



TESIS DOCTORAL

Estudios de genómica comparativa en especies vegetales de interés



Margarita Pérez Jiménez
Universidad de Córdoba
Córdoba, abril 2014

TITULO: *Estudios de genómica comparativa en especies vegetales de interés*

AUTOR: *Margarita Pérez Jiménez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

Estudios de genómica comparativa en especies vegetales de interés

Trabajo realizado en el Instituto de Agricultura Sostenible para optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias:

Margarita Pérez Jiménez

Dirigido por:

Dr. Gabriel Dorado Pérez

Dra. Pilar Hernández Molina

**Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular**

Científico Titular CSIC

Córdoba, abril de 2014



TÍTULO DE LA TESIS: Estudios de genómica comparativa en especies vegetales de interés

DOCTORANDA: Margarita Pérez Jiménez

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Margarita Pérez Jiménez ha recibido una completa formación en diversas técnicas de biología molecular de plantas. Dicha formación ha incluido el uso de diversas tecnologías genómicas de última generación. De este modo, ha estudiado la biodiversidad y genotipado material vegetal, para su aplicación en identificación de la variabilidad, mejora genética y trazabilidad. Así, la doctoranda ha aplicado técnicas de biología molecular para el análisis de la biodiversidad de la higuera (*Ficus carica*) y la trazabilidad del aceite de oliva.

Los resultados obtenidos mediante marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSR) han permitido generar por primera vez un dendrograma (árbol filogenético) compuesto por tres grandes agrupaciones de higueras andaluzas. Esta información es de gran relevancia para la identificación de la variabilidad genética, gestión y conservación del germoplasma de higuera, así como para su aplicación en programas de mejora genética de esta especie.

Por otra parte, se han desarrollado por primera vez marcadores moleculares de ADN cloroplástico para la trazabilidad del aceite de oliva, incluyendo denominaciones de origen protegidas (DOP). Se trata, además, de una relevante contribución a la colección de marcadores moleculares para la identificación y genotipado de olivos y acebuches de la cuenca mediterránea. La calidad de las investigaciones realizadas por la doctoranda queda reflejada en las publicaciones derivadas de las mismas, en revistas internacionales de reconocido prestigio:

Pérez-Jiménez M, López B, Dorado G, Pujadas-Salvá A, Guzmán G, Hernández P (2012): Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation. *Hereditas* 149: 108-113.

Pérez-Jiménez M, Besnard G, Dorado G, Hernández P (2013): Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS ONE* 8: e70507 (9 pp).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 26 de marzo de 2014

Firma de los directores

Fdo.: Gabriel Dorado Pérez

Fdo.: Pilar Hernández Molina

Después de estos años han sido tantas las personas que, en mayor o menor medida y a diferentes niveles, han contribuido en este trabajo que citarlas a todas sería imposible.

En primer lugar me gustaría expresar mi gratitud a los directores de esta tesis doctoral, Gabriel Dorado Pérez y Pilar Hernández Molina. Gracias por su dedicación, sus consejos y sus enseñanzas durante estos años de aprendizaje.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia. Muy especialmente y con un cariño infinito, a mis padres que siempre me acompañan como sólo los padres saben hacerlo, incondicionalmente.

A mis peques, Paquito y Candela. Disfrutar de ellos es siempre motivo de alegría y desconexión.

Agradecerle también a Jesús su paciencia, su dedicación, sus consejos siempre tan acertados, su ternura, su amor y su acompañamiento.

A la Hermandad “En tinto y otros caldos”, en la que he ingresado recientemente. Muy especialmente a la hermana “Sor Desmesura” cuyo nombre no hace alusión únicamente a sus excesos terrenales, sino también a los emocionales. Es todo un privilegio aprender de ti Hermana.

A mis recientes y tan añoradas compañeras: Leticia E, Teresa y Leticia V. Aunque es una lástima que nos hayamos encontrado al final de este camino, me alegro de poder compartirlo con vosotras.

A todos mis amigos, y en especial a Gloria, Alejandra, Carolina y Yolanda. Gracias por estar.

NOTAS: Los capítulos que conforman el siguiente documento son artículos que han sido publicados en diferentes revistas de investigación y se presentan íntegramente en formato PDF. El apartado de referencias bibliográficas contiene aquellas incluidas en el apartado de introducción, resultados y discusión.

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Uso de marcadores moleculares para la conservación de recursos fitogenéticos	
1.1. Conservación y caracterización de la agrobiodiversidad	8
1.2. Conservación de cultivos infrutilizados	10
1.3. La higuera como cultivo tradicional infrutilizado y su caracterización	10
1.3.1. Caracterización morfológica de la higuera	12
1.3.2. Caracterización genotípica de la higuera	13
2. Marcadores moleculares al servicio de la calidad de consumo	
2.1. Calidad y trazabilidad alimentaria	14
2.2. Denominaciones de origen e indicaciones geográficas	16
2.3. Trazabilidad en el aceite de oliva	17
2.3.1. Trazabilidad en el aceite de oliva mediante métodos analíticos	19
2.3.2. Trazabilidad en el aceite de oliva mediante marcadores moleculares nucleares	20
2.3.3. Trazabilidad en el aceite de oliva mediante marcadores moleculares cloroplásticos	22
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO I:	
<i>Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (Ficus carica L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation</i>	26
CAPÍTULO II:	
<i>Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling</i>	33

ÍNDICE

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMEN

Los microsatélites son marcadores moleculares ampliamente utilizados en estudios de biodiversidad, siendo particularmente útiles en la identificación varietal. Otra de las aplicaciones más recientes de los microsatélites se halla en el campo de la agroalimentación, siendo una herramienta útil en el desarrollo de sistemas de trazabilidad y autenticación. La comparación de secuencias y genomas (genómica comparativa) ha permitido recientemente desarrollar nuevas herramientas como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; del inglés, “Single Nucleotide Polymorphisms”) e inserciones/deleciones (del inglés, “indels”), que completan la cobertura genómica de los microsatélites. Los principales objetivos de esta tesis son el uso y evaluación de: i) marcadores microsatélite basados en secuencias nucleares, como herramientas en el estudio y caracterización de la agrobiodiversidad, en especies olvidadas e infrautilizadas (cultivos prometedores), como la higuera; y ii) marcadores microsatélite e inserciones/deleciones basados en la comparación de genomas de cloroplastos de olivo, para la identificación varietal y la aplicabilidad de ellos a la trazabilidad de los aceites de oliva de distintas variedades. Los resultados han demostrado que se trata de herramientas eficaces en la caracterización de este germoplasma local, poniendo de manifiesto la gran variabilidad que éste alberga. Todo ello ha permitido identificar variedades de olivo, tanto a partir de hoja como de aceite. Algunos de los haplotipos identificados pueden ser empleados en la trazabilidad del aceite de oliva.

ABSTRACT

Microsatellites are molecular markers widely used for biodiversity studies, being particularly useful in varietal identification. A more recent application of these markers is in the agrifood field, being a suitable tool for the development of authentication and traceability systems. Comparisons of sequences and genomes (comparative genomics) have recently allowed the development of new tools, such as single nucleotide polymorphisms (SNP) and insertions/deletions (indels), which complete the genomic coverage of microsatellites. The main goals of the present thesis are the use and evaluation of: i) nuclear sequence-based microsatellite markers, as a tool for the study and characterization of the agrodiversity in neglected and underutilized species (promising crops), such as the fig tree; and ii) microsatellite and indel markers, based on comparisons of genome chloroplast of the olive tree, for varietal identification and their application to the traceability of olive oils from different varieties. Nuclear sequence-based microsatellite markers have been selected to evaluate the germplasm agrodiversity in fig tree. The presence of unique alleles has allowed the discrimination amongst local populations. The results have demonstrated that these markers are effective tools in the characterization of this local germplasm, revealing a high level of variability. All this has allowed the identification of olive tree varieties, both from the leaves and from the olive oils. Some haplotypes could be used for olive-oil traceability purposes.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y uso de marcadores moleculares para la detección y la explotación de los polimorfismos presentes en el ADN es uno de los logros más significativos en el campo de la biología molecular. Desde 1980, los marcadores moleculares han sido una herramienta clave en Genética, tanto en el campo de la Mejora Vegetal como en otras aplicaciones. La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, “Polymerase Chain Reaction”) permite amplificar ácidos nucleicos *in vitro* (Mullis *et al.* 1986). De este modo, se desarrolló una nueva generación de marcadores moleculares, al inicio de la década de los 90, para identificar polimorfismos.

Entre todos ellos, los marcadores microsatélite, o secuencias repetidas simples (SSR; del inglés, “Simple Sequence Repeats”), fueron propuestos como los “marcadores de elección”. Entre sus características, destacan las siguientes: i) poseer carácter codominante; ii) exhibir un alto nivel de polimorfismo y poder de discriminación; iii) estar ampliamente distribuidos por todo el genoma; y iv) ser fácilmente automatizados, permitiendo además una sencilla interpretación de los resultados (Litt y Luty 1989; Tautz 1989; Powell *et al.* 1996). De hecho, estos marcadores han sido usados en numerosos estudios de genética de poblaciones y mapeo genético. Son útiles y eficaces en el análisis de la variabilidad genética de poblaciones silvestres, cultivadas y colecciones de germoplasma (Varshney *et al.* 2007; Kalia *et al.* 2011).

Por otra parte, estos marcadores moleculares pueden emplearse para la trazabilidad en el sector de la alimentación, a fin de garantizar el origen y detectar posibles fraudes. De este modo es posible certificar que los alimentos o sus componentes poseen un

INTRODUCCIÓN

origen conocido, y que éste se mantiene en cualquier punto de la cadena de suministro (Woolfe y Primrose 2004).



1. Uso de marcadores moleculares para la conservación de recursos fitogenéticos

1.1. Conservación y caracterización de la agrobiodiversidad

La agrobiodiversidad es un concepto amplio, en el cual se incluyen componentes de diversidad biológica relevantes para la alimentación y la agricultura. Ello engloba la biodiversidad de plantas, animales y microorganismos, necesarios para mantener las funciones principales de los agroecosistemas, así como de sus estructuras y procesos. El mantenimiento y la conservación de la diversidad biológica es fundamental, ya que de ella depende la capacidad de adaptación y el equilibrio de estos sistemas, lo cual es en última instancia necesario para mantener la producción agrícola (Cromwell *et al.* 2003).

La agricultura ha ido reduciendo el número de cultivos a lo largo del tiempo, al elegir los agricultores las especies con mayor rendimiento económico. A este efecto también ha contribuido la desaparición de las pequeñas parcelas familiares, generalmente ricas en biodiversidad, en favor de las grandes superficies de monocultivos. Los cultivos mayoritarios o megacultivos fueron la base de la denominada “Revolución Verde”, propiciada por programas intensivos de mejora genética que permitieron incrementar los rendimientos. No obstante, este tipo de cultivos suelen requerir altos insumos. Esta evolución de la agricultura ha servido para abastecer a una población cada vez más numerosa, pero ha tenido y está teniendo consecuencias negativas. Entre ellas se encuentran la reducción e incluso pérdida de variedades



tradicionales (“erosión genética”), junto con las prácticas agrícolas sostenibles asociadas a su cultivo (Mathur 2011).

Por suerte, la creciente concienciación de los organismos internacionales ha promovido iniciativas a fin de salvaguardar y conservar estos recursos genéticos en peligro. En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, (Convenio sobre la Diversidad Biológica, 1992) se propusieron dos opciones para la conservación de los recursos genéticos de la agrobiodiversidad: la conservación *in situ* y *ex situ*. La primera hace referencia a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales, con el objetivo de conservar las poblaciones en sus entornos naturales. En la segunda, la conservación de la diversidad de estos recursos se lleva a cabo fuera de sus hábitats naturales (bancos de germoplasma).

Aunque ambas estrategias de conservación son complementarias y a veces necesarias, la conservación *in situ* es más sostenible y dinámica. Así, permite no sólo la conservación de la especie de interés y su agroecosistema, sino también el mantenimiento del material genético y el entorno que originó su biodiversidad. Esta estrategia ha tenido especial relevancia en la protección de la diversidad genética de variedades silvestres afines a las cultivadas, cultivos ancestrales y variedades tradicionales o endémicas. En cualquier caso, los beneficios que ambas estrategias conllevan son evidentes. Sin embargo, para que estas sean eficientes, es fundamental llevar a cabo una caracterización, evaluación y catalogación adecuadas de los recursos genéticos en peligro (Karp *et al.* 1997).



1.2. Conservación de cultivos infrautilizados

Una de las iniciativas internacionales para proteger y potenciar la biodiversidad se ha centrado en la conservación, conocimiento y fortalecimiento de los denominados cultivos infrautilizados. Su objetivo es revalorizarlos, al tratarse de cultivos “prometedores” para el futuro. En su mayoría, suelen ser cultivos tradicionales que generalmente necesitan menos insumos, y que se encuentran adaptados a las condiciones locales. En el pasado, estas especies infrautilizadas fueron más ampliamente cultivadas, pero en la actualidad están cayendo en desuso, debido a diversos factores agronómicos, genéticos, económicos y culturales. Además, los propios agricultores encuentran que estos cultivos son menos competitivos que otras especies en el mismo entorno agrícola, desde un punto de vista económico. A este aspecto socio-económico puede unirse el declive eco-geográfico de estas especies, que puede llegar a erosionar su biodiversidad y limitar las opciones futuras de desarrollo (IPGRI 2002).

1.3. La higuera como cultivo tradicional infrautilizado y su caracterización

La higuera común (*Ficus carica* L.) pertenece a la familia Moraceae. Su origen se ubica en el suroeste de Asia y en el este de la región mediterránea. Se trata de uno de los cultivos más antiguos de esta zona. De hecho, algunos estudios sugieren que podría ser una de las primeras especies domesticadas por el hombre (Kislev *et al.* 2006).



La higuera, que originariamente era monoica, ha evolucionado a dioica; es decir, que tiene las flores de cada sexo en pies de planta separados. El denominado cabrahigo (higuera silvestre o bravía) es masculino, de infrutescencias no comestibles. Por su parte, el pie femenino es objeto de cultivo por sus infrutescencias (higos y brevas). Dentro de la forma femenina se encuentran cuatro tipos, clasificados de acuerdo a sus necesidades de polinización y cultivo. Por un lado están las conocidas como higueras “persistentes” o partenocárpicas, que no requieren polinización. Este grupo incluye dos tipos: uníferas, si producen una cosecha de higos al año; o bíferas, si producen dos cosechas (generalmente, una de brevas y otra de higos). En estas últimas, las brevas se forman sobre la madera vieja del año anterior, pasando el invierno sobre pequeños botones, madurando en junio. Posteriormente, estas higueras dan una segunda cosecha (la de higos), a partir de agosto. Por otro lado se encuentran aquellas variedades que necesitan polinización para la fructificación. Ésta es llevada a cabo por el himenóptero *Blastophaga psenes* L. (caprificación). En este grupo se incluyen las variedades de tipo San Pedro, que producen una primera cosecha de brevas sin necesidad de polinización, y una segunda de higos con caprificación. También son incluidas en este grupo las de tipo Esmirna, que producen una cosecha de higos con caprificación (Stover *et al.* 2007).

A pesar de ser la higuera uno de los cultivos más antiguos y tradicionales de la zona del Mediterráneo, ha ido decreciendo por diversas causas (urbanización, aumento de los cultivos intensivos, ausencia de caprificación, excesiva sequía, etc.) (Salhi-Hannachi *et al.* 2004). Aunque en los últimos años ha aumentado la demanda y



consumo de sus infrutescencias, la higuera se encuentra catalogada como un cultivo infrutilizado a día de hoy.

Este cultivo cuenta con un amplio número de variedades, así como una alta plasticidad y adaptabilidad fisiológica. Ello ha favorecido las sinonimias (los mismos cultivares con diferentes denominaciones) y homonimias (cultivares diferentes bajo la misma denominación), que dificultan la identificación varietal (Giraldo *et al.* 2010). Por estas razones, se han iniciado investigaciones a fin de identificar y preservar la diversidad genética de esta especie. Todo ello permitirá potenciar el desarrollo de este cultivo de una forma sostenible, y hacer que su mercado sea transparente y competitivo (Zonneveld *et al.* 2014).

