

Desarrollo de marcadores moleculares y herramientas genómicas para la trazabilidad, identificación y mejora del olivo, la aceituna y el aceite de oliva

GABRIEL DORADO^{1*}, PILAR RALLO², PILAR HERNÁNDEZ³, MARÍA JOSÉ GIMÉNEZ³, YOSSELÍN BENÍTEZ⁴, AURORA DÍAZ³, RAÚL DE LA ROSA⁵, JOSÉ LUIS CABALLERO¹, JUAN MUÑOZ-BLANCO¹, ANTONIO MARTÍN³

¹Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, Córdoba; ²Dep. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla, Sevilla; ³Instituto de Agricultura Sostenible (IAS); Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba; ⁴Delbruck Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, One Bungtown Road, New York (USA); ⁵Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Córdoba

RESUMEN

Las sociedades modernas demandan normas de control de calidad que garanticen el origen y autenticidad de los productos que consumen. Ello es particularmente relevante en el caso de los alimentos y bebidas, donde además puede estar en juego la salud de las personas. Existen diversas metodologías para identificar entidades (virus, viroides y virusoides), seres vivos, o partes de ellos, entre las que destaca la aplicación de tecnologías bioquímicas, genéticas y genómicas. Así, los marcadores moleculares de ADN permiten una identificación varietal del olivo (*Olea europaea*), la aceituna y el aceite de oliva. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado marcadores moleculares de ADN desde el año 1999. Estos trabajos están disponibles en el GenBank del «National Center for Biotechnology Information» (NCBI) <<http://www.ncbi.nlm.nih>.

ABSTRACT

Modern societies demand quality control that guarantee the origin and authenticity of consumer products. This is particularly relevant in the case of foods and drinks, where the health may be at stake. There are several methodologies to identify entities (viruses, viroids and virusoids), living beings, or parts of them, that rely on biochemical, genetic and genomic approaches. Thus, the molecular DNA markers allow variety or cultivar identification of the olive tree (*Olea europaea*), the olive fruit and the olive oil. Our research team has developed DNA-based molecular markers since the year 1999. These results are available in the GenBank of the «National Center for Biotechnology Information» (NCBI) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>, as well as in other national and international publications. Such markers include the «Random

gov», así como en otras publicaciones nacionales e internacionales. Entre dichos marcadores destacan el «ADN Polimórfico Amplificado al Azar» (RAPD; del inglés, «Random Amplified Polymorphic DNA»), la «Región Amplificada de Secuencia Caracterizada» (SCAR; del inglés, «Sequence-Characterized Amplified Region»), los Microsatélites (SSR; del inglés, «Simple-Sequence Repeat») y el «Polimorfismo de Nucleótido Único» (SNP; del inglés, «Single Nucleotide Polymorphism»). Hemos desarrollado RAPDs y SCARs para la selección y mejora genética de la relación pulpa/hueso de la aceituna. Hemos utilizado SSRs para control de paternidad e identificación; y SNPs para la trazabilidad del aceite de oliva. Con estos marcadores se han generado los correspondientes mapas genéticos del olivo. Todos estos resultados y experiencia nos han permitido proponer una nueva estrategia genómica para resolver los problemas actuales de identificación, denominación de origen y trazabilidad del olivo, la aceituna y el aceite de oliva.

Amplified Polymorphic DNA» (RAPD), the «Sequence-Characterized Amplified Region» (SCAR), the Microsatellite or «Simple-Sequence Repeat» (SSR) and the «Single Nucleotide Polymorphism» (SNP). We have developed RAPDs and SCARs for the selection of a better flesh/seed ratio in the olive. We have used SSRs for identification and paternity testing; and SNPs for the traceability of the olive oil. Genetic maps of the olive tree have also been generated with such DNA markers. All these results and experience have allowed us to propose a new genomic strategy to solve the current problems of trueness-to-type identification, denomination of origin and traceability of the olive tree, the olive fruit and the olive oil.

