1* (Leclercq et al., 2002; Adams-Phillips et al., 2004), y kiwi, *AdCTR1* (Yin et al., 2008), cuya expresión es inducida por etileno. En general, los datos

presentados sobre el gen *OeCTR* en olivo son más similares a los encontrados en *Arabidopsis*, que muestran bajos niveles de respuesta transcritiva al etileno, que a los cuatro genes encontrados en tomate que son transcripcionalmente inducidos por etileno (Adams-Philips et al., 2004).

Por otra parte, el etileno parece también modular el nivel de la proteína EIN3/EIL ya que el tratamiento con ACC dió lugar a la acumulación de la proteína EIN3 en *Arabidopsis* (Yanagisawa et al., 2003). En el fruto de olivo, *OeEIL* es un gen inducible por etileno. Similares resultados han sido observados en transcritos de 4 *LeEILs* que se acumulan durante la maduración en tomate (Yokotani et al., 2003), y la expresión de *CmEIL2* y *MaEIL2* que fue inducida por tratamiento con propileno y acetileno durante el proceso de maduración, respectivamente (Perin et al., 2002; Mbeguie-A-Mbeguie et al., 2008). Tieman et al. (2001) han indicado que *LeEIL* juega un papel en la determinación de la sensibilidad del etileno durante la maduración del fruto de tomate.

Así pues, de acuerdo con nuestros resultados parece que existe una relación entre la expresión de los genes de la biosíntesis (*OeACO* y *OeACS*) y la señalización (*OeEIL*) de etileno y la maduración del fruto de "Picual", asociada a un aumento de la producción de etileno. Estos resultados indican que en la maduración del fruto de "Picual" se activarían las rutas de síntesis y señalización de etileno a través de estos genes cuya expresión además es regulada por etileno, lo que sugiere un carácter climatérico del proceso de maduración del fruto de la variedad "Picual", siempre asumiendo que el control transcripcional de la expresión de los genes tiene su reflejo en las actividades de las enzimas que codifican.



2.5. CONCLUSIONES

1. El fruto de olivo (*Olea europaea* L.), fruto carnoso con hueso, se utilizó como material biológico para el estudio del desarrollo floral y la maduración del fruto. Los datos recogidos acerca de la caracterización agronómica y fisiológica de las dos variedades elegidas de olivo corroboran diferencias para el color externo en la madurez, la firmeza, el tamaño, la forma y la velocidad de maduración. En este contexto, el olivo puede ser considerada una especie modelo habida cuenta de la variabilidad que ofrece este proceso.
2. En esta Memoria se caracterizan dos genes de la ruta de biosíntesis (*OeACS* y *OeACO*), y tres genes de la ruta de señalización del etileno (*OeERS*, *OeCTR* y *OeEIL*) en tejidos reproductivos de olivo, que muestran una expresión no específica, y también diferencial según el tipo de tejido, el grado de desarrollo y la variedad. Este hecho está en contraposición con los estudios efectuados en otras especies en las que estos mismos genes de la ruta de señalización se expresan de manera constitutiva. Esto demuestra que el olivo es particularmente sensible al etileno y deja abiertas nuevas perspectivas sobre el mecanismo de regulación de la ruta de señalización del etileno en plantas.

3. El etileno podría regular la apertura floral de olivo principalmente a través de la expresión de los genes *OeACS* y *OeACO*, encontrándose una correlación negativa entre el contenido de ACC y la división celular durante el desarrollo temprano del fruto.
4. Los datos referentes a la contribución del endocarpo y mesocarpo al contenido de ACC durante el desarrollo del fruto son novedosos. Tomando en su conjunto los resultados obtenidos con la actividad transcripcional podemos concluir que la semilla del fruto en olivo participa en el contenido de ACC y en la expresión de *OeACS* y *OeACO* durante la fase S1.
5. Los resultados de este trabajo muestran que el fruto de "Arbequina" no presenta aumento de la producción de etileno, del contenido de ACC y de la expresión del gen *OeACO* durante su maduración frente al fruto de "Picual" que produce 10 veces más de etileno e induce la expresión del gen *OeACO* durante su maduración; implicando exclusivamente al mesocarpo del fruto, en donde también tienen lugar las alteraciones más notables de ACC, ya que no fueron observadas diferencias en el contenido de ACC del endocarpo entre las variedades, siendo este contenido máximo durante la lignificación del endocarpo.
6. La comparación del nivel de expresión de los genes relacionados con etileno entre las dos variedades sugiere que la rápida evolución del proceso de maduración del fruto en "Picual" se caracteriza por un mayor nivel de expresión de *OeACO*, *OeACS* y *OeEIL*, cuando los comparamos con lo observado en la variedad "Arbequina" de lenta evolución. Estas diferencias encontradas tanto en los perfiles de expresión de estos genes como en la producción de etileno y los contenidos de ACC/MACC indican que la ruta de biosíntesis y señalización de etileno está sujeta a variación entre las variedades de olivo.
7. Los perfiles de expresión de estos genes en respuesta al etileno indican que la expresión de los genes *OeACS*, *OeACO* y *OeEIL* está regulada positivamente por etileno, la del gen *OeCTR* es constante en presencia de etileno y la de *OeERS* está regulada negativamente por etileno al inicio de la maduración del fruto de olivo en ambas variedades.



2.6. BIBLIOGRAFÍA

Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A. 1995. ACS4, a primary IAA responsive gene encoding ACS in *A. thaliana*. *J. Biol. Chem.* 270: 19093-19099.

Abeles FB, Morgan PW, Salveit ME. 1992. Ethylene in plant biology. Academic Press Inc, San Diego, CA

Adams-Phillips L, Barry C, Kannan PM, Leclercq J, Bouzayen M, Giovannoni J. 2004. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members distinct regulatory features. *Plant Mol. Bio.* 54: 387-404

Agusti M. 2000. Crecimiento y maduración del fruto. *En: J. Azcón-Bieto., M. Talón. (eds.), pp. 419-434. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill, Interamericana.*

Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez, HM. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavour biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647-661.

Alabadí D, Agüero MS, Pérez-Amador MA, Carbonell J. 1996. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries. *Plant Physiol* 112:1237-1244.

Alba R, Cordonnier-Pratt MM, Bouwmeester HJ. 2000. Fruit localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.* 123: 363-370.

Alexander L, Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055.

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284, 2148–2152.

Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR. 2003. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2992-2997.

