

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENOTIPOS DE OLIVOS EN URUGUAY, A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS.

Pereira, J^{1.}, Bernal, J^{1.}, Martinelli, L^{1.}, Villamil, JJ^{2.} y P. Conde^{2.}

¹Facultad de Agronomía, Av. Gral. Eugenio Garzón 780. CP 12900.

²INIA, Fruticultura Las Brujas. Ruta 48, Km. 10. Canelones. CP. 11700.

Correo electrónico jeepb@fagro.edu.uy

Palabras claves: olivos centenarios, Uruguay, América, marcadores morfológicos, evolución

Introducción

En Uruguay existen cerca de quinientos olivos que datan entre 200 y 350 años, en producción, adaptados a nuestras condiciones edafo-climáticas y factibles de ser multiplicados y convertirlos en variedades comerciales. Dado que el olivo es originario de Europa, resulta evidente preguntarnos ¿Cómo llegó al actual territorio de la República Oriental del Uruguay? Las respuestas están en la existencia de una serie de acontecimientos ligados a llegada de los navegantes procedentes de España, Italia y Portugal y su posterior dispersión por todo el continente americano.

Las especies vegetales que llegaron al nuevo mundo, fueron traídas desde el Puerto de San Lucar de Barrameda, cercano a Sevilla, en la expedición al mando de Gil González De Dávila en 1521, siendo entre otras, garbanzos, habas " (Cuervo, 1894, IV, 94.)

La primera escala de toda la carga fue la Isla Española o Santo Domingo, y luego algunas cosas llegaron directamente al continente." (Cabo, 1891, II, 382;- , 1956, I, 393).

Pero dado que esta especie no crece en clima tropical, por distintas vías fue llevada al norte (México y Estados Unidos) y al sur de América (Perú, Chile, Argentina, Uruguay).

Las mudas, estacas y plantas ya prendidas, llegaron en tinajones y otras vasijas de madera, barro, loza a Perú en 1560, traídos por Antonio de Ribera.(Cabo, 1891, opcit).

Tres de esos árboles sobrevivieron y fueron plantados en Lima, Perú. Más tarde, los árboles procedentes de estos cortes comenzaron a producir frutos de buena calidad. Un relato histórico de Garcilaso de la Vega (1965) de la desaparición misteriosa de uno de esos árboles, luego de ser plantados. Más tarde, a fines del siglo XIV Durante el siglo 16 y más tarde se descubrió en el valle de Azapá (que ahora está en Chile, Arica Parinacota), donde permaneció durante más de tres años. Dadas las excelentes condiciones de crecimiento para oliva en este lugar, que era mucho mejor que los de Lima, y posiblemente debido a que no se poda, el árbol rápidamente comenzó a brotar de sus raíces. Más tarde, debido a la insistencia de Antonio de Ribera para recuperar ese árbol, que fue finalmente regresó a Lima. Sin embargo, los brotes se mantuvieron en el Valle de Azapa y el primer cultivar chileno se originó probablemente hace dos siglos, probablemente debido a la selección de los productores locales de frutos de mayor tamaño y la estabilidad en la producción. Este proceso llevó a la obtención de la variedad Azapa que también se conoce localmente como Sevillana de Azapa (Tapia-Contreras et al. 2012).

Según consta en los anales españoles, la historia del cultivo de los olivos corre paralela a la de la vid; y aunque la variedad *Olea europea* no prosperó en la zona de la Nueva España — México— en el amplio territorio del Perú sí logró afianzarse “En la seca área costera, desprovista totalmente de bosques, la madera de olivo se utilizaba para la construcción y como combustible. (Haring, C.H, 1947).