INTRODUCCIÓN

Existen diversos tipos de marcadores moleculares, incluyendo los basados en péptidos o proteínas y ácidos nucleicos (Dorado, 2001, 2006; Dorado et al., 2001, 2004; Chawla y Dorado, 2006). Reciben dicho nombre porque pueden emplearse para identificar y diferenciar entidades (virus, viroides o virusoides) o seres vivos. De este modo, pueden ser empleados en controles de paternidad y trazabilidad. Por otro lado, algunos marcadores moleculares pueden estar asociados a características de interés. Bien porque ellos mismos representen genes implicados en dicho fenotipo, o bien porque estén asociados de alguna manera a ellos. La mayor parte de los marcadores moleculares empleados en mejora son de este segundo tipo. La razón es simple: generalmente se obtienen al azar, por lo que lo más probable es que se encuentren en zonas no codificantes ni reguladoras del genoma.

El estudio de los marcadores moleculares tiene un antes y un después, una tecnología de amplificación *in vitro*, llamada «Reacción en Cadena de la Polimerasa» (PCR; del inglés «Polymerase Chain Reaction») y sus variantes para el estudio de los polimorfismos (Quesada et al., 2004). Se trata de una auténtica clonación *in vitro* y en unos minutos, en vez de los meses o años típicamente requeridos en los proyectos de clonación *in vivo*. A continuación se indican algunos de los marcadores moleculares de DNA más importantes que hemos desarrollado y empleado.

El «Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción» (RFLP; del inglés, «Restriction Fragment Length Polymorphism») es una técnica anterior a la PCR y que tiene un gran valor para la mejora genética guiada por marcadores moleculares. Ello se debe a que genera marcadores codominantes; es decir, es posible diferenciar el heterocigoto o híbrido de cada uno de los dos homocigotos. Por tanto, es muy informativa en este respecto. Por otro lado, estos marcadores son transferibles, lo cual permite utilizarlos en diferentes mapas genéticos. Además, pueden estar bastante conservados entre especies e incluso géneros o grupos superiores. Ello permite emplearlos como marcadores heterólogos, cuando los homólogos no están disponibles. Los inconvenientes fundamentales de los RFLPs es que requieren una considerable inversión de tiempo y esfuerzo para su aplicación. Además es necesario disponer de las sondas correspondientes; aunque sean heterólogas. Ello no es siempre posible, sobre todo en especies cuya genómica ha sido poco estudiada, como el olivo (*Olea europaea*), si bien ésta es una especie con gran importancia económica en la cuenca mediterránea (Barranco et al, 2004, Rallo et al., 2004). Por tanto, aunque son todavía útiles, están siendo sustituidos por otros marcadores basados en PCR, así como por marcadores que usan micromatrices de ácidos nucleicos (del inglés, «microarrays» o «microchips»).

Los marcadores denominados «DNA Polimórfico Amplificado al Azar» (RAPD; del inglés, «Random Amplified Polymorphic DNA») fueron de los primeros en ser usados, entre los basados en PCR. Son todavía bastante populares, sobre todo en especies en las que se conoce poco de su genoma. Entre ellas cabe destacar las especies leñosas, como el olivo. Presentan la ventaja de que no requieren un conocimiento previo de la secuencia a estudiar, son rápidos y relativamente baratos. No obstante, son dominantes en general (es raro encontrar uno codominante), por lo que en general no sirven para diferenciar el heterocigoto de uno de los homocigotos. Además, a veces son poco consistentes y poco repetitivos entre laboratorios, e incluso dentro del mismo laboratorio. Por otro lado, no son transferibles y su interpretación no es siempre fácil.

Para solucionar los problemas asociados con los RAPDs, hemos desarrollado los denominados marcadores de «Región Amplificada de Secuencia Caracterizada» (SCAR; del inglés «Sequence-Characterized Amplified Region»). La estrategia consiste en secuenciar los RAPDs para poder diseñar cebadores específicos, que, a diferencia de los cebadores cortos e inespecíficos de los RAPDs, generen amplificaciones consistentes y repetitivas. Sin embargo, esta teoría no siempre tiene su recompensa práctica, porque a veces el diseño del cebador específico destruye el sitio polimórfico que estaba detectando el RAPD original. No obstante, otras veces se obtienen SCARs de utilidad, que son codominantes y transferibles, además de cómodos y fáciles de interpretar (Hernández et al., 2001a,b).

