

Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares

Cavagnaro, P.; J. Juárez; M. Bauza y R.W. Masuelli

RESUMEN

En el mundo se conocen cerca de 2000 variedades de olivo (*Olea europea* L.). En Argentina las variedades más cultivadas provienen de España e Italia, introducidas en ocasiones por inmigrantes europeos. La mayoría de las variedades introducidas mantuvieron su nombre original, sin embargo existen dudas sobre las denominaciones de algunos genotipos. Con el fin de esclarecer posibles confusiones en las denominaciones de las variedades en Argentina, se procedió a la caracterización de las 10 variedades más cultivadas en Argentina a través del uso de caracteres del endocarpo y de marcadores moleculares. Mediante el análisis de 5 caracteres del endocarpo se pudo diferenciar 8 variedades de olivo, mientras que con 10 productos de amplificación RAPD, altamente reproducibles, fue posible discriminar cada una de las variedades ensayadas. Los patrones RAPD de 7 variedades de la Colección de Olivo del INTA-Junín fueron comparados con los patrones de las mismas variedades nominales procedentes del Banco de Germoplasma de Olivo de España. La variedad Manzanilla de Carmena fue la única que compartía el 100% de los marcadores con la muestra de España. Las restantes variedades compartieron menos del 90% de los marcadores, indicando que los ejemplares locales analizados corresponden a genotipos diferentes a las muestras del Banco de Germoplasma de España.

Palabras clave: olivo, identificación varietal, marcadores moleculares, RAPD

Cavagnaro P.; J. Juárez; M. Bauza and R. W. Masuelli, 2001. Use of morphological and molecular markers for discrimination among olive varieties. Agriscientia XVIII: 27-35

SUMMARY

Approximately 2000 olive varieties are known in the world. In Argentina most of the varieties were introduced from Spain or Italy in different occasions since the Spanish conquer. Many of them conserved the original denomination, however there exists confusion concerning the names of many genotypes. In order to shed some light on the variety denomination, 10 of the most important Argentine olive cultivars were characterized using morphological and molecular markers. The

analysis of 5 endocarp characters allowed the discrimination of 8 out of the 10 varieties analyzed. Ten highly reproducible RAPD products were used to differentiate the varieties. RAPD patterns of 7 Argentine varieties were compared with the ones originated by Spanish varieties with the same denomination. Only Manzani-lla de Carmona from INTA-Junín shared 100% of the markers with the corresponding variety from Spain. The percentages of common markers among the other six pair of varieties were below 90%. These results suggest that the genotypes from Argentina are different from the Spanish genotypes.

Key words: olive, variety identificaron, molecular markers, RAPD

P. Cavagnaro y R. W. Masuelli. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agrarias, U. N. de Cuyo, C. C. 7 (5505) Chacras de Co-ria, Mendoza, Argentina. J. Juárez y M. Bauza. Cátedra de Industrias Agrarias, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N. de Cuyo. E-mail: pfcavagnaro@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo (*Olea europea* L.) se originó en el Oriente Medio hace más de 6000 años. Su origen antiguo, la hibridación temprana entre distintas especies del género *Olea* y la selección de plantas por los primeros olivicultores produjo numerosas variedades. La propagación vegetativa ha mantenido las características de muchos cultivares y hoy en día se conocen unas 2000 variedades (Fontanazza, 1993). Sin embargo, el comercio, la difusión de las variedades tradicionales y la obtención de nuevas variantes fenotípicas, han generado una situación de confusión respecto a la denominación de los cultivares. En España hay 262 variedades con más de 500 denominaciones varietales diferentes (Barranco, 1997). Numerosas sinonimias y la existencia de grupos de cultivares con características morfológicas similares dificultan la labor de clasificación e identificación (Barranco y Rallo, 1984; Fontanazza, 1993).