- Amrhein N, Schneidbeck D, Skorupka H, Tophof S, Stockigt J. 1981.** Identification of a major metabolite of the ethylene precursor ACC in higher plants. *Naturwissenschaften* 68: 679-690.
- Andrews TT, Lorimer GH. 1987.** Rubisco: Structure, mechanisms, and prospects for improvement. En: *The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise* 10, Photoynthesis (M.D. Hatch and NK Boardman, eds), pp 131-218.
- Aravind L, Ponting CP. 1997.** The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Science*. 22: 458-459.
- Argueso CT, Hansen M, Kieber JJ. 2007.** Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26:92-105.
- Arteca JM, Arteca RN. 1999.** A multi-responsive gene encoding ACS (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol. Biol.* 39: 209-219.
- Ayub R, Guis M, Ben Amor M, Gillot L, Roustand JP, Latché A, Bouzayen M, PECH JC. 1996.** Expression of ACO antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotech* 14: 862-866.
- Balagué C, Watson CF, Turner AJ, Rouge P, Picton S, Pech JC, Grierson D. 1993.** Isolation of ripening and wounding induced cDNA from *C. melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur. J. Biochem.* 212: 27-34.
- Banno K, Martin GC, Carlson RM. 1993.** The role of phosphorus as an abscission-inducing agent for olive leaves and fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118: 599-604.
- Barlow JN, Zhan Z, John P, Baldwin JE, Schofield CJ. 1997.** Inactivation of ACO involves oxidative modifications. *Biochem.* 36: 3563-3569.
- Barranco D, Arquero O, Navarro C, Rapoport HF. 2004.** Monopotassium phosphate for olive fruit abscission. *Hortscience* 39:1313-1314.
- Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L. 2008.** *El cultivo del olivo*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Sexta edición.
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D. 1996.** Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal* 9: 525-535.
- Barry CS, Giovannoni JJ. 2006.** Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103, 7923-7928.
- Barry CS, Llop-Tous I, Grierson D. 2000.** The regulation of ACS gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.* 123: 979-986.
- Bassett CL, Artlip TA. 1999.** Isolation of an ETR1 ethylene receptor homologue from peach (*P. persica* L. Batsch). *HortScience* 34: 542.

- Ben-Cheikh W, Pérez-Botella J, Tadeo FR, Talón M, Primo-Millo E. 1997.** Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol* **114**:557-564.
- Benichou M, Martínez-Reina G, Romojaro F, Pech JC, Latché A. 1995.** Partial purification and properties of a 36 kDa 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyl transferase from mung bean. *Physiol. Plant.* **94**: 629-634.
- Bertin N, Borel C, Brunel B, Cheniclet C, Causse M. 2003.** Do genetic makeup and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreduplication?. *Ann Bot* **92**:415-424.
- Bewley JD. 2003.** Seeds of hope; seeds of conflict. *En: Nicolás G, Bradford KJ, Côme D, Pritchard HW (eds.) The Biology of Seeds: Recent Research Advances*, pp. 1-10. CABI Publishing, Oxon OX10 8DE, UK.
- Beyer EM, Quebedeaux B. 1974.** Parthenocarpy in cucumber: mechanism of action of auxin transport inhibitors. *J Am Soc Hortic Sci* **99**(5):385-390.
- Bidonde S, Ferrer MA, Zegzouti H, Ramassamy S, Latché A, Pech JC, Hamilton AJ, Grierson D, Bouzayen M. 1998.** Expression and characterization of three tomato ACO cDNAs in yeast. *Eur. J. Biochem.* **253**: 20-26.
- Binder B, Walker J, Gagne J, Emborg T, Hemmann G, Bleecker A, Vierstra R. 2007.** The Arabidopsis EIN3 binding F-box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* **19**:509-523.
- Bleecker A, Estelle M, Somerville C, Kende H. 1988.** Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *A. thaliana*. *Science* **241**: 1086-1089.
- Bleecker A, Kende H. 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 1-18.
- Bleecker AB. 1999.** Ethylene perception and signalling: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Sci.* **4**: 269-274.
- Bleeker AB, Henyon WH, Somerville SC, Kende H. 1986.** Use of monoclonal antibodies in the purification and characterization of ACS, an enzyme in the ethylene biosynthesis. *PNAS* **83**: 7755-7759.
- Botella JR, Arteca RN, Frangos JA. 1995.** A mechanical strain-induced ACC-synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1595-1598.
- Bouzayen M, Latché A, Pech JC. 1990.** Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta* **180**: 175-180.
- Bouzayen M. 2002.** Ripening-associated transcriptional regulation in the tomato. A case of cross-talk between ethylene and auxin? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* **132**, S97.
- Bradford KJ. 2008.** Shang Fa Yang: Pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Science* **175**: 2–7.
- Brown KM. 1997.** Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum* **100**:567-576.

- Bui AQ, O'Neill SD. 1998. Three ACS genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol.* 116: 419-428.
- Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik GE, Amundses SS, Mandal A, Aalen RB. 2003. Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell* 15, 2296–2307.
- Cancel J, Larsen B. 2002. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and esaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1557-1567.
- Capitani G, Hohenster E, Feng L, Storici P., Kirsch FJ, Jansonius JN. 1999. Structure of ACS, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J. Mol. Biol.* 294: 745-756.
- Cara B, Giovannoni JJ. 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science* 175: 106-113.
- Celikel FG, van Doorn WG. 1995. Solute leakage, lipid peroxidation and protein degradation during the senescence of *Iris* tepals. *Physiologia Plantarum* 94, 515–521.
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ. 2003. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15: 545-559.
- Chae Hs, Kieber JJ. 2005. Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science* 10:291-296
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of products to two component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chang C, Stadler R. 2001. Ehylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *Bioessays.* 23:619-627.
- Chao Q, Rotherberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89:1133-1144.
- Chang YY, Chou SJ, Jiang WT, Chen ST, Yang SF. 2001. The catalytic mechanism of ACO. *Arch. Biochem. Biophys.* 385:179-185.
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE. 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277:19861-19866.
- Chen YF, Shakeel SN, Bowers J, Zhao XC, Etheridge N, Schaller GE. 2007. Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282:24752–24758.
- Chibi F, Matilla AJ. 1994. The involvement of ethylene in *in vitro* maturation of mid-binucleate pollen of *N. tabacum*. *J. Exp. Bot.* 45: 529-532.
- Choudhury SR, Roy S, Saha PP, Singh SK, Sengupta DN. 2008. Characterization of differential ripening pattern in association with ethylene biosynthesis in the fruits of five naturally occurring banana cultivars and detection of a GCC-box-specific DNA-binding protein. *Plant Cell Reports* 27:1235-1249.