Entre los marcadores moleculares más útiles y apreciados se encuentran los denominados microsatélites o «Secuencias Repetidas Simples» (SSR; del inglés, «Simple Sequence Repeat»). Son muy utilizados, ya que tienen grandes ventajas, como el hecho de ser codominantes, fáciles de interpretar y susceptibles de automatización. Además, son consistentes y sorprendentemente transferibles, traspasando en muchas ocasiones las barreras entre especies, géneros e incluso grupos bastante alejados evolutivamente. No obstante, no siempre están disponibles, y en tal caso es necesario generarlos, lo cual puede ser tedioso, laborioso y caro. Además, los SSRs producidos pueden no ser útiles por ser monomórficos, careciendo por tanto del nivel de variabilidad polimórfica deseada en todo marcador molecular (Rallo et al., 2000, 2001, 2003a,b).

Con el fin de mantener las ventajas de los marcadores moleculares previamente indicados, pero al mismo tiempo no arrastrar sus inconveniente, se diseñaron y patentaron los marcadores de «Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado» (AFLP; del inglés, «Amplified Fragment Length Polymorphism»). En teoría son ideales, porque no requieren conocimiento previo de la secuencia. Por otro lado, se supuso que eran codominantes y consistentes o repetitivos, siendo también susceptibles de automatización. Además, la cantidad de información que teóricamente podían generar no tenía precedentes, siendo varios órdenes de magnitud superior a la de otros marcadores moleculares. Sin embargo, la realidad ha mostrado que pueden presentar serios problemas. Así, no son en absoluto codominantes (salvo raras excepciones), sino dominantes, no son tampoco transferibles y resultan caros, complejos técnicamente, laboriosos y de resultados inciertos y no siempre consistentes y repetitivos. La explicación de esta aparente contradicción entre la teoría y la práctica reside en la «ley del todo o nada» que rige las amplificaciones *in vitro* de DNA y las condiciones de competición extrema en que se lleva a cabo dicha PCR.

Como consecuencia de lo anteriormente indicado y del progreso de la mal llamada Era Posgenómica (de hecho, estamos en plena Era Genómica; y seguiremos en ella hasta que se secuencien y analicen a fondo los millones de genomas de las distintas especies del planeta), están ganando popularidad unos marcadores moleculares conocidos como «Polimorfismo de Nucleótido Sencillo» (SNP; del inglés, «Single Nucleotide Polymorphism»). Generalmente son mutaciones o variaciones de una sola base (transiciones, transversiones, deleciones o inserciones). Aunque en teoría pudieran ser tetraalélicos (A, C, G y T), en la práctica suelen ser bialélicos; sobre todo en las especies diploides. El auge de estos marcadores estriba en el hallazgo de que cada pocos pares de bases (de 50 a 500) suele encontrarse un SNP, que en algunos casos puede estar relacionado con la susceptibilidad a alguna enfermedad o con alguna característica de interés (resistencia a estreses abióticos o bióticos, producción u otra característica de interés, etc).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado y empleado marcadores moleculares desde 1999 para la mejora genética, identificación y trazabilidad del olivo, la aceituna y el aceite de oliva (Hernández et al., 2001a,b; Rallo et al., 2000, 2001, 2003a,b; Díez et al., 2004; Martín et al., 2004; Trujillo et al., 2004; Dorado et al., 2006). Todos estos resultados y experiencias nos han permitido proponer una nueva estrategia genómica para resolver los problemas actuales de identificación, denominación de origen y trazabilidad del olivo y sus productos derivados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Marcadores RFLPs y RFLPs de expresión. La técnica RFLP es una modificación y optimización de la metodología del «papel secante de «Southern» (del inglés, «Southern blotting»), descrita en 1975 por E. M. Southern. Sin embargo, cuando se usan sondas genómicas no codificantes, los RFLPs no suelen generar datos concluyentes o útiles en «Selección Asistida por Marcadores» (MAS; del inglés, «Marker Assisted Selection»).