En Argentina las variedades más cultivadas provienen de España e Italia y fueron introducidas por los inmigrantes europeos desde el descubrimiento de América. En muchos casos las variedades mantuvieron su nombre original, pero existen dudas sobre las denominaciones de algunos genotipos. La identificación de algunas plantas a través de caracteres morfológicos del árbol, hoja, inflorescencia, etc., ha sido difícil debido a que estos parámetros están fuertemente influenciados por el ambiente. En nuestro país las condiciones ecológicas y de cultivo no son las mismas que las de los países de origen de la variedad, por ello las plantas tienen un desarrollo diferente. Esta situación dificulta el uso de algunos descriptores desarrollados por Barranco y

Rallo (1984), para identificar variedades cultivadas en España, cuando se pretende identificar cultivares locales. Sin embargo, estos autores citan caracteres del endocarpo como altamente heredables, poco influenciados por el ambiente y de valor en la distinción de variedades.

En los últimos años se ha tratado de solucionar estos problemas a través del uso de métodos bioquímicos o moleculares que permitan identificar los distintos genotipos de olivo. Trujillo *et al.* (1995) lograron discriminar 132 variedades de olivo utilizando marcadores isoenzimáticos obtenidos a partir de muestras de polen. Un inconveniente de los marcadores isoenzimáticos es que, aunque en menor grado que los caracteres morfológicos, también están influenciados por el ambiente. Otras desventajas del método son que sólo permite obtener muestras de polen de plantas adultas y la marcada estacionalidad en la producción de polen. La alternativa de usar hojas en lugar de polen se ve dificultada debido al elevado contenido de polifenoles presentes en sus tejidos (Loomis & Bataille, 1966).

El uso de marcadores moleculares a nivel del ADN posibilitaría la identificación de genotipos que crecen en diferentes condiciones ecológicas, ya que no se encuentran influenciados por el ambiente. Fabbri *et al.* (1995), demostraron la utilidad de la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para discriminar entre cultivares de olivo.

A partir de la promulgación de la Ley Nacional 22.021, de Promoción Agrícola en la Argentina, la superficie cultivada con olivos prácticamente se triplicó (Tachini, 1999). Los montes se implantaron con plantas provenientes de viveros locales y de importación. Los viveros locales realizan la propagación

de su material vegetal en forma de estacas a partir de plantas de olivares establecidos hace años en la región. En estos casos la identificación varietal de las plantas madres la realiza el propio viverista, de acuerdo a su experiencia, sin contar con descriptores que lo guíen en la identificación de la variedad. Así mismo no se cuenta, hasta el momento, con técnicas que permitan identificar las plantas jóvenes de vivero. Con el fin de mantener los estándares de calidad a nivel internacional es necesario identificar las variedades que son reconocidas en el ámbito mundial. En el país existen colecciones de más de 50 años con variedades originarias de varios países del mediterráneo que pueden servir como referentes para desarrollar descriptores de las variedades cultivadas en Argentina (Mársico, 1976).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar diez de las variedades de olivo más difundidas en el país, a través de la utilización de caracteres morfológicos del endocarpo y de marcadores moleculares, para utilizarlas como patrones de identificación de variedades de olivo en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con muestras de frutos y hojas de las siguientes variedades: Empeltre, Frantoio, Arbequina, Arauco, Changlot Real, Manzanilla Española, Manzanilla de Carmona, Farga, Aloreña y Nevadillo. Las variedades se encuentran en la Colección de Variedades de Olivo de la EEA INTA Junín (INTA-J), Mendoza, Argentina. Hojas de las variedades Farga, Empeltre, Frantoio, Manzanilla Española, Manzanilla de Carmona, Arbequina y Arauco, procedentes del Banco de Germoplasma de Olivo de Córdoba, Alameda del Obispo, Córdoba, España (BGCE), fueron enviadas y utilizadas para los análisis de RAPDs.

Caracteres morfológicos del endocarpo

Se recolectaron 50 frutos por árbol y se les eliminó la pulpa manualmente, previo tratamiento con una solución al 10% de hidróxido de sodio por 42 horas. Luego se los mantuvo por 12 horas en una solución de hidróxido de sodio al 5% para eliminar el resto de pulpa. Finalmente, para blanquear los endocarpos, se los trató con ácido cítrico al 5% por 24 horas, se los lavó con agua destilada y se los dejó secar.