- Christians MJ et al. 2008.** The eer5 mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J.* 55:467–477
- Christians MJ, Larsen PB. 2007.** Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in Arabidopsis seedlings. *J. Exp. Bot.* 58, 2237–2248
- Chung MC, Chou SJ, Kuang LY, Charng Y, Yang SF. 2002.** Subcellular localisation of ACO in apple fruit. *Plant Cell Physiol.* 43:549-554.
- Clark DG, Richards C, Hilioti Z, Lind-Iversen S, Brown K. 1997.** Effect of pollination on accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts, ethylene production and flower petal abscission in geranium (*Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey). *Plant Mol. Biol.* 34:855-865.
- Clark KL, Larsen PB, Wang XX, Chang C. 1998.** Association of the Arabidopsis CTR1 raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95:5401-5406.
- Cohen E, Kende H. 1987.** In vivo ACS activity in internodes of deepwater rice. Enancement by submergence and low oxygen levels. *Plant Physiol.* 84:282-286.
- Cohen JD. 1996.** In vitro tomato fruit cultures demonstrate a role for IAA in regulating fruit ripening. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121:520-524.
- Conde C, Delrot S, Gero H. 2008.** Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J Plant Physiol* 165:1545–1562.
- Cosgrove DJ, Gilroy S, Kao T, Ma H, Schult C. 2001.** Plant signaling 2000. Cross talk among geneticists, physiologists and ecologists. *Plant Physiol.* 124:499-505.
- Cuevas J, Rapoport HF, Rallo L. 1995.** Relationships among reproductive processes and fruitlet abscisión in 'Arbequina' olive. *Advances in Horticultural Science* 2:92-96.
- Cuevas J. 1992.** Incompatibilidad pollen-pistilo, procesos gaméticos y frutificación de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Sec. Biológicas. Universidad de Córdoba.
- Dal Cin V, Danesin M, Boschetti A, Dorigoni A, Ramina A. 2005.** Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). *Journal of Experimental Botany* 56:2995-3005.
- Dal Cin, V., Rizzini, F.M., Botton, A., Tonutti, P. 2006.** The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 42 (2), pp. 125-133.
- De la Rosa R, James CM, Tobuk KR. 2004.** Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *Hortscience* 39:351-354.
- Deikman J, Xu R, Kneissl ML, Ciardi JA, Kim KN, Pelah D. 1998.** Separation of cis elements responsive ethylene, fruit development, and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related E8 gene. *Plant Mol. Biol.* 37: 1001-1011.

- Dervinis C, Clark DG, Barrett JE, Nell TA. 2000. Effect of pollination and exogenous ethylene on accumulation of ETR1 homologue transcripts during flower petal abscission in geranium (*Pelargonium hortorum* L.H. Bailey). *Plant Molecular Biology* 42:847–856.
- Díaz A, Martín A, Rallo P, Barranco D, Dela Rosa R. 2006. Self incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olives assessed by SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131:250-251.
- Dong JG, Kim WT, Yip WK, Thompson GA, Li L, Bennet AB, Yang SF. 1991. Cloning of a cDNA encoding ACS and expression of its mRNA in ripening apple. *Planta* 185:38-45.
- Ecker JR. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268:667-675.
- El-Sharkawy I, Jones B, Li ZG, Lelievre JM, Pech JC, Latche A. 2003. Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *Journal of Experimental Botany* 54: 1615-1625.
- El-Sharkawy I, Kim WS, El-Kereamy A, Jayasankar S, Svircev AM, Brown DCW. 2007. Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina* L.). *Journal of Experimental Botany* 58:3631-3643.
- Evensen K. 1991. Ethylene responsiveness changes in *Pelargonium x domesticum* florets. *Physiol. Plant.* 82:409-412.
- Extremera G, Rapoport HF, Rallo L. 1988. Caracterización del saco embrionario en olivo (*Olea europaea* L.). *Anales Jardín Botánico Madrid* 45:197-211.
- Fernández MC, Rodríguez-García MI. 1988. Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytologist* 108:91-99.
- Fernández MJ et al. 1985. *Biología de la Aceituna de Mesa*. Instituto de la Grasa y sus derivados. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid-Sevilla.
- Fernandez-Otero C, Matilla AJ, Rasori A, Ramina A, Bonghi C. 2006. Regulation of ethylene biosynthesis in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. *Syriaca*). *Plant Science* 171, 74–83.
- Fernández-Otero CI, Torre FDL, Iglesias R, Rodríguez-Gacio MC, Matilla AJ. 2007. Stage- and tissue-expression of genes involved in the biosynthesis and signalling of ethylene in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia*) *Plant Physiology and Biochemistry* 45:199-208.
- Ferrandiz C, Pelaz S, Yanofsky MF. 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Ann. Rev. Biochem.* 99:321-354.
- Ferrandiz C. 2002. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 53:2031-2038.
- Flores F, Ben-Amor M, Jones B, Pech JC, Bouzayen M, Latche A, Romojaro F. 2001. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiol. Plantarum* 113:128-133.
- Fluhr R, Mattoo AK. 1996. Ethylene biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:479-523.

- Fray RG, Grierson D. 1993. Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends Genet.* 9:438-443.
- Gagne J, Smalle J, Gingerich D, Walker J, Yoo S, Yanagisawa S, Vierstra R. 2004. Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6803-6808.
- Gallardo M, Delgado MM, Sánchez-Calle I, Matilla A. 1991. Ethylene production and 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. Seeds. *Plant Physiol.* 97:122-127.
- Gallardo M, Sánchez-Calle I, Muñoz de Rueda P, Matilla AJ. 1996. Alleviation of thermoinhibition in chickpea seeds by putrescine involves the ethylene pathway. *Aust. J. Plant Physiol.* 23:479-487.
- Gamble R, Coonfield M, Schaller GE. 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *A. thaliana*. *PNAS (USA)* 95:7825-7829.
- Gao Z, Chen Y, Randlett MD, Zhao X, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. 2003. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biology Chemistry* 278, 34725-34732.
- García García L. 2006. Autopolinización y polinización cruzada en condiciones estrictas de aislamiento. Trabajo Profesional Fin de Carrera. Universidad de Córdoba.
- García-Martínez JL, Carbonell J. 1980. Fruit-set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L.: influence of plant-growth regulators. *Planta* 147:451-456.
- García-Martínez JL, Martí M, Sabater T, Maldonado A, Vercher Y. 1991. Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiol Plant* 83:411-416.
- Giovannoni JJ. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 25-749.
- Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:170-180
- Giovannoni JJ. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10:283-289.
- Gomez-Jimenez MC, García-Olivares E, Matilla AJ. 2001. ACO from embryonic axes of germinating chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds: cellular immunolocalization and alterations in its expression by IAA, ABA and spermine. *Seed Science Research* 11:243-253.
- Gomez-Jimenez MC, Matilla AJ, Garrido D. 1998. Isolation and characterization of a cDNA encoding an ACO from *Cicer arietinum* and its expression during embryogenesis and seed germination. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:765-773.
- Gomez-Jimenez MC, Paredes MA, Gallardo M, Fernandez-Garcia N, Olmos E, Sanchez-Calle IM. 2010. Tissue-specific expression of olive S-adenosyl methionine decarboxylase and spermidine synthase genes and polyamine metabolism during flower opening and early fruit development. *Planta* 232:629-647.