Por ello, hemos realizado una modificación de la técnica, empleando como sondas los fragmentos (cDNAs) previamente obtenidos en nuestros laboratorios mediante clonación y secuenciación previa «Amplificación Rápida de Extremos de cDNA» (RACE-PCR; del inglés «Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR»). Asimismo, los cDNAs se generaron mediante «Expresión Diferencial» (DD; del inglés, «Differential Display»), también conocida como «Expresión Diferencial de la PCR de la Transcrip-

ción Reversa» (DDRT-PCR; del inglés, «Differential-Display Reverse Transcription-PCR») (Muñoz et al., 2004).

De esta forma, los RFLPs «de expresión» sirven para cartografiar regiones expresadas del genoma. Ello incrementa la probabilidad de localizar características agronómicas de interés y en particular los «Loci de Caracteres Cuantitativos» (QTLs; del inglés, «Quantitative Trait Loci»). A continuación se indica la metodología empleada:

Se purificó DNA genómico de olivo (*Olea europaea*) y se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm (1'8-2'0 a 260 nm). La pureza e integridad fueron también determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa. El DNA fue digerido con diferentes enzimas de restricción. Dada la posible interferencia de las metilaciones del DNA, se usaron enzimas no afectadas por este factor. Se emplearon diferentes combinaciones de enzimas, hasta obtener el mayor grado posible de polimorfismo. Se realizó una electroforesis de la digestión en gel de agarosa. Se comprobó la digestión mediante fluorescencia ultravioleta (UV), en presencia de bromuro de etidio (EtBr).

El DNA digerido fue fragmentado (HCl), desnaturalizado (NaCl/NaOH) y neutralizado (NaCl/Tris-HCl, pH 7'4). El DNA se transfirió del gel de agarosa a una membrana de nylon, mediante capilaridad. Se unió del DNA a la membrana (secado). Se marcó la sonda mediante un sistema no isotópico basado en el uso de psoralenos. Presenta la ventaja de ser no radiactivo y tener una alta sensibilidad (<100 fg); comparable a la de las sondas generadas con ³²P. Además, la misma membrana puede ser re-hibridada con diferentes sondas, ya que éstas pueden ser eliminadas, dejando al DNA diana (genómico) libre. Tras la exposición de una película de rayos X a la membrana, se procedió al revelado de la primera para identificar las correspondientes bandas.

Marcadores RAPD y SCAR. Los marcadores RAPD fueron generados mediante amplificación in vitro (PCR) de DNA genómico de distintos cultivares de olivo, empleando cebadores cortos aleatorios. Dichos marcadores son generalmente detectados mediante electroforesis en geles de agarosa y visualización bajo luz UV tras tinción con EtBr. También se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata, lo cual permitió observar una mayor grado de polimorfismo. Las bandas diferencialmente amplificadas entre cultivares fueron purificadas, clonadas y secuenciadas, lo cual permitió producir los correspondientes marcadores SCAR, si bien, como ya se ha indicado, ello eliminó el polimorfismo del marcador RAPD en algunos casos.

Marcadores SSR. Se siguieron dos estrategias diferentes para clonar microsatélites de olivo. En ambos casos se partió de DNA genómico de olivo digerido con enzimas de restricción. Dicho DNA fue sometido a electroforesis y se purificó el DNA de entre 0'5 a 1 kpb aproximadamente. En la primera estrategia se fijaron a membranas de nylon secuencias repetitivas sintéticas de cadena sencilla, que permitieron capturar mediante hibridación microsatélites complementarios de dichas secuencias.