Se tomaron datos de caracteres del endocarpo según Barranco y Rallo (1984):

a) Forma en posición A y B (la posición "A" corresponde a la máxima asimetría y es aquella donde la sutura carpelar queda a la vista del observador y la posición "B" se obtiene de girar 90° el endocarpo, de modo que la porción más desarrollada queda hacia el observador). La forma fue determinada por la relación entre el largo (L) y el ancho (A): 1) esférica ($L/A < 1,4$); 2) ovoidal (L/A entre 1,4 y 1,8); 3) elíptica (L/A entre 1,8 y 2,2); 4) alargada ($L/A > 2,2$).

b) Simetría en posición A y B, determinada por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales: 1) simétrico; 2) ligeramente simétrico; 3) asimétrico.

c) Posición del diámetro transversal máximo (en posición B): 1) hacia la base; 2) centrada; 3) hacia el ápice.

d) Forma de la base: 1) truncada; 2) apuntada; 3) redondeada.

e) Forma del ápice: 1) apuntada; 2) redondeada.

f) Distribución de los surcos fibrovasculares: 1) uniforme; 2) agrupados junto a la sutura.

g) Número de surcos fibrovasculares: 1) bajo (< 7); 2) medio (entre 7 y 10); 3) alto (> 10).

h) Terminación del ápice: 1) con mucrón; 2) sin mucrón.

i) Continuidad de los surcos fibrovasculares: 1) llegan al ápice; 2) no llegan al ápice.

j) Forma de la sección transversal máxima: 1) circular; 2) elíptica.

Extracción del ADN

Se recolectaron hojas jóvenes de las diez variedades y se extrajo el ADN a través del método de microextracción de Dellaporta *et al.*, (1983). La pureza (estimada como la relación de absorbancias a 260:280 nm) y la concentración de ADN se determinaron con un espectrofotómetro GeneQuanta (PharmaciaTM). La integridad del ADN se analizó a través de electroforesis en minigel de agarosa (Maniatis *et al.*, 1982).

Uso de marcadores moleculares

Se utilizó la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para generar patrones característicos de las 10 variedades. Se ensayaron 15 oligonucleótidos "iniciadores", seleccionándose luego aquellos que generaron mayor polimorfismo y reproducibilidad en los patrones amplificados.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenía: 10 mM Tris (pH 9.0),

Tabla 1. Caracterización de diez variedades de olivo a través de caracteres del endocarpo

Caracter	Variedades										Promedio de valores en la moda (%)
	Empeltre	Arauco	Abreña	Nevadillo	Changlot	Farga	Frantoio	Manzanilla de Carmona	Manzanilla Española	Arbequina	
Forma de posición en A	AI (2,8+0,3)	AI (2,5+0,3)	O (1,6+0,2)	E (2,1+0,2)	E (2,2+0,2)	AI (2,4+0,2)	E (2,2+0,2)	E (1,8+0,2)	E (1,9+0,2)	E (2,0+0,2)	-
Forma de posición en B	AI (100%)	AI (100%)	E (66%)	AI (94%)	AI (92%)	E (100%)	E (100%)	E (100%)	E (100%)	E (100%)	95,2
Simetría de posición en A	LS (94%) ^a	Asim (84%)	LS (96%)	LS (94%)	LS (94%)	LS (100%)	LS (100%)	LS (98%)	LS (100%)	LS (98%)	95,8
Simetría de posición en B	S (96%)	S (96%)	S (100%)	S (100%)	S (64%)	S (100%)	S (78%)	L Asim (76%)	L Asim (100%)	S (100%)	91,0
Sección transversal	Cir (100%)	Cir (100%)	E (98%)	Cir (100%)	E (92%)	Cir (100%)	Cir (100%)	Cir (76%)	Cir (100%)	Cir (100%)	96,6
Posición del diámetro máximo	Cen (86%)	Cen (98%)	Cen (94%)	Cen (92%)	Cen (100%)	HAp (54%)	HAp (56%)	Cen (90%)	Cen (100%)	Cen (74%)	84,4
Número de surcos	6,4+1,0	9,7+1,2	10,0+1,2	9,3+1,3	7,5+0,9	11,0+0,8	6,3+0,7	9,2+0,8	6,6+1,0	9,6+1,2	-
Distribución de los surcos	U (100%)	U (100%)	U (100%)	U (100%)	Agrup (100%)	U (100%)	U (100%)	U (95%)	Agrup (100%)	U (100%)	99,1
Forma de la base	Apu (100%)	Tru (86%)	Red (94%)	Red (100%)	Red (100%)	Apu (100%)	Apu (100%)	Red (100%)	Red (100%)	Apu (100%)	98,0
Forma del ápice	Apu (100%)	Apu (98%)	Red (100%)	Apu (100%)	Apu (100%)	Red (100%)	Red (68%)	Red (100%)	Apu (100%)	Red (100%)	96,6
Terminación del ápice	SinM (100%)	SinM (100%)	SinM (100%)	SinM (94%)	SinM (100%)	SinM (94%)	ConM (68%)	SinM (100%)	SinM (100%)	ConM (100%)	95,6
Continuidad de surcos	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	LIAp (100%)	100