- Gomez-Jimenez MC, Matilla AJ. 2006. Cloning of a cDNA-encoding ACC synthase and its mRNA expression during zygotic embryogenesis of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Plant Growth Regul* 50:101-110
- Goren R, Huberman M, Martin GC. 1998. Phosphorus-induced leaf abscission in detached shoots of olive and citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123:545-549.
- Gray JE, Picton S, Giovannoni JJ, Grierson D. 1994. The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate fruit ripening. *Plant Cell Environ.* 17:557-571.
- Gray JE, Picton S, Shabbeer J, Schulch W, Grierson D. 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol Biol.* 19:69-87.
- Grierson D, Schuch W. 1993. Control of ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Serie B* 342:241-250.
- Grierson D, Tucker GA, Keen J, Ray J, Bird CR, Schuch W. 1986. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucl. Acid. Res.* 14:8595-8603.
- Griggs WH, Hartmann HT, Bradley MV, Iwakiri BT, Whisler JE. 1975. Olive pollination in California. *California Agricultural Station Bulletin*, 869.
- Guo H, Ecker J R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol*, 7(1): 40-49.
- Guo H, Ecker J. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCFEBF1/EBF2-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115:667-677
- Guo L, Arteca RN, Phillips AT, Liu Y. 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid malonyltransferase from etiolated mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 100:2041-2045.
- Gupta K, Anderson JD. 1989. Influence of temperature on potentiation of cellulysin-induced ethylene biosynthesis by ethylene. *Plant Cell Physiol.* 30:345-349.
- Guzman P, Ecker JR. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.
- Hackett RM, HO CW, Lin Z, Foote HCC, Fray RG, Grierson D. 2000. Antisense inhibition of the Nr gene restores normal ripenin to the tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiol.* 124:1079-1085.
- Hadfield KA, Dang T, Guis M, Pech JC, Bouzayen M, Bennet AB. 2000. Characterization of ripening-regulated cDNAs and their expression in ethylene-suppressed Charentais melon fruit. *Plant Physiology* 122:977-983.
- Hall AE, Bleecker AB. 2003. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2-dependent. *The Plant Cell* 15:2032-2041.
- Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler CE, Bleecker AB. 2000. Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 123:1449-1457.

- Hall LN, Bird CR, Picton S, Tucker G, Seymour GB, Grierson D. 1994. Molecular characterisation of cDNA clones representing pectin esterase isozymes from tomato. *Plant Mol. Biol.* 25:313-318.
- Hamilton AJ, Lycee GW, Grierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-287.
- Harada T, Torii Y, Morita S, Onodera R, Hara Y, Yokoyama R, Nishitani K, Satoh S. 2010. Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening. *Journal of Experimental Botany*, 1-9.
- Hegg EL, Que L. 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad, an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron (II) enzymes. *Eur. J. Biochem.* 250:625-629.
- Henskens JAM, Rouwendal GJA. 1994. Molecular cloning of two different ACS PCR fragments in carnation flowers and organ-specific expression of the corresponding genes. *Plant Mol Biol* 26: 453-458.
- Henzi MX, Mcneil DL, Christey MC, Lill RE. 1999. A tomato antisense ACO gene causes reduced ethylene production in transgenic broccoli. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 179-183.
- Hernandez Sebastia C, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC. 2004. Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428:81-91.
- Higashi K, Hosoya K, Ezura H. 1999. Histological analysis of fruit development between two melon (*Cucumis melo* L. reticulatus) genotypes setting a different size of fruit. *J Exp Bot* 50:1593-1597
- Hoeberichts FA, van Doorn WG, Vorst O, Hall RD, van Wardragen MF. 2007. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany* 58:2873-2885.
- Hoffman NE, Liu Y, Yang SF. 1983. Changes in MACC content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and ACC content. *Planta* 157:518-523.
- Holden MJ, Marty JA, Sing-Cundy A. 2003. Pollination induced ethylene promotes the early phase of pollen tube growth in *Petunia inflata*. *J. Plant Physiol.* 160:261-269.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM. 1995. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* 269: 1712-1714.
- Hua J, Meyerowitz EM. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *A. thaliana*. *Cell* 94:261-271.
- Hua J, Sakai H, Nourizadech S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM. 1998. EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10:1321-1332.
- Huai Q, Xia Y, Chen Y, Callahan B, Li N, Ke H. 2001. Crystal structures of ACS in complex with AVG and PLP provide new insight into catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 276:38210-38216.

- Huang Y, Hui L, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ. 2003.** Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant J.* 33: 221-233.
- Hunter DA, Lange NE, Reid SM. 2004.** Physiology of flower senescence. In: Nooden LD, ed. *Plant cell death processes*. San Diego, CA: Academic Press, 307-318.
- Imaseki H. 1999.** Control of ethylene synthesis and metabolism. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. PJJ, Hooykaas, MA, Hall, KR. Libbenga (Eds.). Elsevier Science N.Y, 209-245.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990.** High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Iordachescu M, Verlinden S. 2005.** Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *Journal of Experimental Botany* 56, 2011-2018.
- Jiao XZ, Philosoph-Hadas S, Su LY, Yang SF. 1986.** The conversion of ACC to MACC in plant tissues. *Plant Physiol.* 81:637-641.
- Johnson PR, Ecker JR. 1998.** The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32: 227-254.
- Jones ML, Woodson WR. 1997.** Pollination-induced ethylene in carnation: role of stylar ethylene in corolla senescence. *Plant Physiol.* 115:205-212.
- Jones ML, Woodson WR. 1999.** Differential expression of three members of the ACS gene family in carnation. *Plant Physiol.* 119:755-764.
- Katz E, Lagunes PM, Riov J, Weiss D, Goldschmidt EE. 2004.** Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta* 219:243-252.
- Kende H. 1993.** Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:283-307.
- Kendrick MD, Chang C. 2008.** Ethylene signaling: New levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:479-485.
- Kevany BM, Tieman DM, Taylor MG, Cin VD, Klee HJ. 2007.** Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant Journal*, 51 (3), pp. 458-467.
- Kieber JJ, Rothember M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. 1993.** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of the protein kinases. *Cell* 72:427-441.
- Kim WT, Yang SF. 1992.** Turnover of ACS in wounded tomato tissues. *Plant Physiol.* 100:1126-1130.
- King JR. 1938.** Morphological development of the fruit of the olive. *Hilgardia* 11:437-458.
- Klee HJ, Clark DG. 2002.** Manipulation of ethylene synthesis and perception in plants: The ins and the outs. *Hortscience* 37:450-452.

- Klee HJ, Clark DG. 2004. Ethylene signal transduction in fruits and flowers. En: PJ Davies (ed.), *Plant Hormone: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Acad. Pub., London, 369-390.
- Klee HJ. 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *J. Exp. Bot.* 53:2057-2063.
- Knapp S. 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* 53:2001-2022.
- Kortstee AJ, Appeldoorn NJG, Oortwijn MEP, Visser RGF. 2007. Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta* 226:929-939.
- Kosugi S, Ohashi Y. 2000. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Research* 28, 960-967.
- Kuroda S, Hakata M, Hirose Y, Shiraishi M, Abe S. 2003. Ethylene production and enhanced transcription of an ethylene receptor gene, ERS1, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:812-820.
- Kuroda S, Hirose Y, Shiraishi M, Davies E, Abe S. 2004. Coexpression of an ethylene receptor gene, ERS1, and ethylene signaling regulator gene, CTR1, in *Delphinium* during abscission of florets. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:745-751.
- Kyte M, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. 1994. The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6:521-530.
- Larsen PB, Ashworth EN, Jones MI, Woodson WR. 1995. Pollination-induced ethylene in carnation: role of pollen tube growth and sexual compatibility. *Plant Physiol.* 108:1405-1412.
- Larsen PB, Cancel JD. 2003. Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis* eer1 mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant J.* 34:709-718.
- Lashbrook CC, Tieman DM, Klee HJ. 1998. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.* 15:243-252.
- Lasserre E, Bouquin T, Hernández JA, Bull J, Pech JC, Balagué C. 1996. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Gen. Genet.* 251:81-90.
- Lavee S, Datt Z. 1978. The necessity of cross-pollination for fruit set of Manzanillo olives. *Journal of Horticultural Science*, 53:261-266.