En la segunda estrategia, las sondas fueron marcadas con biotina, lo cual permitió su captura con bolitas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina, una vez se realizó la hibridación con el DNA genómico (y por tanto la captura de los microsatélites complementarios a dichas secuencias). En ambos casos, los microsatélites capturados fueron clonados y secuenciados, lo cual permitió el diseño de los correspondientes cebadores que los flanqueaban para su posterior amplificación como marcadores SSR.

Marcadores SNP. Se llevaron a cabo amplificaciones tanto de cDNA (mRNA) como de DNA genómico de olivo a partir de diferentes cultivares. Dicho DNA fue secuenciado y analizado para localizar SNPs. De esta forma se han procesado cientos de secuencias de mRNAs de genes expresados diferencialmente en la interacción *Olea europaea-Spilocaea oleagina* (agente causante de la enfermedad del repilo) y DNA genómico de genes implicados en la floración y el desarrollo de las yemas del olivo (*leafy* e *apetala*).

Estos marcadores moleculares y otros obtenidos por otros autores han sido empleados también para generar mapas genéticos de ligamiento del olivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos desarrollado y empleado los siguientes tipos de marcadores moleculares en olivo (*Olea europaea*): RFLP, RAPD, SCAR, SSR y SNP. Algunas de dichas secuencias y marcadores moleculares se encuentran disponibles en el GenBank del «National Center for Biotechnology Information» (NCBI) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Uno de los problemas de los RAPDs es que a veces no generan suficiente polimorfismo entre variedades. Hemos incrementado significativamente el número de bandas amplificadas, y por tanto la probabilidad de encontrar marcadores RAPD polimórficos, sustituyendo la electroforesis en agarosa (AGE; del inglés, «Agarose Gel Electrophoresis») por electroforesis en poliacrilamida (PAGE; del inglés, «PolyAcrylamide Gel Electrophoresis»). No obstante, el uso de AGE o PAGE dependerá de cada caso,

pues la segunda es más laboriosa, cara y peligrosa (la acrilamida es un neurocarcinógeno), y a veces la primera genera resultados suficientes para diferenciar las variedades deseadas.

Hemos conseguido que los RAPDs sean suficientemente consistentes y repetitivos, utilizando unas condiciones experimentales apropiadas. Entre ellas destaca la elección de la polimerasa de DNA, habiendo encontrado los mejores resultados con el llamado fragmento Stoffel de la enzima *AmpliTaq* (Applied Biosystems). Asimismo, es importante optimizar la concentración de algunos sustratos como los cebadores, los dNTPs y el cloruro de magnesio, junto con los perfiles térmicos y su número. En este sentido ha resultado de gran ayuda nuestra experiencia en la puesta a punto y optimización de la PCR, desde 1989.

Hemos demostrado que es posible transformar marcadores de tipo RAPD en otros marcadores consistentes y repetitivos, codominantes y fáciles de interpretar, denominados SCAR. Para ello se secuenciaron los RAPDs, bien directamente o –mejor– tras su clonación, ya que de este modo se obtiene la información de todo el fragmento, sin perder las regiones de los extremos 5' y 3' del mismo. Posteriormente se diseñaron cebadores en los extremos de dicho fragmento, que permitieron amplificar marcadores SCAR en todos los casos. No obstante, no siempre se mantenía el polimorfismo previamente detectado en los RAPD, ya que generalmente hubo que diseñar el cebador en posición anidada respecto al cebador RAPD, o bien el cebador SCAR específico destruía el polimorfismo generado con el cebador RAPD. Se trata de un proceso empírico, que es necesario llevar a cabo para poder determinar el grado de polimorfismo del marcador SCAR.

Hemos desarrollado marcadores SCAR que están asociados con una mayor relación pulpa/hueso en la aceituna. Se trata de una característica con una clara importancia agronómica y para una selección guiada por marcadores.

Hemos demostrado que el análisis de marcadores moleculares tipo SCAR puede ser acelerado y abaratado mediante la detección de los mismos en el propio tubo de amplificación, sin necesidad de electroforesis. Esta estrategia sólo es viable para amplificaciones específicas, en las que existe o no amplificación significativa en el tubo de reacción.