1.3.1. Caracterización morfológica de la higuera

Una de las primeras herramientas usadas para la caracterización varietal de la higuera fue desarrollada por grupos internacionales de expertos (IPGRI-CIHEAM 2003). De esta forma se elaboró una lista de descriptores basados en características morfológicas. Sin embargo, a pesar de que la elección de estos rasgos se realiza en base a su estabilidad bajo diferentes condiciones del medio ambiente, la caracterización morfológica de la higuera es compleja, debido las peculiaridades de esta especie. Entre ellas se encuentra la existencia de dos cosechas diferentes (higos y brevas, como se ha indicado anteriormente), cuatro tipos de hojas, compleja estructura floral (inflorescencia), etc. Por otra parte, el gran número de descriptores morfológicos disponibles, así como la necesidad de su análisis durante un mínimo de dos años consecutivos, implica un alto coste de tiempo y recursos. Aún siendo



la selección de estos descriptores morfológicos cuidadosa, se trata de características fenotípicas que pueden verse afectadas por diferentes factores abióticos y bióticos. Por tanto, la clasificación morfológica puede ser ambigua e insuficiente para lograr una caracterización precisa de los cultivares de esta especie (Achtak *et al.* 2010).

1.3.2. Caracterización genotípica de la higuera

Los marcadores moleculares han sido usados para la identificación varietal y estudios de diversidad genética en especies frutales (Wünsch y Hormaza 2002). Los marcadores moleculares no están influenciados por el estado de desarrollo de la planta ni por las condiciones ambientales. Así, permiten resolver los problemas de la clasificación morfológica (Aradhya *et al.* 2010). De hecho, estos marcadores se han usado en la identificación varietal y en el análisis de la variabilidad genética (Cabrita *et al.* 2001; Khadari *et al.* 2005; Dalkilic *et al.* 2011). En particular, los microsatélites han sido descritos en la higuera como los marcadores moleculares más adecuados y eficientes en el análisis de la variabilidad, caracterización varietal, identificación de entradas en bancos de germoplasma, establecimiento de colecciones de referencia, detección de sinonimias y homonimias, y gestión de la biodiversidad (Khadari *et al.* 2003; Khadari *et al.* 2005; Saddoud *et al.* 2007; Giraldo *et al.* 2008; Achtak *et al.* 2010; Aradhya *et al.* 2010; Chatti *et al.* 2010; Do Val *et al.* 2013).



2. Marcadores moleculares al servicio de la calidad de consumo

2.1. Calidad y trazabilidad alimentaria

A raíz de las crisis alimentarias que se dieron en Europa en el siglo XX (la contaminación del aceite de colza, el accidente nuclear de Chernóbil, el rebrote de la fiebre aftosa, la encefalopatía espongiforme bovina, etc), apareció una preocupación generalizada sobre el origen de los alimentos. Esto llevó a cuestionar la efectividad de los sistemas de control alimentario implantados hasta la fecha. Paralelamente, diversos factores como el crecimiento de la población, el aumento de la urbanización y los avances tecnológicos promovieron cambios significativos en la producción de alimentos. En este marco, se hizo cada vez más necesaria la implantación de una mayor supervisión en cada uno de los eslabones involucrados en la cadena alimentaria, la cual parte desde los productores primarios hasta los consumidores. De este modo, se propuso alcanzar el objetivo principal de garantizar la calidad de los alimentos (Dalvit *et al.* 2007).

Esta necesidad llevó en 1997 a la aprobación del “Libro Verde” sobre los Principios Generales de la Legislación Alimentaria. De este manera, las autoridades comunitarias europeas promovieron un debate público sobre seguridad alimentaria. Como consecuencia, en el año 2000 se publicó el “Libro Blanco” sobre la Seguridad Alimentaria, en el que se describieron el conjunto de acciones necesarias para actualizar la legislación existente en la Unión Europea. Esta normativa tuvo como objetivo favorecer la aplicabilidad de la legislación y promover la recuperación de la



confianza del consumidor, alterada tras las crisis alimentarias mencionadas anteriormente. Ello llevó a un nuevo marco legislativo regulador, a través del Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento y el Consejo Europeo de 28 de enero. De este modo, quedaron establecidos los principios y requisitos de la legislación alimentaria, creándose la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Este reglamento se basó en el control de todas las etapas de producción y distribución de los alimentos. Asimismo, incluyó los principios de la aplicación de los análisis de riesgo, transparencia, trazabilidad y precaución.

Como consecuencia, tomó relevancia el concepto de trazabilidad alimentaria, que es “la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinados a ser incorporados en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo” (artículo 3 del Reglamento 178/2002). De este modo, se han aplicado normas para etiquetar e identificar productos alimentarios comercializados, tanto propios como importados en la Unión Europea (UE), desde el 1 de enero de 2005. El objetivo de este sistema es posibilitar la trazabilidad de los productos alimentarios en la cadena comercial. De esta forma, se garantiza el origen y la calidad, permitiendo detectar y retirar del mercado los productos defectuosos. Por tanto, la trazabilidad beneficia a consumidores y productores (Golan *et al.* 2003).



2.2. Denominaciones de origen e indicaciones geográficas

En el mercado agroalimentario actual existen productos de la misma categoría, pero con diferentes atributos. Por otro lado, los consumidores de los países desarrollados son cada vez más exigente, demandando productos con valor nutricional y de salud añadidos, con seguridad alimentaria y protección del medio ambiente. En este marco socio-económico actual ha surgido la necesidad de una identificación y diferenciación de los productos que se comercializan y consumen. Se trata, además, de una estrategia comercial que permite resaltar los atributos de ciertos productos frente a otros competidores. De esta forma, se puede identificar el valor añadido de un producto, que de otro modo pudiera no ser directamente evidente (Caputo *et al.* 2011).

Las demandas y exigencias citadas anteriormente, junto con la voluntad de algunos países de proteger sus producciones agrícolas, tradiciones, cultura y sostenibilidad ecológica, promovieron que la Unión Europea implantara tres etiquetas de calidad agroalimentaria. Se trata de la “Denominación de Origen Protegida” (DOP), la “Indicación Geográfica Protegida” (IGP) y la “Especialidad Tradicional Garantizada” (ETG) [Reglamento (EC) 2081/92, Reglamento (EC) No. 510/2006 hoy en día vigente] (Fig. 1). De este modo, al estar la calidad vinculada al origen, se contribuye al valor añadido del producto, contribuyendo a preservar los recursos locales y la diversidad (Sciarra y Gellman 2012).



Figura 1. Etiquetas de calidad agroalimentaria en la Unión Europea.

2.3. Trazabilidad del aceite de oliva

El aceite de oliva virgen es producido directamente a partir de la aceituna o fruto del olivo (*Olea europea* L.), usando únicamente métodos mecánicos y físicos. En otras palabras, el aceite de oliva virgen es un zumo de fruta. Este alimento es reconocido mundialmente por su valor nutricional, características organolépticas y beneficio para la salud, formando parte fundamental de la llamada “Dieta Mediterránea” (López-Miranda *et al.* 2010). De hecho, fue catalogado en 2004 por la Agencia de alimentos y medicamentos (FDA; del inglés, “Food and Drug Administration”) de los Estados Unidos de América (EE.UU.) como sustancia medicinal, debido a sus beneficios terapéuticos para reducir el riesgo de enfermedades coronarias (Roche *et al.* 2000). Las características peculiares del aceite de oliva dependen principalmente de la variedad de aceituna, pudiendo modificarse por factores edafoclimáticos (Di Vaio *et al.* 2013).

El aceite de oliva posee un valor económico superior al de otros aceites vegetales, debido principalmente al elevado coste de la mano de obra de su cultivo, incluyendo la recolección del fruto. Ello incrementa las probabilidades de fraudes: i) refinamiento, que está



expresamente prohibido para el aceite de oliva virgen; ii) adición de aceites de menor calidad; y iii) falsificación del origen geográfico (Gallina Toschi *et al.* 2013). Las certificaciones DOP e IGP pueden servir para identificar la calidad del aceite de oliva, protegiendo a productores y consumidores. Así, el número de DOP de aceites de oliva de España ha incrementado espectacularmente en los últimos años <<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>> (Tabla 1).

Tabla 1. Aceites con DOP en España (2013).

Nombre del aceite	Estado	Fecha
<i>Antequera</i>	P	15/10/2013
<i>Baena</i>	R	21/06/1996
<i>Baix Ebre-Montsià</i>	R	07/02/2008
<i>Bajo Aragón</i>	R	10/10/2001
<i>Campo de Calatrava</i>	R	30/06/2011
<i>Campo de Montiel</i>	R	22/06/2010
<i>Comunitat Valenciana</i>	P	25/09/2013
<i>Estepa</i>	R	09/10/2010
<i>Gata-Hurdes</i>	R	16/02/2007
<i>L'Empordà</i>	S	23/09/2013
<i>La Alcarria</i>	R	03/02/2009
<i>La Rioja</i>	R	11/03/2006
<i>Les Garrigues</i>	R	21/06/1996
<i>Lucena</i>	R	20/09/2013
<i>Mallorca</i>	R	12/08/2004
<i>Monterrubio</i>	R	07/03/2007
<i>Montes de Granada</i>	R	11/03/2006
<i>Montes de Toledo</i>	R	06/06/2000
<i>Montoro-Adamuz</i>	R	18/12/2010
<i>Navarra</i>	R	20/09/2013
<i>Poniente de Granada</i>	R	16/02/2007
<i>Priego de Córdoba</i>	R	05/10/1999
<i>Sierra de Cádiz</i>	R	05/02/2005
<i>Sierra de Cazorla</i>	R	10/10/2001
<i>Sierra de Segura</i>	R	21/06/1996
<i>Sierra de Moncayo</i>	R	04/12/2013
<i>Sierra de Mágina</i>	R	05/10/1999
<i>Siurana</i>	R	21/06/1996
<i>Terra Alt</i>	R	05/02/2005

- **R:** Registrada; **P:** Publicada; **S:** Solicitada.



De este modo, según el Reglamento (EC) No. 510/2006, un aceite de oliva certificado con las denominaciones DOP o IGP está sujeto al cumplimiento de una serie de requisitos, que incluyen la variedad, origen geográfico, prácticas agronómicas, tecnología de producción y ciertas cualidades organolépticas. Por consiguiente, a fin de proteger los derechos del consumidor y de los productores genuinos, el desarrollo de un sistema de trazabilidad y de autenticación del aceite de oliva, así como de certificación de varietal y del origen geográfico, se plantea como un importante reto.

2.3.1. Trazabilidad del aceite de oliva mediante métodos analíticos

Se pueden usar diversas técnicas para identificar y cuantificar los componentes del aceite de oliva. Entre ellas se encuentran las siguientes: i) cromatografía de gases (GC; del inglés, “Gas Chromatography”); ii) cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; del inglés, “High Performance Liquid Chromatography”); iii) cromatografía de fluido supercrítico (SFC; del inglés, “Supercritical Fluid Chromatography”); iv) espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS del inglés, “Near-InfraRed Spectroscopy”); v) resonancia magnética nuclear (NMR; del inglés, “Nuclear Magnetic Resonance”); y vi) métodos isotópicos. Estas técnicas permiten detectar los compuestos mayoritarios (triglicéridos y ácidos grasos libres) y minoritarios (hidrocarburos, fenoles, esteroides, compuestos volátiles, proteínas, pigmentos, tocoferoles, etc.) del aceite de oliva. Así, estas técnicas se han aplicado en la identificación y autenticación del aceite de oliva (Aparicio *et al.* 1997; Aparicio y Aparicio-Ruiz 2000;



Benincasa *et al.* 2003; Christy *et al.* 2004; Vichi *et al.* 2005; Cunha *et al.* 2006; Alonso-Salces *et al.* 2010; Faria *et al.* 2010; Zhao *et al.*, 2014).

Estos métodos analíticos asumen que variedades diferentes o con orígenes geográficos distintos también difieren en su composición química. Sin embargo, esta asunción no siempre es cierta. Así, algunos factores (condiciones ambientales, diferentes etapas del desarrollo de la planta o el propio proceso de extracción del aceite de oliva) pueden influir en la composición del aceite de oliva, dando lugar a resultados ambiguos o erróneos (Montealegre *et al.* 2009). Por consiguiente, el uso exclusivo de estas técnicas no garantiza de forma inequívoca la autenticidad del aceite de oliva y su origen varietal.

2.3.2. Trazabilidad del aceite de oliva mediante marcadores moleculares nucleares

La genómica alimentaria es la ciencia que estudia las relaciones entre el genoma humano, la nutrición y la salud (Molder y Gutteling 2003). Por su parte, los marcadores moleculares de ADN permiten resolver las limitaciones de los métodos analíticos mencionados anteriormente, al no depender de condicionantes medioambientales. Asimismo, el aumento de secuencias del genoma de olivo disponibles ha abierto nuevas posibilidades en la identificación varietal y la autenticación del aceite de oliva. Su aplicación es de especial interés en aceites de oliva que poseen las certificaciones de DOP o IGP. De hecho, estos métodos basados en el ADN han sido aplicados de forma satisfactoria en la identificación varietal del olivo, debido a su alto nivel de especificidad, sensibilidad y costes asumibles (Baldoni *et al.* 2009; Bracci *et al.* 2011).



No obstante, la aplicación de marcadores moleculares para la identificación y trazabilidad del aceite de oliva se enfrenta a problemas similares a los existentes en estudios de ADN antiguo y medicina forense. Ello es debido a que el aceite de oliva contiene poco ADN (diana hidrofílica en una matriz hidrofóbica), que además se encuentra bastante degradado (fragmentos muy pequeños). Esto último se debe probablemente a la liberación de nucleasas durante los procesos mecánicos de obtención del aceite de oliva (molturación). Afortunadamente, aunque estas dificultades siguen estando presentes, se han desarrollado metodologías basadas en marcadores moleculares nucleares con el objetivo de aplicarlas a trazabilidad del aceite de oliva (Muzzalupo y Perri 2002; Busconi *et al.* 2003; Breton *et al.* 2004). Entre ellos se encuentran los siguientes: i) microsátelites nucleares o secuencias repetidas simples nucleares (nuSSR; del inglés, “nuclear Simple Sequence Repeats”) (Muzzalupo y Perri 2002; Testolin y Orietta 2005; Ben-Ayed *et al.* 2009); ii) regiones amplificadas de secuenciadas caracterizadas (SCAR; del inglés, “Sequence-Characterized Amplified Regions”) (De la Torre *et al.* 2004; Pafundo *et al.* 2007); y iii) polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP; del inglés, “Amplified Fragment Length Polymorphisms”) (Pafundo *et al.* 2005).

De estos marcadores moleculares, los nuSSR se han propuesto como adecuados para los fines de trazabilidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen también se incluye generalmente el hueso o semilla (salvo raras excepciones de aceite de aceituna deshuesada). Pero el hueso contiene el embrión, cuyo ADN paterno puede proceder de un árbol perteneciente a otro cultivar. Esta contribución genética adicional podría ser detectada



por los marcadores nuSSR, generando resultados sesgados. Por tanto, estos marcadores nucleares debe usarse con precaución en la trazabilidad de aceites de oliva monovarietales (Doveri *et al.* 2006; Rabiei *et al.* 2010; Vietina *et al.* 2011).

2.3.3. Trazabilidad del aceite de oliva mediante marcadores moleculares cloroplásticos

El genoma cloroplástico presenta ventajas frente al nuclear para su uso en trazabilidad: i) herencia materna, frente al inconveniente de los alelos paternos citado en el apartado anterior; ii) gran número de copias por célula (de 10 a 10.000 por cloroplasto) (Bendich 1987), frente a la copia diploide del genoma nuclear del olivo; iii) circular, en lugar de lineal como el nuclear, y por lo tanto no degradable por exonucleasas (Alaeddini *et al.* 2010); iv) protegido por la doble membrana del cloroplasto, que es bastante resistente a la rotura (la doble envuelta del núcleo se rompe con facilidad), haciendo que sea menos vulnerable a la degradación; y v) baja tasa de mutación (Wolfe *et al.* 1987; Drouin *et al.* 2008).

Los marcadores basados en secuencias cloroplásticas han sido usados previamente en la detección de aceites vegetales de menor valor económico, con los que comúnmente se suele adulterar el aceite de oliva (Kumar *et al.* 2011). Estas secuencias también han sido evaluadas mediante la metodología de PCR a tiempo real (RT-PCR; del inglés, “Real Time PCR”) y temperatura de fusión de alta resolución (HRM; del inglés, “High-Resolution Melting”) (Ganopoulos *et al.* 2013).