a. Porcentaje de endocarpios en la categoría modal.

Abreviaciones: AI, alargada, O, ovoidal, E, elíptica, LS, ligeramente simétrica, L Asim, ligeramente asimétrica, Asim, asimétrica, S, simétrica, Cir, circular, Cen, centrado, HAp, hacia el ápice, U, uniforme, Agrup, agrupados, Apu, apuntada, Tru, truncada, Red, redondeada, SinM, sin mucron, ConM con mucron, LIAp, llega al ápice.

1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador de 10 pares de bases de longitud (Operon Technologies, Alameda, California), entre 60 y 80 ng de ADN genómico y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega). El termociclador MJ Research PTC-100 fue programado de la siguiente manera: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min., 45 ciclos a 92°C por 30 seg., 35°C por un min. y 72°C por 2 min., finalmente se incluyó un paso final de extensión a 72°C por 5 min..

Para evaluar la consistencia de los productos amplificados, cada reacción RAPD se repitió de 3 a 5 veces usando, en cada caso, ADN de extracciones independientes.

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis a 5 V/cm en geles de agarosa al 1.5% (P/V) en buffer TBE. Los geles se trataron con bromuro de etidio (0,5mg/ml), se expusieron a luz ultravioleta y fotografiaron con cámara Polaroid usando un film 667.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Discriminación de las variedades a través de caracteres del endocarpo

Los caracteres del endocarpo analizados mostraron diferente grado de dispersión con respecto al valor modal (Tabla 1). Caracteres como "distribución de surcos" y "forma de la base" presentaron un menor grado de dispersión en relación a la moda (en promedio 99,1 y 98,0% de los datos respectivos de cada carácter coincidieron con el valor modal). El carácter "posición del diámetro transversal máximo" resultó poco consistente ya que solo el 84,4% de los datos coinciden con la moda. Este indicador es particularmente impreciso cuando se quieren discriminar variedades como Farga y Frantoio; aquí solo el 54 y 56%, respectivamente, de los endocarpios analizados presentaron la posición "hacia el ápice" y el restante 46 y 44% se presentó en posición "centrado".

A través del análisis de 5 de los caracteres más confiables del endocarpo fue posible diferenciar 8 de las 10 variedades analizadas (Tabla 2). Las variedades Frantoio y Arbequina no se pudieron diferenciar a través de estos caracteres. El análisis de caracteres menos confiables como "número de surcos" y "posición del diámetro máximo" permitiría la separación de estas variedades.

Un inconveniente de este método para diferenciar variedades es que el análisis de algunos caracteres cualitativos se basa en apreciaciones subjetivas.

Así, por ejemplo, el endocarpo de una variedad puede parecer "ligeramente asimétrico" o "simétrico", según el observador que realice el estudio. Esta falta de estandarización en el método para evaluar este tipo de caracteres dificulta el aprovechamiento de información sobre clasificaciones varietales provenientes de otras regiones. Este aspecto es de particular importancia para los productores locales ya que muchas de las variedades fueron introducidas originalmente desde países de la cuenca del Mediterráneo y su verificación podría ayudar al ordenamiento local de ellas; así también se podrían aclarar problemas de sinonimia y homonimia que existen entre los cultivares de ambas regiones.