Dos fechas marcan los antecedentes de la introducción a la Banda Oriental de las primeras plantas de olivos: una alrededor de 1780 con la traída desde Buenos Aires de unas pocas plantas (provenientes de España) cuyo cultivo fue documentado por el Presbítero Pérez Castellanos (1914) Sus notas escritas entre julio de 1813 y febrero de 1814 en su chacra del Miguelete confirmaban el establecimiento de “la segunda partida de 250 plantas que llegaron como estacas en 1810, que brotaron en septiembre en las costas del Miguelete” en el barrio del Prado de Montevideo. En ese tiempo comentaba que las mejores aceitunas que crecieron en esta ubicación pertenecían a un inmigrante vasco, Juan Pedro Aguirre que tenía su establecimiento en la misma zona, al otro lado del arroyo. Daba cuenta que los olivos eran de 25 a 30 años de edad, y la copa de los árboles tenía 5 a 7 m de diámetro. A partir de estas observaciones se puede suponer que estas plantas se introdujeron aproximadamente 1780. Por otro lado, otras hipótesis consideran que los portugueses introdujeron algunas plantas de olivo en los alrededores de Colonia del Sacramento cuando ocuparon las tierras entre 1680 y 1760 (Conde y Villamil, 2012)

En el hemisferio norte los olivares fueron introducidos México en 1524 por misioneros franciscanos y jesuitas. En 1531 Fray Martín de Valencia estableció plantaciones en la zona de Tulyehualco, cerca de la actual Ciudad de México. Posteriormente se establecieron plantaciones en Texcoco, Chalco y más tarde en Jalisco, Baja California y Sonora en el siglo XVII, y más recientemente en Hidalgo (Valle del Mezquital) y Tamaulipas (Perales et al., 2012)

La primera información documentada sobre olivos cultivados localmente en California es de 1803. El director de misiones franciscanas, el Padre Fermín Francisco Lasuen, registró que por primera vez se utiliza un aceite de sus propios árboles para el bautismo en la Misión de San Diego. Esta breve cita da la razón litúrgica como la más importante por la cual los frailes plantaron olivos. También necesitaban el aceite para cocinar, iluminación, jabón y en algunos casos para procesar la lana de sus ovejas (Taylor, 2012).

Vossen (2005), sin embargo señala que entre los primeros colonos europeos en California, estaban los sacerdotes misioneros españoles que trajeron consigo esquejes seleccionadas de la variedad de oliva 'Misión' a través de Baja California, México. Esta variedad 'Misión' probablemente se originó en el Perú como una semilla de una variedad española. Alrededor de 1870, fueron plantadas pequeñas huertas con muchas variedades diferentes procedentes de Europa, para producir aceite, a lo largo de la costa de California, desde San Diego hasta Sonora, y en diversas áreas de la Sierra Nevada.

Todas estas informaciones nos han llevado a realizar un estudio comparativo de los olivos existentes en nuestro país, desde el proceso fundacional de Montevideo, con materiales provenientes de todos los países de América, por donde ha transitado el cultivo desde la llegada de los primeros navegantes a fines del siglo XV y de los sitios de España y Portugal de donde partieron las plantas que llegaron a América (Conde y Villamil, 2012).

Materiales y métodos

Material vegetal. Se colectaron hojas y frutos de 350 plantas de olivo provenientes de 14 sitios situados en diversas zonas del país que se conocían por relevamientos previos (Silveira y López, 2011), y otros sitios detectados últimamente. En cinco de los sitios de colecta se contaba con datos históricos de su época de introducción y la información de procedencia, pero sin información de su característica varietal. Los olivares centenarios de zonas urbanas y sub-urbanas de Montevideo, y 8 restos de antiguas plantaciones, carecían de dicha información. Para obtener perfiles moleculares SSR de referencia se utilizaron muestras de las variedades de los sitios de procedencia de las expediciones, Cordovil, Nevadillo, Manzanilla, Picual, Sevillana, Verdeal, y cuatro variedades Americanas actuales, provenientes del proceso de dispersión y domesticación provenientes de la introducción, Azapá, Misión y Aloreña (Tabla 1).

Caracterización morfológica de hoja

De cada árbol se tomaron 40 hojas adultas caracterizándolas en función de la metodología del Consejo Oleícola Internacional (Barranco et al., 2000).