Sin embargo, el escaso polimorfismo de las secuencias disponibles de cloroplastos ha dificultado su aplicación en la



identificación varietal del olivo y la trazabilidad del aceite de oliva. Afortunadamente, recientemente se han secuenciado varios genomas cloroplásticos del género *Olea* (Mariotti *et al.* 2010; Besnard *et al.* 2011). El análisis comparativo de estos genomas ha revelado polimorfismos en microsatélites mononucleotídicos (cpSSR; del inglés, “chloroplastic Simple Sequence Repeats”) e inserciones/deleciones, que han permitido desarrollar marcadores moleculares (Besnard *et al.* 2011). Dichos marcadores han resultado útiles para caracterizar el genoma de este orgánulo, tanto en variedades de olivo cultivadas como silvestres (acebuches) (Besnard *et al.* 2013; Pérez-Jiménez *et al.* 2013).

OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis es el análisis genómico comparativo basado en marcadores moleculares de tipo SSR (nuSSR y cpSSR) e inserciones/delecciones. El primer objetivo específico es el estudio de la variabilidad y caracterización genéticas de germoplasma de higuera, como especie infrautilizada. El segundo objetivo es la evaluación del uso de estos marcadores como una herramienta que pueda contribuir a establecer un sistema de trazabilidad en el aceite de oliva.

En el primer trabajo de esta tesis, publicado como “*Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (Ficus carica L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation*” (Perez-Jiménez *et al.* 2012), se evaluó la eficacia de marcadores microsatélite para caracterizar el germoplasma de denominaciones locales de higuera. Asimismo, se valoró si los resultados de este estudio podrían ser de utilidad en la elaboración de una estrategia de conservación *in situ* de este material.

Por su parte, en el segundo trabajo, publicado como “*Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling*” (Pérez-Jiménez *et al.* 2013), se evaluó la eficiencia de marcadores cloroplásticos (cpSSR e inserciones/delecciones) en la identificación varietal en olivo, además de su aplicabilidad y contribución a la trazabilidad de los aceites derivados de estas variedades.

CAPÍTULO I

Publicado como:

Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation.

Perez-Jiménez M., López B., Dorado G., Pujadas-Salvá A., Guzmán G. y Hernandez P. (2012). *Hereditas* 149, 108-13.

Brief Report

Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation

M. PEREZ-JIMÉNEZ¹, B. LÓPEZ², G. DORADO³, A. PUJADAS-SALVÁ⁴, G. GUZMÁN^{2,5} and P. HERNANDEZ¹

¹*Instituto de Agricultura Sostenible (IAS, CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain*

²*Centro de Investigación y Formación de Agricultura Ecológica y Desarrollo Rural (CIFAED), Camino del Jau s/n. Santa Fe, Granada, Spain*

³*Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain*

⁴*Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Jardín Botánico-Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain*

⁵*Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain*

Perez-Jiménez, M., López, B., Dorado, G., Pujadas-Salvá, A., Guzmán, G. and Hernandez, P. 2012. Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation. – *Hereditas* 149: 108–113. Lund, Sweden. eISSN 1601-5223. Received 7 May 2012. Accepted 8 May 2012.

The common fig tree (*Ficus carica* L.) is a Mediterranean crop with problematic cultivar identification. The recovery and conservation of possible local varieties for ecological production requires the previous genetic characterization of the available germplasm. In this context, 42 lines corresponding to 12 local varieties and two caprifigs, in addition to 15 reference samples have been fingerprinted using 21 SSR markers. A total of 77 alleles were revealed, detecting a useful level of genetic variability within the local germplasm pools. UPGMA clustering analysis has revealed the genetic structure and relationships among the local and reference germplasm. Eleven of the local varieties could be identified and defined as obtained clusters, showing that SSR analysis is an efficient method to evaluate the Andalusian fig tree diversity for on-farm conservation.

Pilar Hernandez, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS, CSIC), Alameda del Obispo s/n, ES-14080 Córdoba, Spain.
E-mail: phernandez@ias.csic.es

Food production and security are very dependent on the responsible use and conservation of the agrobiodiversity and the genetic resources. On-farm conservation is being promoted through international initiatives for the preservation of the genetic diversity of traditional varieties (ESQUINAS-ALCAZAR 2005). The common fig tree (*Ficus carica* L.) is a traditional crop along the Mediterranean basin, western and east Asia. Besides, the fig tree is naturally adapted to dry and arid climates with hot summers, developing a large root system to obtain water from soil many meters away from the trunk. Such kind of thermophilic trees may be useful to adapt to the consequences of the climate change and global warming, thus allowing to grow fig trees on hot and dry areas, where other species may not survive (SUGIURA et al. 2007).

The fig tree has not been subjected to intensive plant breeding programmes, and thus many fig tree populations exhibit a rich genetic biodiversity, that can only be fully exploited once it is properly identified and classified. Traditionally, the plant germplasm characterization with the aim of its conservation has been carried out using morphological or agronomical traits. Nevertheless, and

despite of the progress on the elaboration of descriptors, fluctuations among years, environments, or repetitions have made difficult its application until recently (GIRALDO et al. 2010). These fluctuations are especially important in common fig tree germplasm, and consequently the cultivar identification is very difficult for this species. Particularly, a high level of vagueness and incongruence has been found in the local cultivated material in southern Spain. Recently, the development of DNA markers provides a direct analysis of the genotype independently from the environmental interference. Therefore, the cultivar characterization should be completed by integrating molecular markers.

Currently, simple sequence repeats (SSR) or microsatellites are the markers of choice for breeding programs (HERNANDEZ 2005), due to their codominant nature, intraspecific polymorphism (which makes them highly informative), and easy automated detection by polymerase chain reaction (PCR). Genomic microsatellite markers have been developed for common fig tree in recent years (KHADARI et al. 2001, GIRALDO et al. 2005, ACHTAK et al. 2009) and were available for the present analysis.

They have already been used to characterize *ex situ* conserved cultivars (GIRALDO et al. 2005) as well as Moroccan (KHADARI et al. 2005, ACHTAK et al. 2010), Tunisian (SADDOUD et al. 2007) and Asian (IKEGAMI et al. 2009) local fig tree germplasm.

The present work has been approached as part of a preservation strategy for the conservation of both common fig tree germplasm and the traditional and local knowledge about its cultivation. The fig tree cultivation is a traditional activity for the sampled area of 'La Alpujarra Granadina', southern Spain, but at the moment this activity is threatened due to the area's depopulation, the poor condition of part of the plant material and the risk of introduction of plant material from other provenances without previously testing for adaptation to the area's local conditions. The past variability richness in the area and the organoleptic value of the figs is reported in the Spanish literature, for example as the 'famous figs' from Turón, both black and white types (ALARCÓN 1874). Together with the fig tree cultivation, the cultivation of almond, wheat and barley are mentioned for this village. At the present time, almond and fig tree cultivation coexist with grape cultivation, that was introduced during the twentieth century by immigrant farmers from the 'Levante' region, eastern Spain. With the aim to put into context the potential autochthonous genetic variability observed, as well as to detect possible introductions of exogenous material by these farmers, reference samples from *ex situ* collections from Levante and other provenances have been included in the analysis.

The present work is part of an effort for the characterization and on-farm conservation to generate value on the local fig tree germplasm, which is now threatened. We have fingerprinted a previously selected fig tree germplasm set and reference materials using microsatellite markers. The analysis of its genetic diversity using SSR markers has resulted an useful tool for guiding an *in situ* conservation strategy.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The selection of the analyzed material was based on a previous morphological and agronomical characterization, including interviews with farmers to integrate the local knowledge about the traditional names (or local denominations) (Guzmán-Casado et al. unpubl.). It consisted of 42 selected trees belonging to twelve local denominations (Table 1). Reference materials were chosen among representative samples of previously analyzed germplasm pools using the same SSR markers (GIRALDO et al. 2005). Additionally, samples of commercial and cultivated varieties from Spanish germplasm pools were

Table 1. *Local germplasm sampled.*

Accession	Common name	Location
PA20	Higuera Blanca de Pasa	Murtas
PA21	Higuera Blanca de Pasa	Turón
PA17	Higuera Blanca de Pasa	Murtas
PA18	Higuera Blanca de Pasa	Turón
PA15	Higuera Blanca de Pasa	Turón
PA16	Higuera Blanca de Pasa	Turón
PA19	Higuera Blanca de Pasa	Turón
CC47	Higuera de Carne Colorá	Turón
HC49	Higuera de Cobre	Turón
HC50	Higuera de Cobre	Mecina Tedel
HY26	Higuera Ayuela	Turón
HY22	Higuera Ayuela	Murtas
HY35	Higuera Ayuela	Turón
HY25	Higuera Ayuela	Turón
HY36	Higuera Ayuela	Jorairátar
HY31	Higuera Ayuela	Turón
CB27	Calabacilla Blanca	Murtas
CB43	Calabacilla Blanca	Turón
CN22	Calabacilla Negra	Turón
CN24	Calabacilla Negra	Turón
CN29	Calabacilla Negra	Jorairátar
CN28	Calabacilla Negra	Turón
CN30	Calabacilla Negra	Murtas
HR51	Higuera de Regalo	Turón
HR52	Higuera de Regalo	Turón
BB3	Brevera Blanca	Murtas
BB1	Brevera Blanca	Turón
BB32	Brevera Blanca	Turón
BB5	Brevera Blanca	Turón
BB33	Brevera Blanca	Murtas
BN7	Brevera Negra	Murtas
BN6	Brevera Negra	Turón
BN34	Brevera Negra	Mecina Tedel
BM10	Brevera Morada	Murtas
BM11	Brevera Morada	Turón
BM12	Brevera Morada	Mecina Tedel
HP54	Higuera de Pascua	Turón
HP55	Higuera de Pascua	Turón
HR37	Higuera Roela	Murtas
HR38	Higuera Roela	Turón
CA41	Caprifig	Turón
CA40	Caprifig	Turón

tested (for example, varieties traditionally cultivated in the Levante area from which migration of farmers to the Contraviesa region is known). All the reference material are listed in Table 2.

DNA isolation and SSR analysis

The DNA was isolated from fig tree leaves using the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method (MURRAY and THOMPSON 1980), as modified by HERNÁNDEZ et al. (2001). The concentration of each sample was estimated by comparing band intensity with lambda DNA of known

Table 2. Reference germplasm.

Accession	Name in tree (Fig. 1)	Origin
Pingo de Mel-8P	Ping	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Col de Dame Gris-8-2	Cuell	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Kadotta	Kado	Estación Experimental Agraria de Elche, Spain
Dauphine VII 3	Daup	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles
Brevera Blanca	BBCV	Local nursery at Córdoba, Spain
Marroco 19 (feral)	Marr	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Colar	Cola	Estación Experimental Agraria de Elche, Spain
Mission	Miss	Estación Experimental Agraria de Elche, Spain
Brown Turkey	Brtk	Estación Experimental Agraria de Elche, Spain
Albatera	Alba	Estación Experimental Agraria de Elche, Spain
Burjassote Noire-6-16	BurN	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Col de Dame Gris-8-2	Cdam	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Lampeira-8-1	Lamp	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Bellone-10-32	Bell	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France
Marsellaise-9-23	Mars	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France

concentrations under blue light using a DR195M “Dark Reader” transilluminator from Clare Chemical Research (Dolores, CO, USA), after 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis and staining with GelRed from Biotium (Hayward, CA, USA). Samples were extracted by triplicate for the local germplasm.

The previously isolated DNA was amplified using the M13 protocol based on 21 microsatellite primer sequences developed by KHADARI et al. 2001: MFC1, MFC2, MFC3, MFC4, MFC5, MFC6 and MFC8; and by GIRALDO et al. 2005: LMFC12, LMFC13, LMFC14, LMFC15, LMFC18, LMFC19, LMFC20, LMFC21, LMFC24, LMFC26, LMFC27, LMFC30, LMFC31 and LMFC38. A M13 primer sequence was added to the forward primer to allow detection with a common fluorescently labeled (VIC or FAM) M13 primer as described by TOBIAS et al. 2005.

Amplification reactions were carried out in 25 µl volume containing 0.2 µM of each PCR primer, 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM of MgCl₂, 1 unit of *Taq* DNA polymerase from Biotools (Madrid, Spain) and 50–100 ng of template DNA in the presence of 1 unit of *Taq* DNA polymerase, 50–100 ng of genomic DNA, 0.5 µM of marker-specific reverse primer, 0.033 µM markers-specific M13-tailed forward primer and 0.5 µM Hex- or FAM-labeled M13 primer, using a MyCycler Gradient thermocycler from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The PCR conditions were those described by KHADARI et al. 2001 and GIRALDO et al. 2005. Fragment sizes were resolved by capillary electrophoresis using an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Carlsbad, CA, USA) and further analyzed with the GeneScan 3.7 software from the same manufacturer.

Genetic variability analysis

A total of 21 polymorphic microsatellite markers were used for the genetic variability study, using 55 common

fig tree accessions. The statistical analysis, including the number of alleles per locus, allele frequencies, observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) and polymorphism information content (PIC) values, was carried out using the application PowerMarker 3.25 (LIU and MUSE 2005). The allele frequency data from PowerMarker was used to export the data in binary format. A genetic distance matrix using the Nei index (NEI and LI 1979) was calculated using PhylTools 1.32 (BUNTJER 1997), and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering was carried out using the Neighbor module in the Phylip 3.66 package (FELSENSTEIN 1993). The cophenetic correlation coefficient (CCC) of the generated dendrogram was computed using the visual Basic program for Microsoft Excel 2000 CCC (DIGHE et al. 2004). The CCC is the correlation coefficient (r) calculated from the linear regression between the corresponding values of the original distance matrix and the cophenetic matrix derived from the calculation of the UPGMA tree. The dendrogram was drawn using the Mega 3.1 software (KUMAR et al. 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The molecular analysis of the 57 common fig tree accessions using 21 microsatellite markers detected a total of 77 alleles. The number of alleles per locus ranged from 2 (for loci MFC5, MFC8, LMFC18, LMFC27 and LMFC31) to 9 alleles (for locus LMFC30), with a mean of 3.6 alleles per locus and a mean PIC of 0.456. The highest and lowest PIC values were scored for the loci LMFC30 and MFC5, respectively. For the local germplasm, the observed heterozygosities (H_o) were similar to the expected (H_e) for most of the primer pairs tested (Table 3), whereas for five primer pairs the H_o s were bigger than H_e s and for four primer pairs the situation was

Table 3. Summary of SSR genetic parameters for all the analyzed germplasm (local and reference samples). PIC: polymorphic information content, H_e : expected heterozygosity, H_o : observed heterozygosity.

Locus	Repeat motif	Alleles		PIC	H_e/H_o
		Number	Length		
MFC1	(CT) ₁₃	3	174–192	0.409	0.51/0.77
MFC2	(AC) ₁₈ (AT) ₇	5	158–172	0.635	0.69/0.67
MFC3	(AC) ₁₅ TC(AC) ₈ (AT) ₇	6	122–134	0.707	0.74/0.67
MFC4.1	(AT) ₄ (AC) ₁₁	2	192–192	0.263	0.00/0.00
MFC4.2		2	218–222	0.365	0.48/0.39
MFC5	(GA) ₁₃	2	128–140	0.239	0.28/0.30
MFC6	(TAA) ₃ (GT) ₈	6	292–318	0.598	0.66/0.72
MFC8	(CA) ₉ TA(CA) ₁₄ (TA) ₆	2	170–174	0.374	0.50/0.84
LMFC12	(CT) ₅₅	4	349–377	0.582	0.65/0.50
LMFC13	(GA) ₂₈	3	263–285	0.523	0.59/0.75
LMFC14	(GA) ₁₆	3	210–214	0.406	0.45/0.44
LMFC15	(TC) ₂₂	3	180–204	0.435	0.51/0.51
LMFC18	(GA) ₉	2	116–122	0.375	0.50/0.56
LMFC19	(AT) ₁₁ (AG) ₁₂	3	300–308	0.302	0.33/0.35
LMFC20	(AAG) ₉ (AG) ₁₈	3	134–138	0.350	0.43/0.00
LMFC21	(TC) ₉	3	258–266	0.384	0.42/0.21
LMFC24	(CT) ₁₀	3	271–275	0.445	0.55/0.79
LMFC26	(GA) ₁₅	3	220–232	0.470	0.55/0.00
LMFC27	(TG) ₁₇ (AG) ₆	2	182–192	0.374	0.50/0.79
LMFC30	(CT) ₁₈ (CA) ₆	9	226–256	0.798	0.82/0.79
LMFC31	(GA) ₁₅	2	225–239	0.335	0.43/0.58
LMFC38	(CT) ₂₀	6	212–222	0.667	0.72/0.40
Total		77			

the opposite. These figures indicate a high level of genetic diversity in the analyzed germplasm revealed by the microsatellite markers. This is in agreement with the fact that the fig tree has not been subjected to intensive plant breeding programmes, as previously indicated.