- Lay VJ, Prescott AG, Thomas PG, Jhon P. 1996. Heterologous expression and site-directed mutagenesis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from kiwi fruit. *Eur. J. Biochem.* 242:228-234.
- Leclercq J, Adams-Phillips LC, Zegzouti H, Jones B, Latché A, Giovannoni JJ, Pech JC, Bouzayen M. 2002. LeCTR1, a Tomato CTR1-Like Gene, Demonstrates Ethylene Signaling Ability in Arabidopsis and Novel expression Patterns in Tomato. *Plant Physiol.* 130:1132-1142.
- Lee JH, Deng XW, Kim WT. 2006. Possible role of light in the maintenance of EIN3/EIL1 stability in Arabidopsis seedlings. *Biochem Biophys Res Comm* 350:484-491.
- Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Planto* 101:727-739.
- Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101:727-739.
- Li J, Yuan R. 2008. NAA and Ethylene Regulate Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Perception, and Cell Wall Degradation During Fruit Abscission and Ripening in 'Delicious' Apples. *Journal of Plant Growth Regulation* 27:283-295.
- Li N, Mattoo AK. 1994. Deletion of the C-terminal region of ACS, a key enzyme in the biosynthesis of ethylene, results in catalytic hyperactive, monomeric enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 6908-6917.
- Lieberman M. 1979. Biosintesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:533-591.
- Lin Z, Zhong S, Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 12, pp. 3311-3336.
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF. 1985. Promotion by ethylene of the capability to convert ACC to ethylene in preclimateric tomato and cantaloupe fruits. *Plant Physiol.* 77:407-411.
- Liu Y, Zhang S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16:3386-3399.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D. 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol.* 123:971-978.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano J, Solano R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165-178.
- Lu CG, Zanail Z, Tucker GA, Lycett GW. 2001. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab1 GTPase gene. *The Plant Cell* 13:1819-1833.
- Ma N, Cai L, Lu WJ, Tan H, Gao JP. 2005. Exogenous ethylene influences flower opening of cut rose (*Rosa hybrida*) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *Science in China, Series C* 48, 434-444.

- Ma N, Tan H, Liu XH, Xue JQ, Li YH, Gao JP. 2006.** Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha. *Journal of Experimental Botany* 57:2763-2773.
- Martin MN, Saftner RA. 1995.** Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid malonyltransferase from tomato fruits. *Plant Physiol.* 108:1241-1249.
- Martínez-Reina G, Matilla AJ, Martín-Remesal C, Gallardo M, Muñoz de Rueda P. 1996.** Biochemical properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyltransferase activity from early growing embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *J. Exp. Bot.* 47:1771-1778.
- Matilla AJ. 2000.** Ethylene in seed formation and germination. *Seed Sci. Res.* 10:111-126.
- Maunder M, Holdsworth M, Slater A, Knapp J, Bird C. 1987.** Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell* 10:177-184.
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Hubert O, Fils-Lycaon B, Chillet M, Baurens FC. 2008.** EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). *Physiologia Plantarum* 133:435-448.
- McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL. 1972.** Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 287:235-236.
- Miki T, Yamamoto M, Nakagawa H, Ogura N, Mori H, Imaseki H, Sato T. 1995.** Nucleotide sequence of a cDNA for ACS from melon fruits. *Plant Physiol.* 107:297-298.
- Miller AN, Walsh CS. 1990.** Indole-3-acetic acid concentration and ethylene evolution during early fruit development in peach. *Plant Growth Regul.* 9:37-46.
- Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL. 1993.** Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of fruit ripening gene. *PNAS, USA* 90:5939-5943.
- Mount SM, Chang C. 2002.** Evidence for a plastid origin of plant ethylene receptor genes. *Plant Physiol.* 130(1):10-4.
- Muller R, Andersen AS, Serek M. 1998.** Differences in display life of miniature potted rose (*Rosa hybrida* L.) *Scientia Horticulturae.* 76:59-71.
- Muller R, Lind-Iversen S, Stummann BM, Serek M. 2000a.** Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniatures rose. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 75:12-18
- Muller R, Owen CA, Xue ZT, Welander M, Stummann B. 2003.** The transcription factor EIN3 is constitutively expressed in miniature roses with differences in postharvest life. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 78:10-14.
- Muller R, Owen CA, Xue ZT, Welander M, Stummann BM. 2002.** Characterization of two CTGR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. *J. Exp. Bot.* 53:1223-1225.

- Muller R, Stummann BM, Serek M. 2000b. Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. *Plant Cell Reports*.19:1232-1239.
- Nadeau JA, Zhan XS, Nait H, O'Neill SD. 1993. Temporal and spatial regulation of ACO in the pollination-induced senescence of orchid flowers. *Plant Physiol*. 103:31-39.
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Inaba KY. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of ACS, ACO and ethylene receptors genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*. 118:1295-1305.
- Nicholass FJ, Smith CJS, Schuch W, Bird CR, Grierson D. 1995. High-levels of ripening-specific reporter gene-expression direct by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol. Biol*. 28:423-435.
- Nishiiyama K, Guis M, Rose JKC, Yasutaka K, Bennett KA, Wangjin L, Kato K, Ushijima K, Nakato R, Inaba A, Bouzayen M, Latche A, Pech JC, Bennet AB. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*. 17:1-10.
- O'Neill SD, Nadeu JA, Zhang XS, Bui AQ, Halevy AH. 1993. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell* 5:419-432.
- Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-439.
- Olmedo G, Guo H, Gregory B, Nourizadeh S, Aguilar-Henonin L, Li H, An F, Guzman P, Ecker J. 2006. ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 50 30 exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:13286-13293.
- Osborne DJ, Walters J, Milborrow BV, Norville A, Satange LMC. 1996. Evidence for a non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants. *Phytochem*. 42:51-60.
- Ottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell A. 1991. ACS in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol*. 222:937-961.
- Owino W, Ma B, Sun H, Shoji T, Ezura H. 2007. Characteristics of an ethylene inducible ethylene receptor Cm-ETR2 in melon fruit. *Advances in Plant Ethylene Research* 1:39-40
- Pang JH, Ma B, Sun H-J, Ortiz GI, Imanishi S, Sugaya S, Gemma H, Ezura H. 2007. Identification and characterization of ethylene receptor homologs expressed during fruit development and ripening in persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) *Postharvest Biology and Technology*. 44:195–203.
- Park KY, Drory A, Woodson WR. 1992. Molecular cloning of an ACS from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol*.18:377-386.
- Patterson SE, Bleeker AB. 2004. Ethylene-dependent and –independent processes associated with floral organ abscission in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134, 194-203.
- Payasi, A. Sanwal, G.G. 2010. Ripening of climacteric fruits and their control. *Journal of Food Biochemistry*. 34:679-710.