Discriminación de las variedades utilizando marcadores RAPD

Los 15 iniciadores ensayados amplificaron fragmentos de ADN con tamaños entre 200 y 3000 pares de bases, con un promedio de 8,26 bandas por iniciador. El número de bandas por iniciador varió entre 1 y 16, y en total se analizaron 124 bandas. El número de bandas polimórficas por iniciador varió entre 0 y 6, con un promedio de 2,46 bandas (Tabla 3). El perfil de los productos de RAPD obtenido con el iniciador OPB 6 y OPA 19, para las 10 variedades ensayadas, se puede observar en la Figura 1.

En base al nivel de polimorfismo y la reproducibilidad de los patrones de amplificación RAPD se seleccionaron 5 iniciadores: OPA19, OPB 4, OPB 6, OPB14 y OPB19 de los quince ensayados. De los 5 iniciadores se seleccionaron aquellas bandas polimórficas que eran más intensas y altamente reproducibles. El número de bandas polimórficas altamente reproducibles (P.A.R.) por iniciador varió entre 0 y 3, siendo el promedio 0.66 (Tabla 3). No se consideraron como bandas P.A.R. aquellas cuya intensidad era débil ya que, ante pequeños cambios en las condiciones de amplificación, tendían a desaparecer. Los 5 iniciadores seleccionados produjeron 10 bandas P.A.R. (Tabla 4), las que permitieron diferenciar las 10 variedades de olivo. En un trabajo similar Mekuria *et al.* (1999) utilizaron seis iniciadores para diferenciar 22 introducciones comerciales de olivo de importancia para Australia.

La obtención de bandas diferenciales se mantuvo constante cuando se utilizaron concentraciones de ADN molde entre 10 a 500 ng por reacción. Sin embargo, cuando se utilizaron muestras de ADN con escasa pureza, el patrón de bandas sólo fue reproducible hasta 200 - 260 ng por reacción. Purificaciones de estas muestras, con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y ARNasa, permitió aumentar el rango de concentración utilizable con resultados reproducibles.

Tabla 2: Clave para la diferenciación de las variedades de olivo a través de caracteres del endocarpio

Terminación del ápice	Forma del ápice	Forma del endocarpio (B)	Sección transversal máxima	Forma de la base	Variedades	Ejemplo
Sin mucrón	apuntada	alargada	circular	apuntada	Empeltre	
				truncada	Arauco	
				redondeada	Nevadillo	
			elíptica	redondeada	Changlot	
	redondeada	elíptica	circular	redondeada	Manzanilla Española	
				redondeada	Aloreña	
			circular	apuntada	Farga	
				redondeada	Manzanilla de Carmona	
Con mucrón	redondeada	elíptica	circular	apuntada	Frantoio	
				apuntada	Arbequina	

Tabla 3. Iniciadores ensayados para diferenciar las variedades de olivo, a. PAR: fragmentos amplificados polimórficos Altamente reproducibles.

Iniciador	Secuencias (5'-3')	Fragmentos amplificados		
		Total	Polimórficos	PAR ^a
OPA-02	TGCCGAGCTG	1	0	0
OPA-04	AATCGGGCTG	6	0	0
OPA-10	GTGATGCGCAG	7	1	0
OPA-11	CAATCGCCGT	8	0	0
OPA-15	TTCCGAACCC	6	2	0
OPA-19	CAAACGTOGG	14	7	2
OPB-01	GTTTCGCTCC	13	3	0
OPB-02	TGATCCCTGG	2	0	0
OPB-03	GATCCOCTG	6	2	0
OPB-04	GGACTGGAGT	9	6	1
OPB-06	TGCTCTGOCO	6	2	1
OPB-08	GTCCACACGG	10	3	0
OPB-14	TCCGCTCTGG	8	4	3
OPB-19	ACCCCGAAG	16	6	3
OPB-20	GGACCCTTAC	12	3	0
Promedio		8.26	2.53	0.66

cibles, al eliminar gran parte de las moléculas contaminantes que interfieren con la reacción de PCR.