The dataset was analyzed in search for diagnostic markers for the traditional varieties. Alleles MFC3-122 and LMFC15-204 were discriminant for the local variety 'Brevera Blanca', whereas alleles LMFC26-222 and LMFC30-238 for 'Higuera de Pascua' and alleles MFC1-186 and LMFC30-220 were only present in 'Higuera Roela'. These results confirm the utility of the microsatellite markers for the characterization of this germplasm.

A dendrogram of the analyzed germplasm based on the 21 microsatellite markers was constructed using the Dice coefficient and the UPGMA clustering method (Fig. 1). The CCC analysis, the parameter that measures the correlation between similarity values calculated during tree building and the observed similarity, was found to be high ($r=0.85$). The UPGMA dendrogram (Fig. 1) revealed three main clusters: cluster I (4 accessions), cluster II (26 accessions) and cluster III (25 accessions).

The UPGMA analysis shows the relationships among the local germplasm and with the reference varieties. The traditional denominations are largely descriptive therefore is not surprising the correlation among the

denominations and the molecular relationships derived from the cluster analysis. The most genetically distinct cluster (shown as 'cluster I') includes the caprifigs and also the local denomination 'Higuera Roela' and does not include any reference variety. The local denomination 'Higuera Roela' has been found in cool vegetable gardens. In the past, it was abundant at the Jorairátar riverside. Its juicy fruits are highly appreciated for fresh consumption. Under irrigation they reach big sizes without flavor loss. This germplasm is therefore candidate for on-farm conservation.

The rest of the local germplasm can be divided into two main clusters (cluster II and cluster III in Fig. 1). Cluster II includes the early figs and the 'Higuera de Pascua' local denominations. This latter, like the early figs, produces two crops, but they are both produced on current seasons growth and take place after the summer. Its figs are not especially appreciated for its flavor, but the germplasm is interesting to produce almost until the end of the year. Additional local denominations like 'Valenciana' or 'Franciscana' suggest it may be a recent introduction. At the molecular level, it is very close to the Portuguese variety 'Lampeira'.

The early figs cluster shows two main divisions: the white early figs ('Breveras Blancas'), separated from the black early figs ('Breveras Negras') and the purple

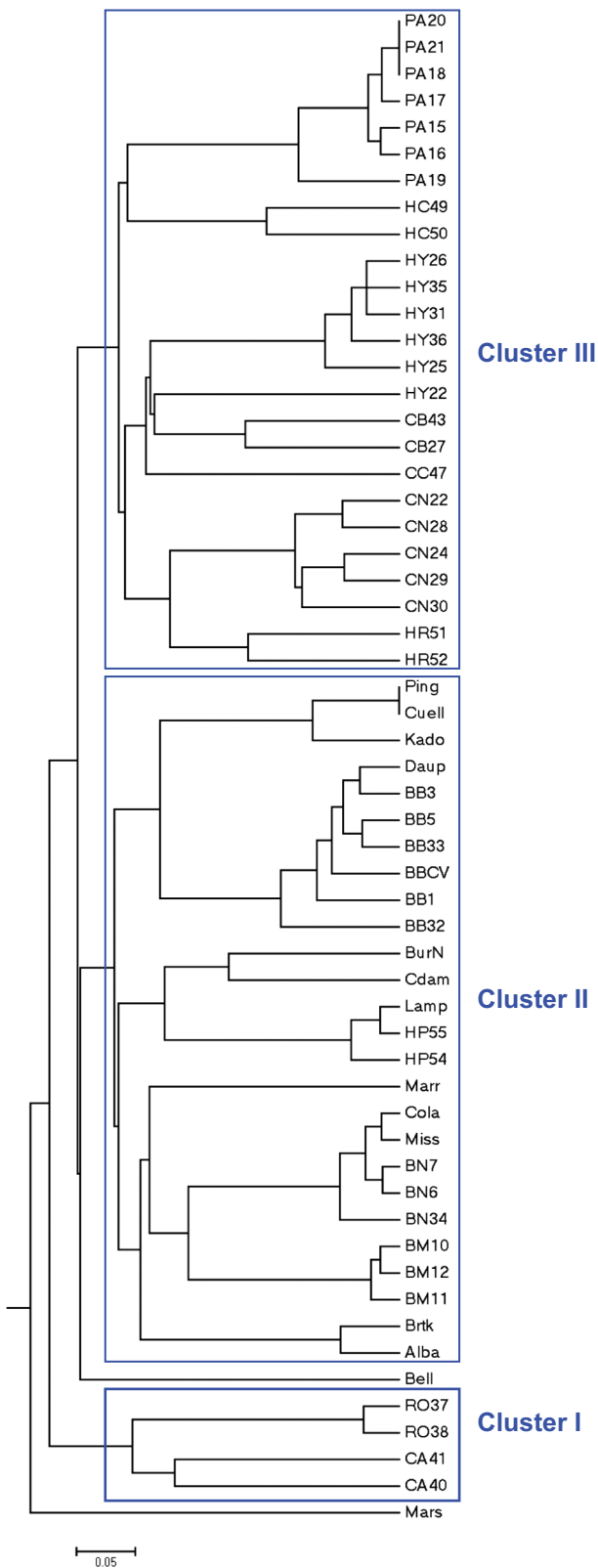


Fig. 1. UPGMA dendrogram analysis showing the genetic relationships among southern Spain local fig germplasm and reference varieties based on SSR marker analysis.

early figs ('Breveras Moradas'). The black early figs are genetically related to the varieties 'Colar' and 'Mission', whereas the white early figs show genetic similarity with a commercial white early fig tree and with the French variety 'Dauphine'. The early fig tree cluster shows a level of variability and relationships that can be used to guide conservation strategies.

The cluster III shows the genetic relationship among the seven remaining local denominations. No reference samples have been grouped in this cluster, suggesting that it includes most probably autochthonous germplasm. It includes one sample of the most threatened local variety that could be more abundant in the area in the past: 'Higuera de Carne Colorá'. Only a few isolated trees have been found, in poor condition, for such variety, being very old trees or regrowths. Thus, measures for on-farm conservation of this germplasm are recommended.

In conclusion, the present study has demonstrated how the integration of morphological, agronomical, ethnobotanical and genetic analysis can complement the analysis of agrobiodiversity of a traditional farm system that has developed varieties in situ, and put it in value. The resolutive power of the SSR marker system has been enough to distinguish and to establish genetic relationships among the germplasm classes found. This information will be used to guide the on-farm conservation measures to be undertaken in the area.

Acknowledgements – Dr. Jean-Paul Roger, from the Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, France, and Guillermo Valdés and Julián Bartual, from Estación Experimental Agraria de Elche (IVIA), Spain are gratefully acknowledged for providing plant material. This research was supported by the Spanish MICINN grant AGL2010-17316.

REFERENCES

- Achtak, H., Oukabli, A., Ater, M. et al. 2009. Microsatellite markers as reliable tools for fig cultivar identification. – *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 134: 624–631.
- Achtak, H., Ater, M., Oukabli, A. et al. 2010. Traditional agroecosystems as conservatories and incubators of cultivated plant varietal diversity: the case of fig (*Ficus carica* L.) in Morocco. – *BMC Plant Biol.* 10: 28
- Alarcón, P. A. 1874. La Alpujarra: sesenta leguas a caballo precedidas de seis en diligencia: – Imprenta y Librería de Miguel Guijarro (ed.), <www.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/57915064105571495200080/p0000007.htm>
- Buntjer, J. B. 1997. Phylogenetic computer tools (PhylTools), ver. 1.32 for Windows. – Laboratory of Plant Breeding, Wageningen Univ.
- Dighe, A. S., Jangid, K., Gonzalez, J. M. et al. 2004. Comparison of 16S rRNA gene sequences of genus *Methanobrevibacter*. – *BMC Microbiol.* 4: 20.
- Esquinas-Alcazar, J. 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. – *Nat. Rev. Genet.* 6: 946–953.

- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Ver. 3.5c. Distributed by the author. – Dept of Genetics, Univ. of Washington, Seattle.
- Giraldo, E., Viruel, M. A., Lopez-Corrales, M. et al. 2005. Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig tree (*Ficus carica* L.). – J. Hort. Sci. Biotechnol. 80: 217–224.
- Giraldo, E., López-Corrales, M. and Hormaza, J. I. 2010. Selection of the most discriminating morphological qualitative variables for characterization of fig germplasm. – J. Am. Soc. Hort. Sci. 135: 240–249.
- Hernández, P., Dorado, G., Laurie, D. A. et al. 2001. Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. – Theor. Appl. Genet. 102: 616–622.
- Hernandez, P. 2005. Comparison among available marker systems for cereal introgression breeding: a practical perspective. – Euphytica 146: 95–100.
- Ikegami, H., Nogata, H., Hirashima, K. et al. 2009. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. – Genet. Resour. Crop Evol. 56: 201–209.
- Khadari, B., Hochu, I., Santoni, S. et al. 2001. Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and the representative species of the genus *Ficus*. – Mol. Ecol. Notes 1: 191–193.
- Khadari, B., Oukabli, A., Ater, M. et al. 2005. Molecular characterization of Moroccan fig germplasm using inter-simple sequence repeat and simple sequence repeat markers to establish a reference collection. – HortScience 40: 29–32.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. – Brief Bioinf. 5: 150–163.
- Liu, K. and Muse, S. V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. – Bioinformatics 21: 2128–2129.
- Murray, Y. H. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. – Nucleic Acids Res. 8: 4321–4326.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. – Proc. Natl Acad. Sci. USA 76: 5269–5273.
- Saddoud, O., Chatti, K., Salhi-Hannachi, A. et al. 2007. Genetic diversity of Tunisian figs (*Ficus carica* L.) as revealed by nuclear microsatellites. – Hereditas 144: 149–157.
- Sugiura, T., Kuroda, H. and Sugiura, H. 2007. Influence of the current state of global warming on fruit tree growth in Japan. – Hort. Res. 6: 257–263.
- Tobias, C., Twigg, P., Hayden, D. et al. 2005. Analysis of expressed sequence tags and the identification of associated short tandem repeats in switchgrass. – Theor. Appl. Genet. 111: 956–964.

CAPÍTULO II

Publicado como:

Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G. y Hernandez P. (2013)
Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation
profiling. PLoS ONE 8, e70507.

Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling

Marga Pérez-Jiménez¹, Guillaume Besnard², Gabriel Dorado³, Pilar Hernandez^{1*}

1 Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain, **2** Laboratoire Evolution & Diversité Biologique (EDB), CNRS-UPS-ENFA, UMR 5174, Bâtiment 4R1b2, Toulouse Cedex 9, France, **3** Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

Abstract

Olive oil traceability remains a challenge nowadays. DNA analysis is the preferred approach to an effective varietal identification, without any environmental influence. Specifically, olive organelle genomics is the most promising approach for setting up a suitable set of markers as they would not interfere with the pollinator variety DNA traces. Unfortunately, plastid DNA (cpDNA) variation of the cultivated olive has been reported to be low. This feature could be a limitation for the use of cpDNA polymorphisms in forensic analyses or oil traceability, but rare cpDNA haplotypes may be useful as they can help to efficiently discriminate some varieties. Recently, the sequencing of olive plastid genomes has allowed the generation of novel markers. In this study, the performance of cpDNA markers on olive oil matrices, and their applicability on commercial Protected Designation of Origin (PDO) oils were assessed. By using a combination of nine plastid loci (including multi-state microsatellites and short indels), it is possible to fingerprint six haplotypes (in 17 Spanish olive varieties), which can discriminate high-value commercialized cultivars with PDO. In particular, a rare haplotype was detected in genotypes used to produce a regional high-value commercial oil. We conclude that plastid haplotypes can help oil traceability in commercial PDO oils and set up an experimental methodology suitable for organelle polymorphism detection in the complex olive oil matrices.

Citation: Pérez-Jiménez M, Besnard G, Dorado G, Hernandez P (2013) Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. PLoS ONE 8(8): e70507. doi:10.1371/journal.pone.0070507

Editor: Turgay Unver, Cankiri Karatekin University, Turkey

Received: April 16, 2013; **Accepted:** June 18, 2013; **Published:** August 7, 2013

Copyright: © 2013 Pérez-Jiménez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by the project AGL2010-17316 from the MINECO, Spain. GB was funded by the fellowship PIEF-GA-2008-220813 and the LABEX entitled TULIP (ANR-10-LABX-41). GD was funded by "Consejería de Agricultura y Pesca" of "Junta de Andalucía" (041/C/2007, 75/C/2009 and 56/C/2010). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: phernandez@ias.csic.es

Introduction

The virgin olive oil is obtained by mechanical pressing the fruits of the olive trees (*Olea europaea* L.), and has not undergone any chemical refinement, which is strictly forbidden by law. This product presents excellent organoleptic, nutritional and functional qualities. Its cardiovascular and antioxidant health benefits are widely recognized [1,2], including a 'qualified health claim' for coronary heart disease by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States of America (2004). It is also a key element of the healthy Mediterranean diet [3].

The olive oil consumption is growing outside the traditional olive tree grove areas (Mediterranean Basin), including America, Asia and Australasia (non-traditional-producer countries such as the United States, Mexico, Brazil, Argentina, Peru, Australia and China; FAO 2012, <<http://faostat.fao.org>>). Such expansion is mainly due to the recognition of the dietetic properties of olive oil, as source of healthy fatty acids and micronutrients (antioxidants like phenolic compounds, vitamin E, carotenes, etc).

Olive oil is marketed and perceived as a high-quality food product. Additionally, the price of the virgin olive oil is high compared to other edible oils, being therefore considered as a high-value product, which makes it prone to adulteration [4]. Despite some previous publications about this topic (see [5] for a review) the olive oil traceability remains a challenge. This includes

both the identification of oils from other species [6,7], as well as oils from different olive varieties. The European Commission introduced two types of certification labels in 1992, in order to protect the authenticity of the Extra Virgin Olive Oil (EVOO). Such labels refer to food products specific to a particular region or town, conveying a particular quality or characteristic of the specified area. Namely, they are the Protected Designation of Origin (PDO) and the Protected Geographical Indication (PGI) (EEC Regulation No. 2082/92). A further EEC Regulation (No. 510/2006) specifies the criteria for labeling, production and commercial distribution of the olive oil.

Accurate analytical approaches have been then developed to help the identification of genuine olive oil constituents and possible adulterants, the cultivar and the geographical origin. Thus, chromatographic and spectroscopic/spectrometric techniques have been used to analyze the content of metabolites such as triacylglycerols, free fatty acids, phenols (like hydroxytyrosol), sterols, alkanes, waxes and aliphatic alcohols [8–10]. Nevertheless, the content of metabolites can be affected by the environmental conditions during the plant growth, which might cause ambiguous or erroneous results [11]. Therefore, the chemical analyses are not enough for themselves to verify the olive oil authenticity or its varietal identification.

On the other hand, different genomic DNA molecular markers have been developed for olive cultivar identification during the last

decade. Among them, only nuclear markers such as genomic microsatellites (gSSR; [12], [13]), Sequence-Characterized Amplified Regions (SCAR; [14], [15]), and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP; [16]), already used for the characterization of olive tree cultivars, have been proposed for the varietal traceability of the olive oil [17]. Success in the varietal authentication of the olive oil has been reported using AFLP ([18], [19], [20]), SCAR ([21]), gSSR ([22], [23], [24], [25], [26]), and nuclear single nucleotide polymorphisms (SNP; [27]). DNA-based molecular markers are indeed the best choice for traceability purposes, since they are not dependent on the environmental and processing conditions, unlike other chemical analyses based on metabolites detection (see [28] for a review).

The nuclear microsatellites (gSSR) have been the molecular markers of choice for authenticity purposes. So much, that they are the only molecular markers accepted in the courts worldwide. This is due to several facts, including their codominant nature, high polymorphism conferring to them a high-discriminating power, wide distribution across the genome, automated detection and simple interpretation. Yet, the genomic microsatellite markers should be used with caution in the case of monovarietal olive oil traceability, due to the presence of paternal alleles from the seed [29].