- Payton S, Fray RG, Brown S, Grierson D. 1996. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 31:1227-1231.
- Pech JC, Bouzayen M, Latché A. 2008. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science* 175:114-120
- Pech JC, Latché A, Bouzayen M. 2004. Ethylene biosynthesis. *En: PJ Davies (ed.), Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action.* Kluwer Acad. Pub., London, 115-136.
- Peck SC, Reinhardt D, Olson DC, Boller T, Kende H. 1992. Localization of the ethylene-forming enzyme from tomatoes, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, in transgenic yeast. *J Plant Physiol* 40:681-686.
- Pedreño MA, Bouzayen M, Pech JC, Marigo G, Latché A. 1991. Vacuolar release of MACC, the conjugated form of the ethylene precursor. *Plant Physiol.* 97:1483-1486.
- Perin C, Gomez-Jimenez MC, Hagen L, Dogimont C, Pech JC, Latche A, Pitrat M, Lelievre JM. 2002. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiology* 129:300-309.
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Aharoni N. 1985. Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf disc: enhancement of ACC conjugation. *Physiol. Plant.* 63:431-437.
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Pesis E, Reuveni A, Aharoni N. 1989. Hormone-enhanced ethylene production in leaves. *Biochemical and Physiological Aspects of the Ethylene Production in Lower and Higher Plants.* In: H. Clusters, M. De Proft, R. Marcelle, M. Van Poucke (Eds.). Kluwer Academic Press. Dordrech. Netherlands. p. 135.
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D. 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing and antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.* 3:469-481.
- Pogson BJ, Downs CG, Davies KM, Morris SC. 1995. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding ACS from broccoli. *Plant Physiol.* 108:857-858.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F Box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115:679-689.
- Prescott AG, John P. 1996. Dioxigenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:245-271.
- Puga-Hermida MI, Gallardo M, Matilla AJ. 2003. The zygotic embryogenesis and ripening of *B. rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated polyamines. *Physiol. Plant.* 111:279-288.
- Puga-Hermida MI, Gallardo M, Rodríguez-Gacio MC, Matilla A. 2003. The heterogeneity of turnip-tops (*Brassica rapa*) seeds inside the silique affects germination, the activity of the final step of the ethylene pathway, and abscisic acid and polyamine content. *Func. Plant Biol.* 30:767-775.

- Quarrie SA, Pekic Quarrie S, Radosevic R, Rancic D, Kaminska A, Barnes JD, Leverington M, Ceoloni C, Dodig D. 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *J Exp Bot* 57:2627-2637.
- Rallo L, Barranco D, Caballero JM, del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I. 2005. Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Rallo Morillo P. 1994. El papel de los procesos celulares y de la diferenciación en el crecimiento del fruto en cinco cultivares de olivo (*Olea europaea* L). ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Ramassamy S, Olmos E, Bouzayen M, Pech JC, Latché A. 1998. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase of apple fruit is periplasmic. *J. Exp. Bot.* 49:1909-1915.
- Rao M, Kembhavi A, Pant A. 1996. Implication of triptophan and histidine in the active site of endo-pgase from *Aspergillus ustus*: elucidation of the reaction mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* 1296:167-173.
- Rapoport HF, Manrique T. 2004. Cell Division and Expansion in the Olive Fruit. *Acta Hort.* 636: 461-463.
- Rapoport HF, Rallo L. 1991. Post-anthesis flower and fruit abscission in the olive cultivar 'Manzanillo'. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:720-723.
- Rapoport HF, Rallo L. 1991. Post-anthesis flower and fruit abscisión in the olive cultivar "Manzanillo". *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:720-723.
- Rasori A, Ruperti B, Bongui C, Tonutti P, Ramina A. 2002. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *J. Exp. Bot.* 53:2333-2339.
- Rasori A. 2001. Geni coinvolti nella biosintesi e percezione dell etilene in *Prunus persica* (L. Batsch). Tesis doctoral. Universidad de los Estudios de Padua.
- Reid MS, Evans RY, Dodge LL, Mor Y. 1989. Ethylene and silver thiosulphate influence opening of cut rose flowers. *Journal of the American Society of Horticulture Science* 114, 436-440.
- Reinhardt D, Kende H, Boller T. 1994. Subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in tomato cells. *Planta* 195:142-146.
- Rieu I, Mariani C, Weterings K. 2003. Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *Journal of Experimental Botany* 54:2239-2244.
- Robinson RW, Cantliffe DJ, Shannon S. 1971. Morphactin-induced parthenocarpy in the cucumber. *Science* 171:1251-1252.
- Robles LM et al. 2007. Arabidopsis enhanced ethylene response 4 encodes an EIN3-interacting TFIID transcription factor required for proper ethylene response, including ERF1 induction. *J. Exp. Bot.* 58:2627-2639.
- Rodrigo MJ, García-Martínez JL, Santes CM, Gaskin P, Hedden P. 1997. The role of gibberellins A1 and A3 in fruit growth of *Pisum sativum* L. and the identification of gibberellins A4 and A7 in young seeds. *Planta* 201:446-455.

- Rombaldi C, Lelièvre JM, Latché A, Petitprez M, Bouzayen M, Pech JC. 1994. Immunocytolocalization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in tomato and apple fruit. *Planta* 192:453-460.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down regulated during ripening and it is elevated in the mutant Delta. *Plant J.* 17:341-351.
- Ruperti B, Bonghi C, Rasori A, Ramina A, Tonutti P. 2001. Characterization and expression of two members of the peach ACO gene family. *Physiol. Plant.* 111: 336-344.
- Rzewuski G, Sauter M. 2008. Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Science* 175:32-42.
- Saftner RA, Baker JE. 1987. Transport and compartmentation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analogs, α -aminoisobutyric acid, in tomato pericarp slices. *Plant Physiol.* 84:311-317.
- Saftner RA, Baker JE. 1987. Transport and compartmentation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analogs, α -aminoisobutyric acid, in tomato pericarp slices. *Plant Physiol.* 84:311-317.
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM. 1998. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signalling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5812-5817.
- Sambrook J, Fritish EF, Maniatis T. 1989. "Molecular cloning. A laboratory Manual". CHS Laboratory Press, New York.
- Sato NK, Yuhashi KI, Higashi K, Hosoya K, Kubota M, Ezura H. 1999. Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiol.* 120:321-329.
- Sato T, Oeller PW, Theologis A. 1991. The ACS of Cucurbita. Purification, properties, expression in *E. coli*, and primary structure determination by DNA sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 266:3752-3759.
- Sato T, Theologis A. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6621-6625.
- Sato-Nara K, Yuhashi K-I, Higashi K, Hosoya K, Kubota M, Ezura H. 1999. Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiology*.119:321-329.
- Savin KW, Baudinette SC, Graham MW, Michael MZ, Nugent GD, Lu CY, Chandler SF, Cornish EC. 1995. Antisense ACO RNA delays carnation petal senescence. *HortSci.* 30:970-972.
- Schalagnhauser CD, Arteca RN, Pell EJ. 1997. Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in response to biotic and abiotic stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. *Plant Mol Biol.* 35:683-688.
- Schaller GE, Bleecker AB. 1995. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* 270:1809-1811.
- Schaller GE, Ladd AN, Lanaham MB, Spanbauer JM, Bleecker AB. 1995. The ethylene response mediator ETR1 from *A. thaliana* forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 270: 12526-12530.