Hemos identificado una secuencia del primer y único retrotransposón de olivo descrito hasta la fecha. Se trata de una secuencia SCAR procedentes de RAPD, que es útil para el desarrollo de marcadores moleculares y estudios evolutivos, ya que se encuentra presente en gran número de especies y entidades biológicas.

Se han generado nuevos microsatélites de olivo mediante digestión de DNA genómico de olivo, hibridación, clonación y secuenciación. Entre ellos se han encontrado marcadores SSR monomórficos y polimórficos. Estos últimos han sido empleados en estudios de paternidad e identificación de olivos, aceitunas y aceite de oliva. Como se ha indicado anteriormente, los SSR son marcadores moleculares muy apreciados, aunque su desarrollo puede ser largo y costoso.

En la búsqueda de un sistema RFLP que permitiera aprovechar las ventajas de la PCR, se han desarrollado RFLPs de expresión. Se trata de SNPs de cDNAs (mRNAs) de genes expresados diferencialmente, tanto en el caso de genes implicados en la floración (*leafy* y *apetala*), como en la interacción del huésped parásito *Spilocaea oleagina* con el olivo hospedador. Se han encontrado SNPs tanto en regiones codificantes como no codificantes.

Se han generado mapas genéticos de ligamiento con éstos y otros marcadores moleculares (DeLaRosa, 2003). De este modo podrán emplearse los marcadores genéticos en programas de mejora guiada por marcadores y en futuros proyectos de genómica del olivo.

Es posible obtener y amplificar DNA de hojas o yemas de olivo y de aceitunas, siempre que se eliminen posibles inhibidores de las reacciones subsecuentes (restricción, amplificación, etc). Sin embargo, la obtención de DNA a partir de aceite de oliva requiere una metodología y optimización especial, que hemos llevado a cabo en los últimos años. Asimismo, hemos propuesto una nueva estrategia genómica para permitir la trazabilidad e identificación varietal del olivo, aceituna y aceite de oliva de forma precisa y sin ambigüedades, para cualquier variedad. Ello no es posible actualmente para todas las variedades, y –sobre todo– en el caso del aceite de oliva. El objetivo final es el desarrollo de un DNI genómico que permita dicha identificación varietal del olivo y derivados. Por otro lado, estos avances posibilitan también la obtención de olivos, aceitunas y aceite mejores mediante biotecnología (Dorado, 2002; Chawla y Dorado, 2006).

AGRADECIMIENTO

Financiado por Proyectos CAO00-018-C7-1 y CAO00-018-C7-3, Grupo PAI CTS-413 (Junta de Andalucía) y proyecto Oliv-Track QLRT-2001-02386 (Unión Europea).