The plastid genome has some advantages in relation to the nuclear genome for traceability purposes [30]: i) it is maternally inherited; ii) thousands of copies are present per cell, which is an extremely significant advantage for forensic analyses; iii) it is circular instead of linear, and therefore resistant to exonucleases; iv) organelles have a double membrane that makes chloroplast DNA more resistance to degradation, which is also a significant advantage for forensics; and v) it has a lower mutation rate than nuclear genomic sequences, and its stability may be an advantage for traceability analyses, despite of a low polymorphism level. Plastid markers have been already used to detect adulteration of olive oil, but only to analyze mixtures of oils from different species [31]. However, the varietal identification of the olive oils through molecular markers based in variations of the plastid genome has not been reported so far. This is due to the fact that the cpDNA polymorphism between olive tree varieties was not enough characterized, and therefore not sufficient to develop useful molecular markers for olive oil traceability. To solve this problem, we have previously sequenced eight plastid genomes of *Olea* [30]. This has allowed to develop a set of molecular markers to characterize the cpDNA of cultivated and wild Mediterranean olive trees. As expected, the discriminating power of the cpDNA variation was particularly low for the cultivated olive trees, being higher for the oleasters (wild olives).

Based on the above developments, the objective of the present work is to evaluate the efficiency of a subset of nine cpDNA regions [that include microsatellites, small insertions/deletions (indels) or a combination of both] for the varietal identification of both leaf DNA and the corresponding oil DNA, further assessing their applicability and contribution to the traceability and authenticity of the olive tree varieties and their monovarietal oils. Thus, we selected 15 major Mediterranean olive cultivars and two locally exploited trees (referred as “acebuchinas”) from the southern of Spain (Andalusia). The cultivars are already included in the PDO oil catalogue or in the process of obtaining such recognition <<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>> (Table 1).

Materials and Methods

Plant Materials and Commercial Monovarietal Olive Oil

This study was performed with 15 cultivated olive trees and two “acebuchinas” (Table 1). The leaves and drupes from selected olive trees were collected during the 2010/2011 harvest from single plants. Most plant materials were provided by the ‘Olive World Germplasm Bank’ (OWGB) at the “Centro Alameda del Obispo” of the “Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica” (IFAPA; Córdoba, Spain). The leaves and olive oil samples from ‘Blanqueta’, ‘Farga Milenaria’ and ‘Farga Canetera’ denominations were supplied by the Mill Cooperative Intercoop (Almazora, Castellón, Spain). The ‘Picholine Languedoc’ and ‘Farga’ leaves were received from the Olive Tree Germplasm Bank at the Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, National Agricultural Research Foundation (NAGREF; Agrokipio, Chania, Greece). The ‘acebuchina’ leaves and drupes were supplied by the olive-growing cooperative ‘El Callejón’ (Cádiz, Spain).

Olive Oil Production

Monovarietal olive oils were produced using 3 to 5 kg of olive drupes from certified trees. The physical extraction procedure used (Abencor System) is certified to be equivalent to the one used in production olive mills, and was carried out using an Olive Oil Efficiency Analyzer (Hammer Mill, ThermoMixer and Centrifuge) from MC2 Ingeniería y Sistemas (Seville, Spain, [32]). Briefly, the olive fruits were washed and the leaves removed, within 24 to 48 h after sampling. The olives were crushed with a hammer mill and slowly mixed for 30 to 60 min at 25°C. Natural talc and warm water were added to increase the oil yield during the mixing. Then, in order to separate the solid from the liquid phases, the obtained paste was centrifuged at 1,000 g for 1 min, followed by decantation of the oil. Finally, the oil was transferred into dark glass bottles and stored at room temperature in the dark until the DNA extraction.

DNA Extraction from Leaves and Olive Oils

The genomic DNA from leaf tissues was extracted according to the CetylTrimethylAmmonium Bromide (CTAB) method [33] as optimized by [34]. The DNA extraction from the ‘Blanqueta’, ‘Farga Milenaria’ and ‘Farga Canetera’ monovarietal commercial olive oils, as well as the ones generated by the Olive Oil Efficiency Analyzer were carried out using a modified CTAB method [18]. All the oil DNA extractions were carried out in duplicate, in order to obtain enough DNA for the necessary amplifications and PCR replicates. All the olive oil DNA extractions used in this work were carried out from fresh olive oils within a four-month period. Previously, molecular marker set-up has been carried out with three-year-old commercial olive oil from the ‘Picual’ variety with similar results.

Molecular Analyses

Nine Polymerase Chain Reaction (PCR) primer pairs developed for the olive plastid genomic profiling [30] were used (Table 2). We did not use an 18-bp tail of M13 on the forward primer as reported by [30] because we amplified each locus separately. Briefly, the PCR mixtures contained: i) the DNA isolated from either leaves or olive oils; ii) the reaction buffer made of 200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄ and 3 mM MgCl₂; iii) 25 mM of each dNTP; iv) 0.6 U of Hot Start *Taq* DNA polymerase from Fermentas (part of Thermo Fisher Scientific; Glen Burnie, MD, USA); and v) the PCR

Table 1. Olive varieties analyzed.

Cultivar	Country	Source	Type	PDO region ^b	Use	Commercial monovarietal oil
Arbequina	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Campo de Montiel, Comunitat Valenciana , Aceite de la Rioja, Aceite de Mallorca, Aceite de Navarra , Aceite del Bajo Aragón, Antequera, Les Garrigues, Lucena , Sierra de Cádiz, Siurana, Aceite de Terra Alta, Sierra de Cádiz	oil, table	Yes
Blanqueta	Spain	Intercoop	Commercial	Comunitat Valenciana , Aceite de la Rioja	oil	Yes
Farga Canetera	Spain	Intercoop	Commercial	Aceite del Baix Ebre-Montsià, Aceite de Terra Alta, Comunitat Valenciana , Baix Ebre-Montsià	oil	Yes
Farga Milenaria	Spain	Intercoop	Commercial	Aceite del Baix Ebre-Montsià, Aceite de Terra Alta, Comunitat Valenciana	oil	Yes
Frantoio	Italy	IFAPA	Monovarietal ^a	Umbria, Sabina, Colline Pontine, Colline di Romagna, Collina di Brindisi, Irpinia-Colline dell'Ufita, Collina di Teatine, Collina di Salernitane, Monti Iblei, Garda	oil, table	Yes
Galega Vulgar	Portugal	IFAPA	Monovarietal ^a	Azeite do Alentejo Interior	oil	Yes
Gordal Sevillana	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	NA	table	no
Hojiblanca	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Antequera, Baena, Estepa, Lucena, Poniente de Granada, Priego de Córdoba, Sierra de Cádiz	oil, table	Yes
Lechín de Sevilla	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Antequera, Baena, Lucena, Montoro-Adamuz, Sierra de Cádiz	oil	Yes
Manzanilla de Sevilla	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Campo de Montiel, Aceite de la Rioja, Sierra de Cádiz	oil, table	Yes
Picual	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Campo de Calatrava, Campo de Montiel, Aceite de la Rioja, Aceite de Mallorca, Aceite Monterrubio, Antequera, Baena, Estepa, Lucena, Montes de Granada, Montoro-Adamuz, Poniente de Granada, Priego de Córdoba, Sierra de Cádiz, Sierra de Cazorla, Sierra de Segura, Sierra Mágina	oil, table	Yes
Picholine Languedoc	France	IFAPA	Monovarietal ^a	Huile d'Olive de Nimes, Huile d'Olive de Haute-Provence	oil, table	Yes
Toffahi	Egypt	IFAPA	Monovarietal ^a	NA	table	no
Villalonga	Spain	IFAPA	Monovarietal ^a	Comunitat Valenciana	oil	Yes
Zaity	Syria	IFAPA	Monovarietal ^a	NA	oil	NA
Acebuchina 2	Spain	El Callejón	Monovarietal ^a	NA	oil	Yes
Acebuchina 5	Spain	El Callejón	Monovarietal ^a	NA	oil	Yes

List of olive oil varieties used showing information about country of origin, olive or oil suppliers, type of olive oil used for DNA extraction, protected denomination of origin to which oils belong, the use of olives for table or for making oil and if monovarietal oil is commercialized.

^aAbencor small-scale production;

^bNA: not available.

Boldface: Commercial olive oils in the process of obtaining PDO recognition.

doi:10.1371/journal.pone.0070507.t001

primers, including 50 pM of the forward primer fluorescently labeled with either 6-FAM, HEX or NED fluorochrome (Table 2), and 50 pM of the reverse primer. For locus 10, the reverse primer was HEX-labeled instead of the forward primer.

The reaction mixtures (15 µl) were incubated in a MyCycler thermocycler from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) at 95°C for 2 min (denaturation), followed by 36 cycles (95°C for 30 s for denaturation, 57°C for 30 s for annealing, and 72°C for 1 min for extension). The reaction was finally extended at 72°C for 20 min and stored at -20°C until use. The PCR products generated (amplicons) were visualized under blue light using a DR195M “Dark Reader” transilluminator from Clare Chemical Research (Dolores, CO, USA), after 2% (w/v) agarose gel electrophoresis and staining with GelGreen from Biotium (Hayward, CA, USA). The amplicons were further segregated by capillary electrophoresis using an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), using the GeneScan 3.7 software from the same manufacturer.

For some loci, PCR reactions from oil DNA were repeated up to four times to ensure robust allele determination (see below). An allele size was considered as robust when the peak signal was of a high quality (as for PCR reactions from leaf DNA) and thus allowed a non-ambiguous allele determination.

Results

The nine cpDNA loci used amplified DNA isolated from both olive leaves and oils and were able to discriminate six allele combinations or haplotypes (Table 3). Most cultivars showed haplotypes E1-1 (‘Arbequina’, ‘Frantoio’, ‘Hojiblanca’, ‘Manzanilla de Sevilla’ and ‘Picual’) and E1-2 (‘Galega Vulgar’, ‘Gordal Sevillana’, ‘Toffahi’ and ‘Zaity’). The remaining cultivars harbored haplotypes E1-3 (‘Blanqueta’ and ‘Villalonga’), E2-1 (‘Picholine Languedoc’), E2-3 (‘Lechín de Sevilla’, ‘acebuchina-2’ and ‘acebuchina-5’) and E3-1 (‘Farga Milenaria’ and ‘Farga Canetera’).

Several patterns of PCR amplification were found. Six loci (10, 11, 27, 38, 46 and 51) generated clear amplicons, with a high

Table 2. Plastid markers, variable motifs and PCR primers used.

Locus name	Motif	Forward primer (5'→3') ^a	Reverse primer (5'→3')	Amplicon size range (bp)
1	polyT ₁₀₋₁₃	AAAGGAGCAATAACGCCCTC	GGATAAGACCCGATCTTAGTG	99–101
10	indel 1 bp+(ATTAGATA) ₁₋₂	AAGGRGTCTTTCTTCTCTATTC	TAGGCTCGTTTCGAGCCCTTC	81–89
19	polyC ₁₀₋₁₁ +T ₉₋₁₁ +A ₁₂₋₁₅	TTATTTTCAGTTTCAGAGTTCCTCC	CCAAATTGATGTTCCAATATCTTC	89–91
51	polyT ₁₁₋₁₈	GGTGAACAAAATTATGGGTGC	TAGATTGTGTCTCACGCATATAC	117–125
27	polyA ₈₋₁₁	CTCGGTTATGAGACACATTACAAT	CAAGAAGTTTGCAAGAAGTTTGAC	107–108
38	polyT ₁₀₋₁₁	AACAAGATTGTTTAGATCTGATGG	TCGAAATAGATATCTGTGTTATGC	104–105
46	polyA ₁₀₋₁₂	AATAGCATGGCACTTCGAATTC	ATCTCATACTACTCTCTCGATAC	108–109
57	polyA ₁₃₋₁₅ + indel 1 bp	CAATATGAAATGGAATTCGCTCC	ATTGTAACAAAATAGGGAGATGCG	221–224
11	indel 10 bp+polyA ₁₁₋₁₄	AGATAAAGGAAGGGCTCGAACG	CAGGCCATCAGAATAAGAAGGG	103–114

Data from Besnard et al. [30].

^aForward primers were FAM-HEX or NED-labeled, except for locus 10, in which the reverse primer was labeled with HEX.

doi:10.1371/journal.pone.0070507.t002

quality of peak signal, corresponding to a single DNA fragment of the expected size for DNA isolated from both olive leaf and oil (Figure 1a–d). Occasionally, the other three cpDNA loci (1, 19 and 57) showed somewhat discordant results between leaf and oil samples. Locus 57 generated unspecific amplifications, shown on the chromatograms as a background with several low-intensity peaks for DNA from oil, which did not interfere with allele scoring (Figure 2a). On the other hand, locus 1 produced specific amplifications for leaf DNA, but the oil samples' chromatograms revealed an additional unspecific peak close to the true allele. This additional peak resulted in a poor resolution and intensity of the true allele in the profile of recovered oil DNA (Figure 2c). Finally, locus 19 showed the most complicated scored pattern on amplifications from olive oil DNA. This included the presence of unspecific peaks in the chromatograms, showing similar areas and heights than the true enclosed allele, which hampered the assignation of the correct molecular weight (Figure 2b). Nonetheless, it should be emphasized that such results were not obtained on all oil DNA amplifications. Actually, locus 19 includes three successive microsatellite motifs (polyC/polyT/polyA) and Besnard et al. [30] recommended not using it in a PCR multiplex due to difficulties of amplification.

Whereas locus 57 only needed to be repeated for DNA of 'Blanqueta' oil, loci 1 and 19 required up to three and four replications, respectively, of several oil sample amplifications to ensure a robust allele determination (Table S1). For both loci, the number of amplifications required was variable among oil samples. Only for the 'Picholine Languedoc' sample, one amplification reaction was sufficient to confidently score alleles of oil and leaves for both loci, followed by 'Zaity', with one amplification required for locus 1 and two amplifications in the case of locus 19. We have not observed, however, any correlative trend among the olive oil variety and the number of sample repetitions required. Despite of results obtained on these three loci, they are not all indispensable to discriminate the six haplotypes on oil DNA. Only the use of locus 19 is unavoidable as is the only available marker capable to differentiate the E1-2 and E1-3 haplotypes [30], and its 'inconsistency' problem can be overcome with a 4-replication of the amplification of the oil DNA samples.

Table 3. Plastid DNA haplotype for each olive variety and Locus-allele combinations for each olive variety.