- Schaller GE. 2003.** Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J. Biol. Chem.* 278: 34725-35732.
- Shibuya K, Nagata M, Tanikawa N, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S. 2002.** Comparison of mRNA levels of three ethylene receptors in senescing flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Experimental Botany* 53:399-406.
- Singh A, Evensen KB, Kao TD. 1992.** Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata*. *Plant Physiol.* 99:38-43.
- Smith JJ, John P. 1993.** Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/carbon dioxide. *Phytochem* 32:1381-1386.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR. 1998.** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE FACTOR1. *Genes Dev* 12:3703-3714.
- Spanu P, Boller T, Kende H. 1993.** Differential accumulation of transcripts of ACS genes in tomato plants infected with *Phytophthora infestans* and in elicitor-treated tomato cell suspensions. *J. Plant Physiol.* 141: 557-562.
- Spanu P, Grosskopf DG, Felix G, Boller T. 1994.** The apparent turnover of ACS in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol.* 106: 529-535.
- Stead AD. 1992.** Pollination-induced flower senescence: a review. *Plant Growth Reg.* 11:13-20.
- Stella L, Wouters S, Baldellon F. 1996.** Chemical and biochemical aspects of the biosynthesis of ethylene, a plant hormone. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 133:1141-1145.
- Stepanova AN, Alonso JM. 2005.** *Arabidopsis* ethylene signaling pathway. *Sci STKE* 22:276.
- Stepanova AN, Alonso JM. 2009.** Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol.* 12:548-55
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000.** Two-component signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* 69:183-215.
- Stratilová E, Dzurova M, Markovic O, Jornvall H. 1996.** An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase. *FEBS Letts.* 382:164-166.
- Talón M, Koornneef M, Zeevaart JAD. 1990.** Accumulation of C-19-gibberellins in the gibberellin-insensitive dwarf mutant *gai* of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Planta* 182:501-505.
- Tanase K, Ichimura K. 2006.** Expression of ethylene receptors DI-ERS1-3 and DI-ERS2, and ethylene response during flower senescence in *Delphinium*. *Journal of Plant Physiology* 163:1159-1166.
- Tang X, Gomes AMTR, Bhatia A, Woodson WR. 1994.** Pistil-specific and ethylene-regulated expression of ACO genes in petunia flowers. *Plant Cell* 6:1227-1239.

- Tang X, Wang H, Brandt AS, Woodson WR. 1993.** Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* 23: 1151-1164.
- Tang X, Woodson WR. 1996.** Temporal and spatial expression of ACO-mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiol.* 112:503-511.
- Tarum AS, Theologis A. 1998.** Complementation analysis of mutants of ACC reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. *J. Biol. Chem.* 273:12509 -12514.
- Tatsuki M, Endo A, Ohkawa H. 2007.** Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biol Technol* 43:28-35.
- Tatsuki M, Mori H. 2001.** Phosphorylation of tomato ACS, LE-ACS2, at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 276:28051-28057.
- Taylor JE, Whitelaw CA. 2001.** Signals in abscission. *New Phytol.* 151:323-339.
- Theologis A, Oeller PW, Wong LM, Rottmann WH, Gantz DM. 1993.** Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. *Dev. Gen.* 14:282-295.
- Thompson JD, Gibson TJ. 1997.** The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ. 2001.** Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J.* 26:47-58.
- Tieman DM, Klee HJ. 1999.** Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology* 120 (1):165-172.
- Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA, Klee HJ. 2000.** The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *PNAS (USA)* 97:5663-5668.
- Tonutti P, Bonghi C, Ruperti B, Torrielli GB, Ramina A. 1997.** Ethylene evolution and ACO gene expression during early development and ripening of peach fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122: 642-647.
- Tophop S, Martinoia E, Kaiser G, Hartung W, Amrhein N. 1989.** Compartmentation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and N-malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in barley and wheat mesophyll cells and protoplasts. *Physiol. Plant* 75:333-339.
- Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G. 2005.** Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *J. Exp. Bot.* 56(418): 2037-2046.
- Van der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman HM, Van Montagu M. 1990.** Cloning and sequence of two different cDNAs encoding ACS in tomato. *PNAS* 87:4859-4853.

- Van Doorn WG. 2002b.** Effect of ethylene on flower abscission: a survey. *Ann. Bot.* 89:689-693.
- van Doorn WG, van Meeteren U. 2003.** Flower opening and closure: a review. *Journal of Experimental Botany* 54:1801-1812.
- van Doorn WG, Woltering EJ. 2008.** Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* 59:453-480.
- Van Doorn WG. 2002a.** Does ethylene treatment mimic the effects of pollination on floral lifespan and attractiveness?. *Ann. Bot.* 89:375-383.
- Vangrosveld J, Clijsters H, Van Poucke M. 1988.** Phytochrome-controlled ethylene biosynthesis of intact etiolated bean seedlings. *Planta* 174:19-25.
- Ververidis P, Dilley DR. 1994.** Mechanism studies of CO₂ activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase. Evidence for a lysyl residue involvement. *Plant Physiol.* 105:33.
- Ververidis P, John P. 1991.** Complete recovery of *in vitro* ethylene-forming enzyme activity. *Phytochem.* 30:725-727.
- Vivian-Smith A, Koltunow A. 1999.** Genetic Analysis of Growth-Regulator-Induced Parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 121:437-451.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ. 1998.** Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *PNAS* 95: 4766-4771.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V. 2002.** A MADS-box gene necessary for ripening at the tomato *ripening-inhibitor* (*rin*) locus. *Science* 296:343-346.
- Vriezenw H, Van Rijn CPE, Voeselek LACJ, Mariani C. 1997.** A homolog of *Arabidopsis thaliana* *ERS* gene is actively regulated in *Rumex palustris* upon flooding. *Plant J.* 11:1265-1271.
- Wang K, Li H, Ecker JR. 2002.** Ethylene biosynthesis and signalling networks. *The Plant Cell, Sup* 2002:S131-S151.
- Wang NN, Yang SF, Charn Y. 2001.** Differential expression of ACS genes during orchid flower senescence induced by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant Physiol.* 126:253-260.
- Wang P, Zhang B, Li X, Xu C, Yin X, Shan L, Ferguson I, Chen K. 2010.** Ethylene signal transduction elements involved in chilling injury in non-climacteric loquat fruit. *Journal of Experimental Botany* 61:179-190.
- Wang WY, Hall AE, O'Malley R, Bleeker A. 2003.** Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *A. thaliana* is not required for signal transmission. *PNAS (USA)* 100:352-357.
- White MF, Vasquez J, Yang SF, Kirsch JF. 1994.** Expression of apple ACS in *E. coli*: kinetic characterization of wild-type and active-site mutant forms. *PNAS* 91:12428-12432.