BIBLIOGRAFÍA

- BARRANCO D, FERNÁNDEZ-ESCOBAR R, RALLO L (eds) (2004): «El Cultivo del Olivo». 5ª ed. Mundi-Prensa (Madrid).
- CHAWLA HS, DORADO G (eds) (2006): «Plant Genomics: Concept and Application». Science Publishers (Nueva York). En prensa.
- DÍEZ A, DORADO G, GIMÉNEZ MJ, HERNÁNDEZ P, MARTÍN A, PASCUAL P, RALLO P, RINALDI L, DELAROSA R (2004): El ADN en la trazabilidad del aceite de oliva. *Oleo* 103: 50-58.
- DORADO G (2001): Marcadores moleculares. *Fruticultura Profesional* 120 (Especial Olivicultura III): 82-87.
- DORADO G (ed) (2006): «Molecular Markers, PCR, Bioinformatics and Ancient DNA - Technology and Applications». Science Publishers (Nueva York). En prensa.
- DORADO G, CABALLERO JL, MUÑOZ BLANCO J (2001): «Fingerprinting» mediante marcadores moleculares en biotecnología: descripción, aplicaciones y perspectivas. En: Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz Blanco J (eds). «Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y Aplicaciones». Capítulo 7, pp 163-195. Colección Mayor. Publicaciones Obra Social y Cultural CajaSur (Córdoba).
- DORADO G, DELAROSA R, RALLO P, MARTÍN A (2004): Marcadores moleculares. En: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, DelRío C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds): «Variedades de Olivo en España», Sección 3: Mejora Genética y Biotecnología, Capítulo 2. Mundi-Prensa (Madrid).
- DORADO G, GIMÉNEZ MJ, RALLO P, HERNÁNDEZ P, BENÍTEZ Y, DÍAZ A, DELAROSA R, CABALLERO JL, MUÑOZ-BLANCO J, MARTÍN A (2006): Trazabilidad del aceite de oliva, identificación de aceitunas y mejora genética del olivo mediante marcadores moleculares. *Mercacei* (en prensa).
- DORADO PÉREZ G (2002): La Biotecnología y la Industria Alimentaria. *Endocrinología y Nutrición* 49 (Especial Nutrición): 53-56.
- HERNÁNDEZ P, DELAROSA R, RALLO L, DORADO G, MARTÍN A (2001a): 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.
- HERNÁNDEZ P, DELAROSA R, RALLO L, MARTÍN A, DORADO G (2001b): 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 (6/7), 1082-1087.
- MARTÍN A, RALLO P, DORADO G, VALPUESTA V, BOTELLA MA, DELAROSA R (2004): Utilización de marcadores en la mejora genética del olivo. En: Rallo L, Ba-

- rranco D, Caballero JM, DelRío C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds): «Variedades de Olivo en España». Sección 3: Mejora Genética y Biotecnología, Capítulo 4. Mundi-Prensa (Madrid).
- MUÑOZ J, BENÍTEZ Y, TRAPERO A, CABALLERO JL, DORADO G (2004): Identificación de genes expresados diferencialmente en la interacción entre el olivo (*Olea europaea* L.) y el hongo parásito causante del repilo (*Spilocaea oleagina*). En: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, DelRío C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds): «Variedades de Olivo en España». Sección 3: Mejora Genética y Biotecnología, Capítulo 5. Mundi-Prensa (Madrid).
- QUESADA JM, CASADO A, DÍAZ C, BARRIOS L, CUENCA-ACEVEDO R, DORADO G (2004): Allele-frequency determination of *BsmI* and *FokI* polymorphisms of the *vdv* gene by quantitative real time-PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 209-214.
- RALLO L, BARRANCO D, CABALLERO JM, DELRÍO C, MARTÍN A, TOUS J, TRUJILLO I (eds) (2004): «Variedades de Olivo en España». Mundi-Prensa (Madrid).
- RALLO P, DORADO G, DELAROSA R, DÍAZ A, BALLESTEROS J, MARTÍN A (2003a): Desarrollo y utilización de marcadores microsatélites de olivo. En: «Difusión de Resultados de Investigación del Programa de la Calidad de la Producción del Aceite de Oliva», pp 31-38. Ministerio de Ciencia y Tecnología; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Madrid).
- RALLO P, DORADO G, MARTÍN A (2001): Aplicación de microsatélites en pruebas de paternidad. *Fruticultura Profesional* 120 (Especial Olivicultura III): 92-94.
- RALLO P, TENZER I, GESSLER C, BALDONI L, DORADO G, MARTÍN A (2003b): Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor Appl Genet* 107: 940-946.
- RALLO P, DORADO G, MARTÍN A (2000): Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 984-989.
- DELAROSA R, ANGIOLILLO A, GUERRERO C, PELLEGRINI M, RALLO L, BESNARD G, BERVILLÉ A, MARTÍN A, BALDONI L (2003): A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1273-1282.
- TRUJILLO I, MORALES A, VALPUESTA V, BOTELLA MA, BELAJ A, RALLO P, MARTÍN A, DORADO G (2004): Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. En: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, DelRío C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds): «Variedades de Olivo en España». Sección 3: Mejora Genética y Biotecnología, Capítulo 3. Mundi-Prensa (Madrid).