Haplotype [30]	Allele combination	Variety
E1-1	1–101, 19–90, 51–125, 10–89, 27–107, 38–104 46–109, 57–224, 11–103	Arbequina, Frantoio, Hojiblanca, Manzanilla, Picual
E1-2	1–101, 19–91, 51–124, 10–89, 27–107, 38–104 46–109, 57–224, 11–103	Galega Vulgar, Gordal Sevillana, Toffahi, Zaity
E1-3	1–101, 19–90, 51–124, 10–89, 27–107, 38–104 46–109, 57–224, 11–103	Blanqueta, Villalonga
E2-1	1–100, 19–89, 51–117, 10–81, 27–107, 38–105 46–108, 57–221, 11–114	Picholine Languedoc
E2-3	1–100, 19–89, 51–117, 10–82, 27–107, 38–105 46–108, 57–221, 11–114	Lechín de Sevilla, Acebuchina 2, Acebuchina 5
E3-1	1–99, 19–89, 51–125, 10–89, 27–108, 38–105 46–109, 57–222, 11–112	Farga Milenaria, Farga Canetera

doi:10.1371/journal.pone.0070507.t003

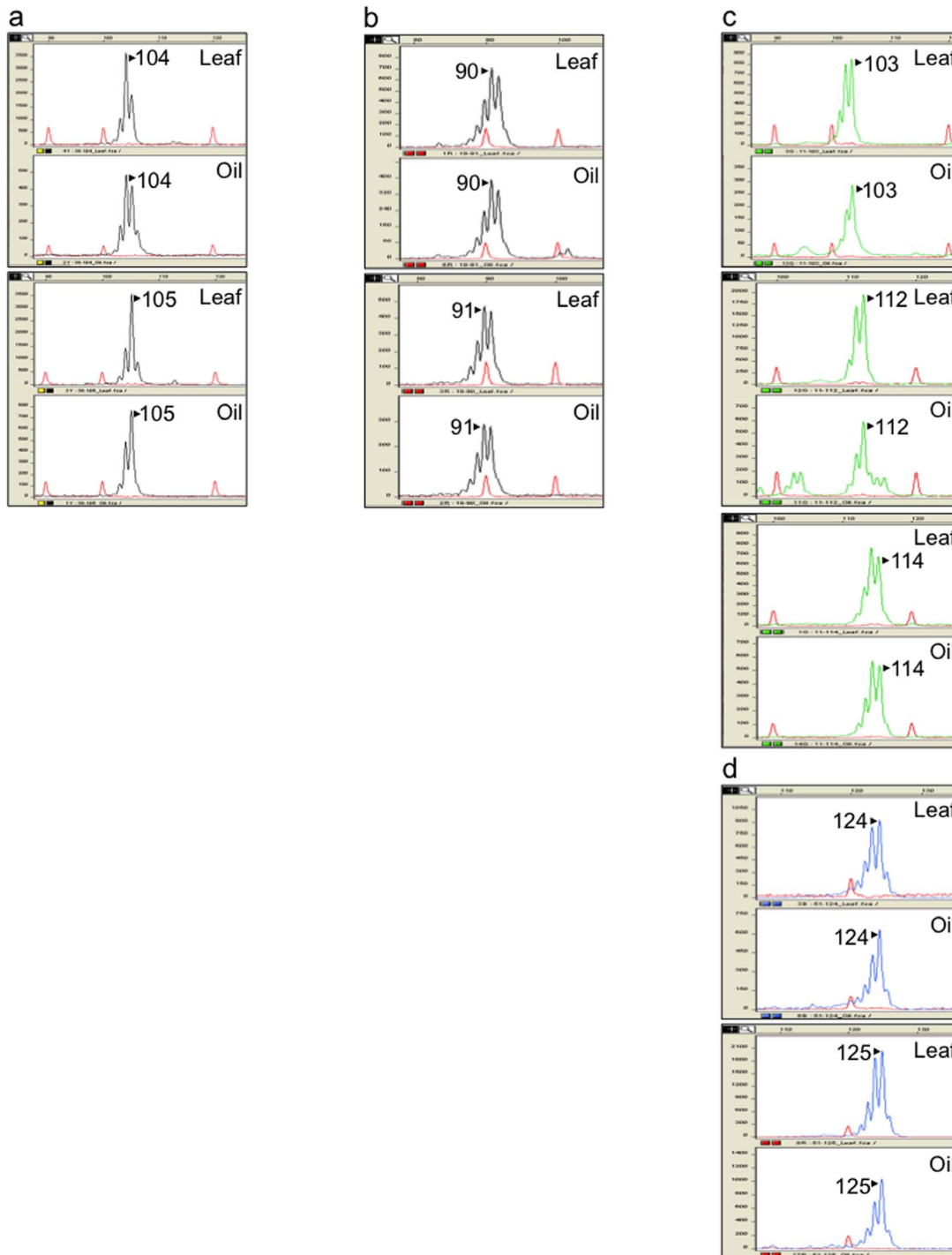


Figure 1. Profiling of olive plastid DNA markers. Examples of chromatograms showing congruent DNA amplification from leaves (up) and oils (down). The allele peaks are marked with the corresponding allele size (bases). **a)** locus 38; **b)** Locus 19; **c)** Locus 11 and **d)** Locus 51. doi:10.1371/journal.pone.0070507.g001

Discussion

Implications of Nuclear vs. Plastid Molecular Markers for Olive Oil Traceability

Genomic SSRs have been largely used for traceability and authenticity of several foodstuffs [4]. Indeed, they have been considered as a powerful tool to characterize and identify the olive oil varieties and the best option for olive oil traceability. Yet, they

have some drawbacks that should be taken into account. The virgin olive oils are the juice of the whole olive fruit (usually drupes with their stones) after being crushed in the milling process. Therefore, the paternal alleles from the seed are mixed with the maternal ones from the mesocarp tissue, being therefore present in the DNA recovered from the olive oil. In any case, it is clear that the paternal genome is present in the DNA isolated from olive oil, albeit at low concentrations, and although it may not be detectable

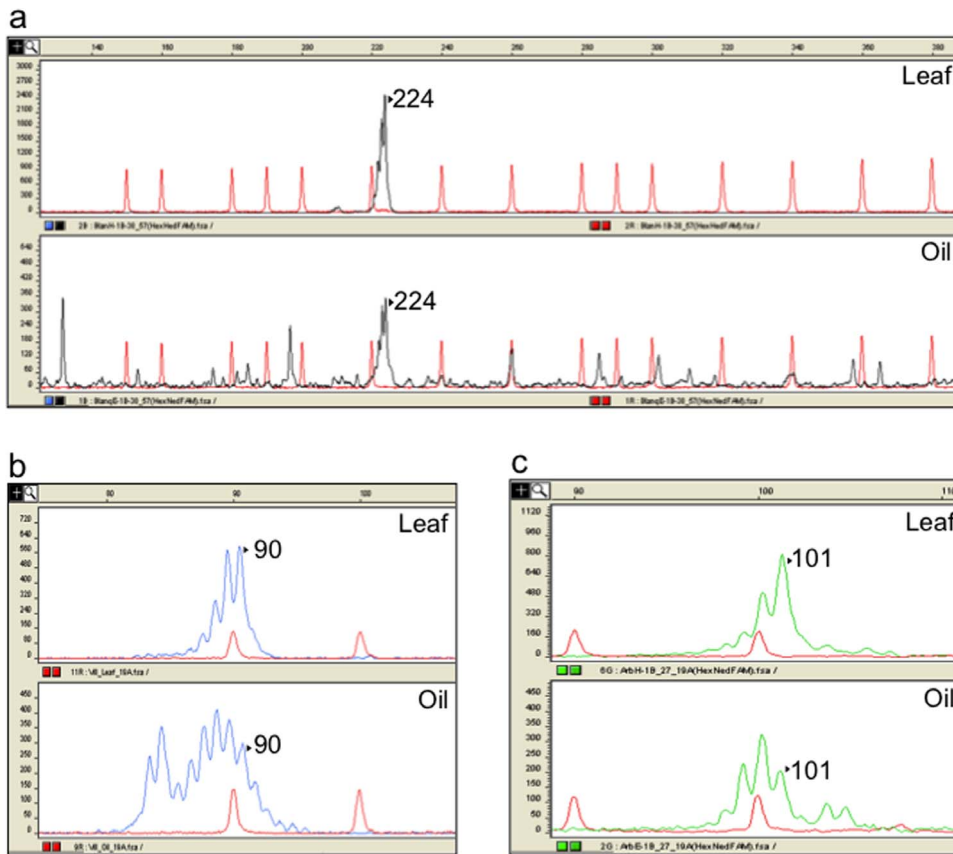


Figure 2. Discrepancies found between oil and leaf amplification patterns. Examples of chromatograms showing discrepancies in DNA amplification from leaves (up) and oil (down) for **a**) locus 57 on variety 'Blanqueta'; **b**) locus 19 on variety 'Villalonga'; **c**) locus 1 on variety 'Arbequina'. The expected allele peaks (as defined on leaf DNA) are marked with the corresponding allele size (bases). doi:10.1371/journal.pone.0070507.g002

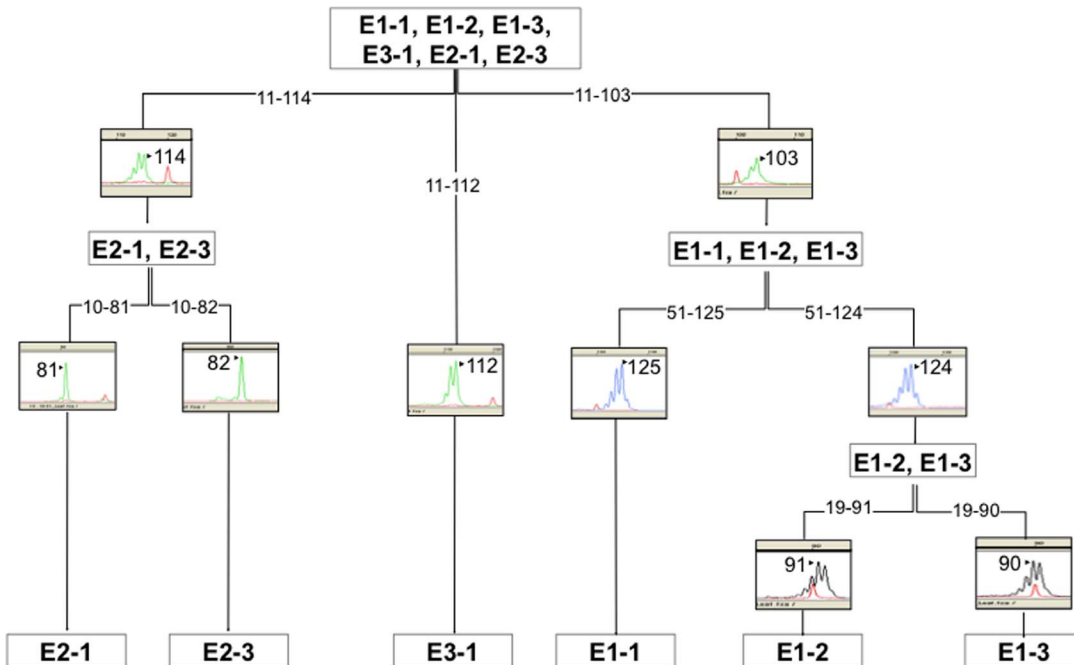


Figure 3. Flowchart outlining one of possible approaches to identify the six haplotypes described in the present study. The flowchart indicates the different steps to be taken for the discrimination of the six analyzed haplotypes. doi:10.1371/journal.pone.0070507.g003

in some cases, it cannot be excluded. Therefore, the nature of the nuclear molecular markers could lead to the misinterpretation of the results. On the contrary, since the chloroplasts are maternally inherited in olive [35], there is no risk of paternal genome contamination. In this study, we detected six haplotypes when we analyzed DNA extracted from leaves. When analyzing the DNA amplifications on oil extracts, we have not observed extra alleles in the scorable profiles, and thereby we conclude that using plastid markers prevents such a problem.

Unexpected alleles in nuclear marker profiles from monovarietal olive oils have been previously reported [29]. In agreement with this, the presence of extra-alleles has also been mentioned and debated in several works. For example, extra-alleles as in stoned 'Coratina' olive oil samples were found with the SSR marker GAPU89 [26] and presence of additional alleles was found in monovarietal oils 'Carolea', 'Frantoio', 'Leccino', 'Nocellara' and 'Coratina' using SSR GAPU59 [36]. Similar mismatches have been described in the 'Chemcheli Gafsa' and 'Arbequina' oils using SSR UDO09 [37]. Other reports have not found allelic differences between olive oils obtained from stoned and destoned drupes [38]. Yet, such result is not surprising, and could be explained if the approach was not sensitive enough to detect it. Nevertheless, the presence of paternal DNA is not always an insurmountable obstacle, as the potential pollinators of PDO areas could be traced [28], but only when their number remains limited. Special care should be taken in areas with presence of oleaster populations.

Amplification Specificity

In most cases, the amplification profile was the same for DNA from leaves and from olive oil of each particular variety (some examples are shown on figures 1a–d). Loci 10 and 11, along with microsatellites 27, 51, 38 and 46 have shown a good performance, with an easily-scored pattern, allowing discriminating five out of the six haplotypes on DNA isolated from olive oils, in agreement with the results previously described for olive trees [30]. Therefore, these molecular markers can be used for both genotyping cultivated and wild olive trees, as well as for discrimination analyses of olive oils (Table 3).

Sometimes, loci 1, 19 and 57 showed unclear amplification profiles when amplified from oil samples (Figs. 2a–c). Notwithstanding, the non expected peaks were easily identifiable and non-repetitive across the amplifications. On the other hand, for a given primer pair, the amplifiability was not alike for the olive oil DNA of different varieties (data not shown). This could be attributed to chemical differences between the olive oils, including inhibitors that could interfere with the PCR. Indeed, we have found that different unwanted compounds as polyphenols and polysaccharides may co-precipitate in the process of olive oil extraction, depending on the olive tree variety (data not shown).

These facts, in combination with the presence of degraded DNA and the primer design limitations may explain some inconsistencies between leaf and oil DNA amplifications (i.e., due to difficulties to confidently score allele size on some loci for oil olive PCR), as other authors have also found [25]. This is expected, due to the potential difficulty to isolate and amplify DNA from olive oil, which is mostly an hydrophobic substance with tiny amounts of water droplets from the olive fruit juice extraction process (where the DNA resides). In our study, as described in the 'Materials and Methods' section, the inconsistencies were primer-dependent and were present in three of the nine selected plastid markers (loci 1, 19 and 57). For these three loci, the amplification reactions had to be replicated in order to obtain a confidently scorable pattern of alleles on olive oil DNA. It is important to note

that the scorable alleles always matched with the alleles scored on the corresponding olive plant leaf. From these three markers, only locus 19 is necessary for the differentiation of the six haplotypes.

Previous studies with genomic SSR molecular markers have also found unspecific amplifications as well as missing alleles [22,37,38]. Other authors have found a correspondence in the genotyping profiles between DNA isolated from olive leaves and oils on up to 50% for a total of 222 comparisons [26]. There is a general agreement that mis-amplification and drop-out alleles are due to a low DNA concentration coupled with an excessive degradation of such DNA in the olive oil. Interestingly, we have not observed any allelic drop-out. This may be due to the fact that the cpDNA is more easily recoverable from the olive oil than the nuclear DNA for the reasons outlined above [30], which further supports its advantage for forensic studies. In addition, only one cpDNA allele is expected to be amplified excluding the possibility of drop-out alleles due to competitive amplification of alleles with different size as on nuclear loci.

Additionally, since the olive oil contains both scarce amounts of highly degraded DNA, due to the hydrophilic nature of the DNA in an hydrophobic matrix, the olive oil extraction procedure and the time of storage after milling [39], and the possible presence of inhibitors and other substances that may hinder the PCR performance, the amplification of short amplicons (e.g., about 200 bp or shorter) is highly recommended, as previously demonstrated in forensic DNA studies. Indeed, the advantage of using primers generating shorter SSR products with more robust amplifications has been previously reported when comparing standard and shorter amplicons for nuclear SSR loci DCA14 and EMO30 on both olive leaf and oil [26]. Therefore, PCR primers were designed to amplify short DNA segments (87 to 224 bp; [30]), and they generated robust PCR amplifications in most cases (Table 2 and Fig. 1).

The Utility of Rare Haplotypes

The selected loci for this work correspond to non-coding regions, which are more likely to show variations due to neutral random mutation events. However, the polymorphism detected was low in the eight olive tree plastid genomes sequenced [30], being not enough to assign each cultivar to a different haplotype (Table 3). For instance, Besnard et al. [30] have shown that 'Frantoio' and 'Manzanilla de Sevilla' have exactly the same chloroplast genome sequence probably due to a shared ancestral maternal origin in the Near East [40]. Here, the 15 analyzed monovarietal olive oils could be classified into six haplotypes, with 'Farga' ('Milenaria' and 'Canetera'), 'Picholine Languedoc' and 'Lechin de Sevilla' being associated to unique ones. Actually, a dataset of cpDNA haplotypes is already available for 534 olive cultivated genotypes from all the Mediterranean countries [40]. While 80% of cultivars show haplotype E1.1 (which is thus not really useful to discriminate varieties), it was shown that haplotypes E1.3 ('Blanqueta' and 'Villalonga'), E2.1 ('Picholine Languedoc'), E2.3 ('Lechin de Sevilla') or E3.1 ('Farga') are rare in cultivated olive (with frequency inferior to 5%). Therefore, these rare haplotypes may be used for traceability of such olive oil varieties. In our study, we have also included two local accessions referred as 'acebuchinas' in this study (Table 1), since they are currently used for the production of commercial olive oil in southern Spain, due to their relevant dietetic properties, including organoleptic, and healthy ones, like their antioxidative potential. Besides, being olive trees with small fruits, their yield is very low, and thus especially prone to fraudulent mixing with other oils. They also represent interesting candidates to assess the possibility of finding new alleles, since more cpDNA variation is expected in local varieties,

particularly in potential olive last glacial maximum refugia such as Andalusia [40]. Indeed, this approach allowed to determine that the local ‘acebuchinas’ showed haplotype E2-3. On the 534 Mediterranean cultivars [40], this haplotype was detected only once (in ‘Lechín de Sevilla’). It thus displays a high discriminating power, and the use of our cpDNA markers can easily allow detection of frauds in this case.