- White PJ. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J. Exp. Bot.* 53:1995-2000.
- Whitelaw CA, Lyssenko NN, Chen L, Zhou D, Mattoo AK, Tucker ML. 2002. Delayed abscisión and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor LeETR1 transcript in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 128:978-987.
- Wiersma PA, Zhang H, Lu C, Quail A, Toivonen PMA. 2007. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of 'Sunrise' and 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biol Technol* 44:204-211.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Clark DG, Bleeker AB, Chang C, Meyerowitz EM, Klee HJ. 1997. A dominant mutant receptor from *A. thaliana* confers ethylene insensitivity in heterogeneous plants. *Nature Biotechnol.* 15:444-447.
- Willinson JQ, Lanahan MB, Yen H, Giovannoni JJ, Klee HJ. 1995. An ethylene- inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270:1807-1809.
- Wills RBH, McGlasson WB, Graham D et al. 1989. *Postharvest*. BSP Professional Books, Oxford.
- Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270:41-49
- Woeste KE, Ye C, Kieber JJ. 1999. Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are effected in post-transcriptional regulation of ACS. *Plant Physiol.* 119:521-529.
- Woltering EJ, Somhorst D, Van der Veer P. 1995. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence. *Plant Growth Regul.* 12:1-10.
- Woodson WR, Park KY, Drory A, Larsen PB, Wang H. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99:526-532.
- Woodson WR. 1994. Molecular biology of flower senescence in carnation. *In*: Scoot, R.J., Stead, A.D. (eds.). *Molecular and cellular aspects of plant reproduction* (Society for experimental biology seminar series, vol 55). Cambridge University Press, pp. 255-267.
- Xie C, Zhang JS, Zhou HL, Li J, Zhang ZG, Wang DW, Chen SY. 2003. Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. *Plant J.* 33:385-393.
- Xu ZC, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Hyodo H. 1998. Varietal differences in the potential to produce ethylene and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase between 'Kui mi' and 'Hong xin' of Chinese kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.*67:204-209.
- Xue J, Li Y, Tan H, Yang F, Ma N, Gao J. 2008. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. *Journal of Experimental Botany*, 59:2161-2169.

- Yamada K, Takahashi R, Fujitani C, Mishima K, Yoshida M, Joyce DC, Yamaki S. 2009.** Cell wall extensibility and effect of cell-wall-loosening proteins during rose flower opening. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 78, 242–251.
- Yamaguchi M, Haji T, Miyake M, Yaegaki H. 2002.** Varietal differences in cell division and enlargement periods during peach (*Prunus persica* Batsch) fruit development. *J Jpn Soc Hortic Sci* 71:155-163
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. 2000.** The ethylene-regulated expresión of CS-ETR2 and CS-ERS genes in cucumber plants and their posible involvement with sex expresión in flowers. *Plant Cell Physiol.* 41: 608-616.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J. 2003.** Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425:521-525.
- Yang SF, Dong JG, Fernández-Maculet JC, Olson DC. 1993.** Apple ACC oxidase: Purification and characterization of the enzyme and cloning of its cDNA. En: *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (JC Pech, A Lacthé y C. Balagué, eds), pp.65-69. Kluwerr, Dordrecht. ISBN 0-7923-2169-3.
- Yang SF, Hoffman NE. 1984.** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33: 103-119.
- Yau CP, Wang L, Yu M, Zee SY, Yip WK. 2004.** Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. *Journal of Experimental Botany* 55:547-556.
- Yen H, Lee S, Tankley S, Lanahan M, Klee HJ, Giovannoni JJ. 1995.** The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homologue of the *Arabidopsis ETR1* gene. *Plant Physiol.* 107:1343-1353.
- Yen H, Shelton A, Howard L, Vrebalov J, Giovannoni JJ. 1997.** The tomato *high pigment (hp)* locus maps to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality. *Theor. Appl. Genet.* 95:1069-1079.
- Yin X, Allan AC, Chen KS, Ferguson IB. 2010.** Kiwifruit EIL and ERF Genes Involved in Regulating Fruit Ripening. *Plant Physiology* 153:1280-1292.
- Yin XR, Chen KS, Allan AC, Wu RM, Zhang B, Lallu N, Ferguson IB. 2008.** Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signaling pathway in ripening kiwifruit. *Journal of Experimental Botany* 59:2097-2108.
- Yip WK, Dong JG, Kenny JW, Thompson GA, Yang SF. 1990.** Characterization and sequencing of the active site of ACC-synthase. *PNAS* 87:2475-2479.
- Yip WK. 1992.** Differential accumulation of transcripts for four tomato ACS homologs under various conditions. *PNAS* 89:2475-2479.

- Yokotani N, Tamura S, Nakano R, Inaba A, Kubo Y. 2003.** Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany* 54, 2775-2776.
- Yoo S, Cho Y, Tena G, Xiong Y, Sheen J. 2008.** Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signaling. *Nature* 451, 789–795
- Yoo SD, Cho Y, Sheen J. 2009.** Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* 14(5):270-9.
- Yoshida H, Nagata M, Saito K, Wang KL, Ecker JR. 2005.** Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biology* 5, 14.
- Yuan R, Carbaugh DH. 2007.** Effects of NAA, AVG, and 1-MCP on ethylene biosynthesis, preharvest fruit drop, fruit maturity, and quality of 'Golden Supreme' and 'Golden Delicious' apples. *HortScience* 42:101-105.
- Yueming J, Jiarui F. 2000.** Ethylene regulation of fruit ripening: molecules aspects. *Plant Growth Regul.* 30:193-200.
- Zarembiski TI, Theologis A. 1994.** Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol.* 26:1579-1597.
- Zegzouti H, James B, Frasse P, Arty C, Maitre B, Latche A, Pech JC, Bouzayen M. 1999.** Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *The Plant J.* 18:589-600.
- Zhang XS, O'Neill SD. 1993.** Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* 5:403-418.
- Zhong GV, Burns KB. 2003.** Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol Biol.* 53:117-131.
- Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo AK, Tucker ML. 1996.** The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.* 30: 1331-1338.
- Zhou H, Huxtable S, Xin H, Li N. 1998.** Enhanced high-level expression of soluble ACS and rapid purification by expanded bed adsorption. *Protein Expression Purification* 14:178-184.
- Zhou J, Rocklin AM, Lipscomb JD, Que L, Solomon EI. 2002.** Spectroscopic studies of ACO: molecular mechanism and CO₂ activation in the biosynthesis of ethylene. *J. Amer. Chem. Soc.* 124:4602-4609.
- Zhu Z, Guo H. 2008.** Genetic basis of ethylene perception and signal transduction in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 50:808–815.