El polimorfismo hallado entre las variedades ensayadas coincide con resultados de estudios previos obtenidos sobre diferentes germoplasmas, utilizando marcadores RAPDs (Fabbri *et al.*, 1995) e isoenzimas (Pontikis *et al.*, 1980; Trujillo *et al.*, 1990

Quazzani *et al.*, 1993) y confirma que el olivo es una especie con una elevada variabilidad genética (Zohary & Spiegel-Roy, 1975). Esta variabilidad permite obtener un elevado número de fragmentos polimórficos con relativamente pocos iniciadores, permitiendo así selecciones más rigurosas de los marcadores considerados para la caracterización de cultivares.

plicadas sexualmente; c) es posible que a algunas variedades se las haya introducido al Banco de Germoplasma con el nombre cambiado.

En los últimos años se desarrollaron una serie de técnicas moleculares que permiten obtener marcadores más consistentes y que detectan un mayor grado de polimorfismo que los marcadores RAPD. La técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) permite aumentar entre cinco y diez veces el número de fragmentos amplificados y además es más confiable que los RAPD. Los microsatélites han sido utilizados con éxito para diferenciar variedades en cultivos como la vid (*Vitis vinifera* L.) (Thomas & Scott, 1993), sin embargo el desarrollo de estos marcadores es muy costoso y en olivo hasta el momento no se han citado microsatélites. Debido a que el uso de estas técnicas implica un mayor costo económico y complejidad operativa, los marcadores RAPD son una alternativa simple, económica y confiable si se seleccionan las bandas polimórficas que son reproducibles. El desarrollo de marcadores SCARs (Sequence Characterized Amplified Region) a partir de RAPDs resolvería la relativa baja consistencia que se le atribuye a estos marcadores.

Las ventajas de los marcadores moleculares radican en que no se encuentran influenciados por el ambiente. Esto permite que sean utilizados en la identificación de plantas jóvenes de vivero, donde es sumamente difícil identificar la variedad a través del análisis de caracteres morfológicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Diego Barranco, quien gentilmente nos envió muestras de brindillas de las variedades procedentes del Banco de Germoplasma de Olivo de Córdoba, España, lo cual permitió la comparación entre ambos grupos de materiales.

BIBLIOGRAFÍA

- Barranco, D. y L. Rallo, 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Departamento de Pomología ETSIA, Universidad de Córdoba. Junta de Andalucía Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, España, pp. 107-111.
- Barranco, D., 1997. Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo. Mundiprensa y Junta de Andalucía. Madrid,
- D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo (Eds), pp. 59-80.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Reporter* 1:19-21.
- Fabbri, A.; J.J. Homaza and V.S. Polito, 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 120(3): 538-542.
- Fontanazza, G. 1993. Olivicultura intensiva meccanizzata. Bologna: Edagricole, pp. 112-118.
- Loomis, W.D. and J. Bataille, 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plants enzymes. *Phytochemistry*, 5:423-438.
- Maniatis, T.; E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., pp 6.14-6.15.
- Mársico, D.F., 1976. Olivicultura. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, ACME, p. 112.
- Mekuria, G.T.; G.G. Collins and M. Sedgley, 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74:309-314.
- Ouazzani, N.; R. Lumaret, P. Villemur, and F. Di Giusto, 1993. Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *Journal of Heredity*, 84:34 - 42.
- Pontikis, C. A.; M. Loukas, and G. Kousounis, 1980. The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 55:333-343.
- Rallo, L., 1995. Selección y mejora genética del olivo en España. *Olivae*, 59:46-53.
- Tachini, J., 1999. Análisis de la situación económica actual y perspectiva futura de la olivicultura argentina. 4^o Simposio Internacional de Olivicultura, Mendoza, Argentina.
- Thomas, M.R. and N.S. Scott, 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence tagged sites (STS). *Theoretical and Applied Genetics*, 86:895-900.
- Trujillo, I.; L. Rallo, E. A. Carbonell, and M. J. Asins, 1990. Isoenzymatic variability of olive cultivars according to their origin. *Acta Horticulturae*, 286:137-140.
- Trujillo, I.; L. Rallo and P. Arus, 1995. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 120:318-324.
- Vos, P.; R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau, 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Zohary, M. and P. Spiegel-Roy, 1975. Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* 187(4174):319-327.