Concluding Remarks

In summary, the main goal of this work has been to ascertain the utility of cpDNA molecular markers for the development of a methodology to assess the authenticity of olive oil, allowing the identification of the PDO and PGI labels. Based on our results, it was possible to establish that four loci are enough to properly classify cultivars into the six haplotypes described here. One of the possible combinations using loci 11, 10, 51 and 19, is shown in Figure 3. To our knowledge, this is the first report of the development of molecular markers based on cpDNA polymorphisms for the traceability of the olive oils. The described methodology can be used for the varietal traceability of four commercial oils, three of them belonging to recognized PDO. Our results can be helpful to complement other molecular analyses based on nuclear polymorphisms, contributing towards the development of a reference dataset of molecular markers for the

Mediterranean olive trees, including both cultivated and wild varieties.

Supporting Information

Table S1 Replications required for achieving suitable patterns for oil DNA for loci 1, 19 and 57 per olive variety.

(PDF)

Acknowledgments

We are grateful to Carmen del Río (OWGB, IFAPA, Centro de Alameda del Obispo, Córdoba, Spain) for providing leaves and drupes from olive trees; Miguel Abad Ventura (Mill Cooperative Intercop, Almazora, Castellón, Spain) for the leaves and monovarietal olive oil samples from ‘Blanqueta’, ‘Farga Milenaria’ and ‘Farga Canetera’; and Laureano Sigler Silvera (Mill Cooperative El Callejón, Cádiz, Spain) for the ‘acebuchina’ leaves and drupes. This work is dedicated to the memory of Carmen del Río.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PH GB. Performed the experiments: MP. Analyzed the data: MP GB GD PH. Contributed reagents/materials/analysis tools: PH GB GD. Wrote the paper: MP GB GD PH.

References

- Roche HM, Gibney M, Kafatos A, Zampelas A, Williams C (2000) Beneficial properties of olive oil. *Food Research International* 33: 227–231.
- López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, et al. (2010) Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20: 284–294.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Pharm D, et al. (2013) Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*.
- Woolfe M, Primrose S (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22: 227–231.
- Perri E, Benincasa C, Muzzalupo I (2012) Olive Oil Traceability. In: Muzzalupo I, editor. *Olive Germplasm: The olive Cultivation, Table and Olive Oil Industry in Italy*. 265–286.
- Firestone D, Carson K, Reina R (1988) Update on control of olive oil adulteration and misbranding in the United States. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 65: 788–792.
- Firestone D, Summers J, Reina R, Adams W (1985) Detection of adulterated and misbranded olive oil products. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 62: 1558–1562.
- Aparicio R, Morales MT, Alonso V (1997) Authentication of European Virgin Olive Oils by Their Chemical Compounds, Sensory Attributes, and Consumers’ Attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1076–1083.
- Arvanitoyannis IS, Vlachos A (2007) Implementation of Physicochemical and Sensory Analysis in Conjunction with Multivariate analysis towards Assessing Olive Oil Authentication/Adulteration. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 441–498.
- Faria MA, Cunha SC, Paice AG, Oliveira MPP (2010) Olive Oil Authenticity Evaluation by Chemical and Biological Methodologies. In: Preedy V, Watson R, editors. *Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. London: Elsevier. 101–107.
- Montealegre C, Marina-Alegre M, García-Ruiz C (2009) Traceability Markers to the Botanical Origin in Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 28–38.
- 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.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonca D, Dos Santos MR, Da Camara Machado ML, et al. (2000) Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9: 1171–1173.
- Hernández P, de la Rosa R, Rallo L, Dorado G, Martín A (2001) Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 788–791.
- Bautista R, Cánovas FM, Claros MG (2003) Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europaea* (olive-tree). *Euphytica* 130: 185–190.
- Owen CA, Bita E-C, Banilas G, Hajjar SE, Sellianakis V, et al. (2005) AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 110: 1169–1176.
- Ben-Ayed R, Kamoun-Grati N, Rebai A (2013) An Overview of the Authentication of Olive Tree and Oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 218–227.
- Busconi M, Foroni C, Corradi M, Bongiorno C, Cattapan F, et al. (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry* 83: 127–134.
- Montemurro C, Pasqualone A, Simeone R, Sabetta W, Blanco A (2008) AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Food Research and Technology* 226: 1439–1444.
- Pafundo S, Agrimonti C, Marmiroli N (2005) Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6995–7002.
- Pafundo S, Agrimonti C, Maestri E, Marmiroli N (2007) Applicability of SCAR Markers to Food Genomics: Olive Oil Traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6052–6059.
- Alba V, Sabetta W, Blanco A, Pasqualone A, Montemurro C (2009) Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *European Food Research and Technology* 229: 375–382.
- Ben-Ayed R, Grati-Kamoun N, Moreau F, Rebai A (2009) Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology* 229: 757–762.
- Martins-Lopes P, Gomes S, Santos E, Guedes-Pinto H (2008) DNA Markers for Portuguese Olive Oil Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11786–11791.
- Pasqualone A, Montemurro C, Summo C, Sabetta W, Caponio F, et al. (2007) Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3857–3862.
- Vietina M, Agrimonti C, Marmiroli M, Bonas U, Marmiroli N (2011) Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the science of food and agriculture* 91: 1381–1391.
- Consolandi C, Palmieri L, Severgnini M, Maestri E, Marmiroli N, et al. (2008) A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *European Food Research and Technology* 229: 375–382.
- Agrimonti C, Vietina M, Pafundo S, Marmiroli N (2011) The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology* 22: 237–244.
- Doveri S, O’Sullivan DM, Lee D (2006) Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: A cautionary note to the use of DNA markers for provenance testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9221–9226.

30. Besnard G, Hernández P, Khadari B, Dorado G, Savolainen V (2011) Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology* 11: 80.
31. Kumar S, Kahlon T, Chaudhary S (2011) A Rapid Screening for Adulterants in Olive Oil using DNA Barcodes. *Food Chemistry* 127: 1335–1341.
32. Martínez J, Muñoz E, Alba J, Lanzón A (1975) Informe sobre la utilización del Analizador de Rendimientos "Abencor". *Grasas y Aceites* 26: 379–385.
33. Murray M, Thompson W (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.
34. Hernández P, de la Rosa R, Rallo L, Martín A, Dorado G (2001) First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea*): implications in plant variety identification by SCAR-marker development. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1082–1087.
35. Besnard G, Khadari B, Villemur P, Bervillé A (2000) Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1018–1024.
36. Rabiei Z, Enferadi S, Saidi A, Patui S, Vannozzi G (2010) Simple sequence repeats amplification: A tool to survey the genetic background of olive oils. *Iranian Journal of Biotechnology* 8: 24–31.
37. Ben-Ayed R, Grati-Kamoun N, Sans-Grout C, Moreau F, Rebai A (2012) Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology* 234: 263–271.
38. Muzzalupo I, Pellegrino M, Perri E (2007) Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *European Food Research and Technology* 224: 469–475.
39. Pafundo S, Busconi M, Agrimonti C, Fogher C, Marmiroli N (2010) Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Fragments Length Polymorphisms. *Food Chemistry* 123: 787–793.
40. Besnard G, Khadari B, Navascués M, Fernández-Mazuecos M, El Bakkali A, et al. (2013) The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122833.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la primera publicación de esta tesis (Perez-Jiménez *et al.* 2012) se llevó a cabo la caracterización molecular mediante 21 nuSSR de germoplasma local de higuera localizado en la Sierra de la Contraviesa (Alpujarra Baja, Granada). Este estuvo compuesto por 57 cultivares pertenecientes a 12 denominaciones locales y 15 variedades comerciales, que fueron usadas como grupos de referencia. El análisis molecular utilizando dichos marcadores microsatélite reveló un número total de 77 alelos, variando entre dos y nueve, dependiendo del locus. El número medio de alelos fue de 3,6, mientras que el contenido de información polimórfica (PIC; del inglés “Polymorphism Information Content”) fue de 0,456; próximo a 0,5, lo que indica que se trata de marcadores moleculares muy informativos (Botstein *et al.* 1980).

Los valores de heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) fueron similares en la mayoría de los casos (la H_o fue mayor o menor que la esperada en cinco y cuatro marcadores, respectivamente). Estos resultados indican que el germoplasma analizado posee un elevado nivel de variabilidad genética. Ello está de acuerdo con el hecho de que se trata de poblaciones que no han estado sometidas a programas de selección y mejora, por lo que presentan una alta diversidad genética, que suele ser típica de poblaciones naturales. Por tanto, esta amplia biodiversidad podría ser utilizada para programas de mejora en un futuro.

El análisis mediante estos marcadores microsatélite mostró la existencia de “loci diagnóstico”; es decir, alelos únicos que fueron observados sólo en una de las variedades locales analizadas. Esto evidenció la importancia de estos loci para su uso en la discriminación varietal del germoplasma analizado.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de variabilidad genética, así como las relaciones entre el germoplasma local y las variedades de referencia fue visualizado a través de un dendrograma (árbol filogenético), utilizando el método de ligamiento promedio (UPGMA; del inglés, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”). Para evaluar en qué medida el dendrograma reflejaba las relaciones originales de afinidad entre las variedades analizadas, fue calculado el coeficiente de correlación cofenética (CCC). El valor de $r = 0,85$ reflejó una buena representación y eficiencia del método de agrupamiento usado, al ser próximo a 1 (Sokal y Rohlf 1962).

En el dendrograma se pudieron observar tres agrupaciones principales. El grupo I englobó a los “cabrahigos” y a la denominación local higuera “Roela”, pero a ninguna variedad de referencia. Aunque la denominación higuera “Roela” no es de las más abundantes en la zona estudiada, es apreciada por producir unas infrutescencias jugosas. Por lo tanto, su identificación y caracterización podría contribuir a su conservación *in situ*.

El grupo II incluyó a las higueras tempranas, tradicionalmente conocidas como breveras o bíferas, y a la denominación local higuera de “Pascua”. Esta última, aunque también produce dos cosechas anuales, ambas son de higos, en lugar de una primera de higos y otra segunda de brevas, como en el caso de las higueras tempranas. A nivel molecular, aparecieron relacionadas con la variedad de referencia “Lampeira”. Las higueras tempranas quedaron subdivididas, a su vez, en dos subgrupos: uno formado por las “Breveras Blancas”, y otro que englobó a las “Breveras Moradas” y las “Breveras Negras”. Según las relaciones que fueron observadas en el dendrograma, las primeras mostraron similitud con la variedad comercial “Dauphine”, mientras que las segundas aparecieron



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

genéticamente relacionadas con las variedades de referencia “Collar” y “Mission”. Estas relaciones, así como el grado de variabilidad observado, podrían ser usados para establecer una estrategia de conservación de estas denominaciones.

Por último, en el grupo III quedaron incluidas las restantes denominaciones; a saber: higuera de “Cobre”, de “Ayuela”, de “Carne Colorá”, de “Regalo”, “Blanca de Pasa”, “Calabacilla Blanca” y “Calabacilla Negra”. Estas denominaciones locales no aparecieron relacionadas con ninguna de las variedades de referencia incluidas en el estudio, lo que sugiere el probable origen autóctono de las mismas. De la denominación local higuera de “Carne Colorá” se han encontrado escasos y dispersos pies de planta, por lo que en este caso la elaboración de una estrategia de conservación *in situ* es urgente.



En la segunda publicación de esta tesis (Pérez-Jiménez *et al.* 2013) se evaluó la utilidad de nueve secuencias cloroplásticas de microsatélites e inserciones/deleciones para la identificación de olivos y trazabilidad de sus aceites de oliva. Las mismas fueron seleccionadas tras la secuenciación de ocho genomas de dicho orgánulo del género *Olea* (Besnard *et al.* 2011).

Con estos marcadores se logró amplificar tanto ADN extraído de hoja como de aceite de oliva. Los productos de amplificación permitieron discriminar las combinaciones alélicas correspondientes a los seis haplotipos descritos previamente (Besnard *et al.* 2011). Como era de esperar, la mayoría de las variedades analizadas presentaron los haplotipos más comunes: E1-1 (“Arbequina”, “Frantoio”, “Hojiblanca”, “Manzanilla de Sevilla” y “Picual”) y E1-2 (“Galega Vulgar”, “Gordal Sevillana”, “Toffahi” y “Zaiti”). El resto de las variedades analizadas quedaron englobadas en los haplotipos E1-3 (“Blanqueta y “Villalonga”), E2-1 (“Picholine Languedoc”), E2-3 (“Lechín de Sevilla”, “Acebuche-2” y “Acebuche-5”) y E3-1 (“Farga Milenaria” y “Farga Canetera”).

Para la mayoría de los loci analizados (10, 11, 27, 38, 46 y 51), los perfiles de amplificación de ADN hoja y de aceite de oliva de una misma variedad fueron coincidentes. La combinación de estos seis marcadores permitió discriminar cinco de los seis haplotipos mencionados anteriormente. Según los resultados obtenidos, estos marcadores moleculares pueden ser utilizados con el objetivo de genotipar variedades cultivadas y silvestres de olivo, así como para la discriminación de sus aceites de oliva. Únicamente los microsatélites 1, 19 y 57 mostraron ciertas incoherencias en algunas amplificaciones, cuando se analizó con ellos el ADN obtenido de hoja frente al procedente del aceite de oliva. A pesar de ello, estas



incongruencias fueron fácilmente detectadas y no aparecieron de un modo repetitivo en todas las amplificaciones. Por otra parte, también fueron observadas ciertas variaciones en la amplificación de estos marcadores, dependiendo de la variedad de aceite de oliva del que procedía el ADN.

Estas diferencias podrían ser atribuidas a las variaciones en la composición química de cada variedad de aceite, y muy especialmente a la posible existencia de inhibidores de la PCR. Las inconsistencias entre los perfiles de amplificación de los ADN de hoja y de aceite también pueden ser atribuidos a: i) baja concentración y calidad del ADN extraído del aceite; y ii) limitación que presentan los diseños de los cebadores usados, debido a la escasa variabilidad detectada entre los ocho genomas secuenciados (0,07%) (Besnard *et al.* 2011). El problema que presentaron los marcadores 1, 19 y 57 fue solventado realizando una serie de repeticiones, a fin de obtener unos perfiles alélicos adecuados y no ambiguos en el caso del ADN del aceite. A pesar de que estos marcadores moleculares no sean los óptimos para este tipo de análisis, por las limitaciones anteriormente indicadas, hay que tener en cuenta que únicamente el locus 19 es necesario para poder discriminar entre los haplotipos E1-2 y E1-3, completando así la discriminación de los seis haplotipos.

Las amplificaciones inespecíficas y pérdidas de alelos han sido descritas previamente, en trabajos con marcadores microsatélite basados en secuencias nucleares (Muzzalupo *et al.* 2007; Alba *et al.* 2009; Ben-Ayed *et al.* 2012). Hay que resaltar que en el trabajo de esta tesis (Pérez-Jiménez *et al.* 2013) no se detectó pérdida de alelos para ninguno de los loci analizados. Ello puede deberse a que los marcadores usados en este estudio proceden de secuencias



cloroplásticas, cuya representación en el ADN aislado del aceite de oliva es mayor que las de origen nuclear (Besnard *et al.* 2011).

Por otro lado, debido a la naturaleza cloroplástica de estos marcadores, cabe esperar que únicamente se produzca la amplificación de un único alelo. De este modo, se excluye la posible pérdida de alelos debido a la amplificación competitiva entre los alelos alternativos de un mismo locus, como podría ocurrir en el caso de los nuSSR (Wattier *et al.* 1998; Kamiri *et al.* 2011). Como se ha mencionado anteriormente, la presencia tanto de compuestos inhibidores de la PCR, así como la escasez y el alto grado de degradación del ADN aislado del aceite, hacen recomendable el uso de marcadores moleculares que generen amplicones cortos; preferiblemente no mucho mayores de 200 pares de bases (pb) (Vietina *et al.* 2011). Por este motivo, los marcadores elegidos en esta tesis generan amplicones entre 87 y 224 pb.

Las bondades de los nuSSR en el estudio de la autenticidad y trazabilidad de los alimentos han sido puestas de manifiesto con anterioridad. Sin embargo, conviene tener en cuenta la posible contribución paterna (polen) en el ADN presente en el aceite de oliva, evitando interpretaciones erróneas de los resultados. Así, hay trabajos en los que se han descrito tales alelos (Doveri *et al.* 2006; Rabiei *et al.* 2010; Vietina *et al.* 2011), aunque en otros estudios no se han observado (Muzzalupo *et al.* 2007).

Tras comparar los perfiles de amplificación obtenidos en hoja con los resultantes del aceite de oliva, no se observaron alelos adicionales en estos últimos, lo cual está de acuerdo con su origen exclusivamente materno. A pesar de las ventajas evidentes y los resultados obtenidos con estos marcadores, el bajo grado de variabilidad encontrado entre los ocho genomas secuenciados de



los que fueron obtenidos (Besnard *et al.* 2011) no ha sido suficiente para asignar un haplotipo por variedad. En esta tesis se han logrado clasificar los 15 aceites monovarietales analizados en seis haplotipos. De ellos, únicamente “Farga” (“Milenaria” y “Canetera”), “Picholine Languedoc” y “Lechín de Sevilla” pudieron ser asociados de forma exclusiva a un haplotipo (E3-1, E2-1 y E2-3, respectivamente).

Un reciente genotipado de 534 variedades de olivo cultivadas en la zona del Mediterráneo (Besnard *et al.* 2013) mostró un alto porcentaje del haplotipo E1-1, el cual no resulta de utilidad cuando se trata de discriminar variedades. Por otra parte, los haplotipos que engloban a un menor número de variedades fueron las cultivadas con menor frecuencia. Por lo tanto, son estos “haplotipos raros”, como E1-3 (“Blanqueta” y “Villalonga”), E2-1 (“Picholine Languedoc”), E2-3 (“Lechín de Sevilla”) y E3-1 (“Farga”) los que resultan más útiles para ser aplicados a la trazabilidad del aceite de oliva en estas variedades.

En el presente trabajo se decidió incluir además dos denominaciones locales de acebuche del sur de España. En la actualidad, el aceite de estos olivos silvestres explotados localmente se comercializa y es muy valorado por sus propiedades organolépticas, teniendo también un elevado precio, dada la dificultad de su recolección, baja producción y escaso rendimiento de aceite (baja relación pulpa/hueso). Por todo ello, estos aceites pueden sufrir también fraudes. De este modo, se ha determinado que los acebuches analizados poseen el haplotipo E2-3, solamente detectado en la variedad “Lechín de Sevilla”, lo que permite la detección de fraudes con otras variedades.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta memoria de tesis doctoral son las siguientes:

1. Los marcadores microsatélite elegidos para el estudio de la agrodiversidad en higuera han permitido la caracterización de este germoplasma local, habiéndose detectado una alta biodiversidad.
2. La existencia de alelos únicos o de diagnóstico prueba la utilidad de estos marcadores moleculares para la discriminación varietal del germoplasma de higuera analizado.
3. El uso integrado de análisis morfológicos, agronómicos y etnobotánicos, junto con los resultados obtenidos en la caracterización molecular, apoyan la utilidad de los marcadores microsatélite, como parte de la elaboración de una estrategia de conservación *in situ* del germoplasma de higuera analizado.
4. En base a los resultados obtenidos en el análisis, tanto de hojas de olivos como de los aceites de oliva correspondientes de cada variedad, se ha podido establecer que cuatro de los loci empleados son suficientes para clasificar las variedades analizadas en sus seis haplotipos correspondientes.
5. Los marcadores microsatélite e inserciones/deleciones, basados en la genómica comparativa del cloroplasto en olivo, han sido evaluados por primera vez para la trazabilidad del aceite de oliva.

CONCLUSIONES

6. Los marcadores moleculares de secuencias cloroplásticas pueden ser aplicados a la trazabilidad del aceite de oliva, en variedades pertenecientes a los haplotipos raros (E1-3, E2-1, E2-3 y E3-1).

7. Esta metodología de genotipado mediante marcadores moleculares puede ser aplicada a la trazabilidad de cuatro de los aceites analizados en este trabajo, siendo tres de ellos denominación de origen protegida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Convenio sobre la diversidad biológica. In: *Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, 1992*, p. 30. Naciones Unidas, Río de Janeiro, Brasil.
- The General Principles of Food Law in the European Union. Commission Green Paper. COM(97); 176 final.
- White Paper on Food Safety. Commission of the European Communities. COM (99); 719 final.
- Achtak H., Ater M., Oukabli A., Santoni S., Kjellberg F. y Khadari B. (2010) Traditional agroecosystems as conservatories and incubators of cultivated plant varietal diversity: the case of fig (*Ficus carica* L.) in Morocco. *BMC Plant Biology* **10**, 28.
- Alaeddini R., Walsh S.J. y Abbas A. (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic science international. Genetics* **4**, 148-57.
- Alba V., Sabetta W., Blanco A., Pasqualone A. y Montemurro C. (2009) Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *European Food Research and Technology* **229**, 375-82.
- Alonso-Salces R.M., Héberger K., Holland M.V., Moreno-Rojas J.M., Mariani C., Bellan G., Reniero F. y Guillou C. (2010) Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry* **118**, 956-65.
- Aparicio R. y Aparicio-Ruiz R. (2000) Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **881**, 93-104.
- Aparicio R., Morales M.T. y Alonso V. (1997) Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers' attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1076-83.
- Aradhya M., Stover E., Velasco D. y Koehmstedt A. (2010) Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). *Genetica* **138**, 681-94.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldoni L., Cultrera N., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda M., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I., Casagrande A., Lain O., Messina R. y Testolin R. (2009) A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding* **24**, 213-31.
- Ben-Ayed R., Grati-Kamoun N., Moreau F. y Rebaï A. (2009) Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology* **229**, 757-62.
- Ben-Ayed R., Grati-Kamoun N., Sans-Grout C., Moreau F. y Rebaï A. (2012) Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology* **234**, 263-71.
- Bendich A.J. (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays* **6**, 279-82.
- Benincasa C., De Nino A., Lombardo N., Perri E., Sindona G. y Tagarelli A. (2003) Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/Ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 733-41.
- Besnard G., Hernandez P., Khadari B., Dorado G. y Savolainen V. (2011) Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology* **11**, 80.
- Besnard G., Khadari B., Navascués M., Fernández-Mazuecos M., El Bakkali A., Arrigo N., Baali-Cherif D., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Santoni S., Vargas P. y Savolainen V. (2013) The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. y Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-31.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bracci T., Busconi M., Fogher C. y Sebastiani L. (2011) Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports* **30**, 449-62.
- Breton C., Claux D., Metton I., Skorski G. y Bervillé A. (2004) Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 531-7.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorno C., Cattapan F. y Fogher C. (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry* **83**, 127-34.
- Cabrita L.F., Aksoy U., Hepaksoy S. y Leitão J.M. (2001) Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae* **87**, 261-73.
- Caputo V., Aprile M.C. y Nayga R.M., Jr (2011) Consumers' valuation for European food quality labels: importance of label information provision. In: *2011 International Congress Zurich, Switzerland*. European Association of Agricultural Economists.
- Chatti K., Baraket G., Abdelkrim A., Saddoud O., Mars M., Trifi M. y Salhi-Hannachi A. (2010) Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars. *Biochemical Genetics* **48**, 789-806.
- Christy A.A., Kasemsumran S., Du Y. y Ozaki Y. (2004) The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Analytical Sciences* **20**, 935-40.
- Cromwell E., Cooper D. y Mulvany P. (2003) Defining Agricultural Biodiversity. In: *Conservation and Sustainable Use of Agricultural Biodiversity* (pp. 5-12. CIP-UPWARD in collaboration with GTZ, IDRC, IPGRI and SEARICE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cunha S.S., Fernandes J.O. y Oliveira M.B.P.P. (2006) Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1128**, 220-7.
- Dalkilic Z., Mestav H.O., Günver- Dalkilic G. y Kocatas H. (2011) Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* **10**, 519-26.
- Dalvit C., De Marchi M. y Cassandro M. (2007) Genetic traceability of livestock products: a review. *Meat Science* **77**, 437-49.
- De la Torre F., Bautista R., Cánovas F. y Claros G. (2004) Isolation of DNA from olive oil and sediments: application in oil fingerprinting. *Food, Agriculture and Environment* **2**, 84-9.
- Di Vaio C., Nocerino S., Paduano A. y Sacchi R. (2013) Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 1134-9.
- Do Val A.D., Souza C.S., Ferreira E.A., Salgado S.M., Pasqual M. y Cancado G.M. (2013) Evaluation of genetic diversity in fig accessions by using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* **12**, 1383-91.
- Doveri S., O'Sullivan D.M. y Lee D. (2006) Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: a cautionary note to the use of DNA markers for provenance testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9221-6.
- Drouin G., Daoud H. y Xia J. (2008) Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 827-31.
- Faria M., Cunha S., Paice A. y Oliveira M. (2010) Olive oil authenticity evaluation by chemical and biological methodologies. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (eds. by Preedy V y Watson R), pp. 101–7. Elsevier, London.
- Gallina Toschi T., Bendini A., Lozano-Sánchez J., Segura-Carretero A. y Conte L. (2013) Misdescription of edible oils: flowcharts of

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- analytical choices in a forensic view. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**, 1205-23.
- Ganopoulos I., Bazakos C., Madesis P., Kalaitzis P. y Tsaftaris A. (2013) Barcode DNA high-resolution melting (Bar-HRM) analysis as a novel close-tubed and accurate tool for olive oil forensic use. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 2281-6.
- Giraldo E., Lopez-Corrales M. y Hormaza J.I. (2008) Optimization of the management of an *ex-situ* germplasm bank in common fig with SSRs. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**, 69-77.
- Giraldo E., López-Corrales M. y Hormaza J.I. (2010) Selection of the most discriminating morphological qualitative variables for characterization of fig germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**, 240-9.
- Golan E.H., Crissoff B., Kuchler F., Nelson K.B., Price G.K. y Calvin L. (2003) Traceability in the US food supply: dead end or superhighway? *Choices* **18**, 17-20.
- IPGRI (2002) *Neglected and underutilized plant species: strategic action plan of the International Plant Genetic Resources Institute.*, Rome, Italy.
- IPGRI-CIHEAM (2003) *Descriptors for fig.* International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, and International Centre for Advance Mediterranean Agronomic Studies, Paris, France.
- Kalia R., Rai M., Kalia S., Singh R. y Dhawan A.K. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**, 309-34.
- Kamiri M., Stift M., Srairi I., Costantino G., Moussadik A., Hmyene A., Bakry F., Ollitrault P. y Froelicher Y. (2011) Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* using SSR markers and cytogenetic analysis. *Plant Cell Reports* **30**, 1415-25.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G. y Hodgkin T. (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin no. 2, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Khadari B., Hochu I., Santoni S., Oukabli A., Ater M., Roger J.P. y Kjellberg F. (2003) Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. In: *II International Symposium on Fig (International Society for Horticultural Science)* (ed. by López Corrales MaBG, M.J.).
- Khadari B., Oukabli A., Ater M., Mamouni A., Roger J.P. y Kjellberg F. (2005) Molecular characterization of Moroccan fig germplasm using intersimple sequence repeat and simple sequence repeat markers to establish a reference collection. *HortScience* **40**, 29-32.
- Kislev M.E., Hartmann A. y Bar-Yosef O. (2006) Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science* **312**, 1372-4.
- Kumar S., Kahlon T. y Chaudhary S. (2011) A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes. *Food Chemistry* **127**, 1335-41.
- Litt M. y Luty J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics* **44**, 397-401.
- López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E., De Caterina R., Badimón L., Covas M.I., Escrich E., Ordovás J.M., Soriguer F., Abiá R., Alarcón de la Lastra C., Battino M., Corella D., Chamorro-Quirós J., Delgado-Lista J., Giugliano D., Esposito K., Estruch R., Fernandez-Real J.M., Gaforio J.J., La Vecchia C., Lairon D., López-Segura F., Mata P., Menéndez J.A., Muriana F.J., Osada J., Panagiotakos D.B., Paniagua J.A., Pérez-Martínez P., Perona J., Peinado M.A., Pineda-Priego M., Poulsen H.E., Quiles J.L., Ramírez-Tortosa M.C., Ruano J., Serra-Majem L., Solá R., Solanas M., Solfrizzi V., de la Torre-Fornell R., Trichopoulou A., Uceda M., Villalba-Montoro J.M., Villar-Ortiz J.R., Visioli F. y Yiannakouris N. (2010) Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **20**, 284-94.
- Mariotti R., Cultrera N., Diez C., Baldoni L. y Rubini A. (2010) Identification of new polymorphic regions and differentiation

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. *BMC Plant Biology* **10**, 211.
- Mathur P. (2011) Assessing the threat of genetic erosion. In: *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines - 2011 Update*. Bioversity International, Rome, Italy. (eds. by Guarino L, Ramanatha Rao V y Goldberg E), Rome, Italy.
- Molder H.F.M.t. y Gutteling J. (2003) The issue of food genomics: about uncaring citizens and united experts. In: *Genes for your food - Food for your genes* (eds. by Est Rv, Hanssen L y Crapel O), pp. 117-36. Rathenau Institute, The Hague.
- Montealegre C., Marina Alegre M.a.L. y García-Ruiz C. (2009) Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 28-38.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-73.
- Muzzalupo I., Pellegrino M. y Perri E. (2007) Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *European Food Research and Technology* **224**, 469-75.
- Muzzalupo I. y Perri E. (2002) Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology* **214**, 528-31.
- Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E. y Marmiroli N. (2007) Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6052-9.
- Pafundo S., Agrimonti C. y Marmiroli N. (2005) Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 6995-7002.
- Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G. y Hernandez P. (2013) Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS ONE* **8**, e70507.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Perez-Jiménez M., López B., Dorado G., Pujadas-Salvá A., Guzmán G. y Hernández P. (2012) Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation. *Hereditas* **149**, 108-13.
- Powell W., Machray G.C. y Provan J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **1**, 215-22.
- Rabiei Z., Tahmasebi Enferadi S., Saidi A., Patui S. y Vannozzi G.P. (2010) Simple sequence repeats amplification: a tool to survey the genetic background of olive oils. *Iran Journal of Biotechnology* **8**, 24-31.
- Roche H.M., Gibney M.J., Kafatos A., Zampelas A. y Williams C.M. (2000) Beneficial properties of olive oil. *Food Research International* **33**, 227-31.
- Saddoud O., Chatti K., Salhi-Hannachi A., Mars M., Rhouma A., Marrakchi M. y Trifi M. (2007) Genetic diversity of Tunisian figs (*Ficus carica* L.) as revealed by nuclear microsatellites. *Hereditas* **144**, 149-57.
- Salhi-Hannachi A., Trifi M., Zehdi S., Hedfi J., Mars M., Rhouma A. y Marrakchi M. (2004) Inter-Simple Sequence Repeat fingerprints to assess genetic diversity in Tunisian fig (*Ficus carica* L.) germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution* **51**, 269-75.
- Sciarra A.F. y Gellman L. (2012) Geographical indications: why traceability systems matter and how they add to brand value. *Journal of Intellectual Property Law y Practice* **7**, 264-70.
- Sokal R.R. y Rohlf J.F. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* **11**, 33-40
- Stover E., Aradhya M., Ferguson L. y Crisosto C.H. (2007) The Fig: overview of an ancient fruit. *HortScience* **42**, 1083-7.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-71.
- Testolin R. y Orietta L. (2005) DNA Extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers. *Journal of Food Science* **70**, 108-12.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Varshney R., Mahendar T., Aggarwal R. y Börner A. (2007) Genic molecular markers in plants: development and applications. In: *Genomics-Assisted Crop Improvement* (eds. by Varshney R y Tuberosa R), pp. 13-29. Springer Netherlands.
- Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S. y López-Tamames E. (2005) Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1090**, 146-54.
- Vietina M., Agrimonti C., Marmiroli M., Bonas U. y Marmiroli N. (2011) Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 1381-91.
- Wattier R., Engel C.R., Saumitou-Laprade P. y Valero M. (1998) Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* **7**, 1569-73.
- Wolfe K.H., Li W.H. y Sharp P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 9054-8.
- Woolfe M. y Primrose S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* **22**, 222-6.
- Wünsch A. y Hormaza J.I. (2002) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* **125**, 59-67.
- Zhao Y., Zhang B., Chen G., Chen A., Yang S. y Ye Z. (2014) Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chemistry* **145**, 300-305.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zonneveld M., Dawson I., Thomas E., Scheldeman X., Etten J., Loo J. y Hormaza J.I. (2014) Application of molecular markers in spatial analysis to optimize *in situ* conservation of plant genetic resources. In: *Genomics of Plant Genetic Resources* (eds. by Tuberosa R, Graner A y Frison E), pp. 67-91. Springer Netherlands.