Descriptores de endocarpo

Se recolectaron 20 frutos por árbol, eliminándose manualmente la pulpa, previo tratamiento (Baccino et al. 2013). Se evaluaron datos de 6 descriptores del endocarpo (Barranco y Rallo, 1984) discriminantes para la identificación de variedades (Barranco et al., 2000):

Extracción del ADN La extracción de ADN genómico se realizó utilizando hojas jóvenes siguiendo el protocolo de Ciprianiet al. (2002).

Secuencias cebadores SSR y condiciones de amplificación y migración.

La caracterización molecular del material genético se desarrolló siguiendo las especificaciones de (Baccino et al 2013). El grado de resolución de las electroforesis se cuantificó con marcadores de peso molecular conocidos de 25-700pb con intervalos de 50 y 100 pb), y medidos los fragmentos amplificados se realizó en secuenciador automático de capilares ABI 3130.

Resultados moleculares

Los olivos amplificados con 14 pares de cebadores microsátélites. Se detectaron 97 alelos en los 14 sitios estudio, variando entre uno y 14 para cada uno, con un promedio de siete. Dichos resultados coinciden con la base de datos de la Caracterización de Variedades del Banco de Germplasma de Córdoba-España (Trujillo et al. 2014).

Accesiones	Pais de Origen	DCA-3	DCA-9	DCA-11	DCA-16	DCA-15	DCA-18	UDO-11	UDO-24	UDO-43	UDO-19	GAPU59	GAPU71	GAPU101	GAPU103
S8M2	Uruguay		170/192	134/174	169/177	254/254	168/177	125/131		175/175	129/129	210/220	121/127		159/174
Azapa	Chile	229/241	182/184	130/140	122/147	243/254	172/174	114/131	183/185	175/214	129/129	216/220	121/141	191/197	147/171
Mission	USA	241/243	170/184	140/178	148/154	254/254	174/180	116/134	164/185	175/187	129/129	210/220	124/127	191/205	171/171
Aloreña	Argentina	237/251	160/202	140/160	152/173	243/243	168/172	119/125	185/185	172/212	129/129	206/210	121/141	189/217	133/171
Cordovil	Portugal	234/241	180/204	130/178	148/154	243/243	172/174	114/125	179/185	175/212	129/129	206/210	121/141	183/197	159/171
Manzanilla	España	237/251	192/202	166/178	122/124	243/263	172/176	114/127	164/185	172/216	129/129	206/210	124/141	197/217	133/147
Nevadillo	España	241/251	160/202	160/178	122/124	263/263	166/176	119/125	183/185	172/214	129/129	210/216	118/124	191/217	133/147
Picual	España	243/247	160/198	140/178	124/144	243/254	164/170	119/131	185/185	172/177	129/129	210/210	121/141	191/217	133/155
Sevillano	España	243/247	186/202	140/182	122/124	243/243	166/185	116/127	164/185	169/175	129/129	206/206	124/147	191/199	141/147
Verdeal	Portugal	237/251	160/170	146/178	122/124	243/243	174/176	125/127	185/185	212/212	129/129	210/210	127/141	205/217	133/147

Cuadro 1. Lista de alelos ,microsátélites detectados en los 14 pares de sebadores empleados en las 10 variedades estudiadas de diferentes procedencias.

Resultados morfológicos

En las mismas variedades de olivos se estudiaron las características de hoja y futo y endocarpo, presentándose en el Cuadro 2, los resultados del estudio de los 12 caracteres de Endocarpo que resultan ser los más conservados y no son influenciados por el ambiente y pueden ser comparados los resultados de distintas procedencias. Se detectaron 27 estados en los 11 caracteres, con un promedio de 2,5, por carácter. Estos resultados también fueron corroborados con la Caracterización de Variedades del Banco de Germplasma de Córdoba-España (Trujillo et al. 2014).

Nombre del Cultivar ¹	Área de Cultivo ²	Características Morfológicas de los endocarpos											Código Morfología ¹⁴
		Peso ³	Forma.A ⁴	Simetría.A ⁵	Simetría.B ⁵	Diámetro T.B ⁷	Apice.A ⁸	Base.A ⁹	Rugosidad ¹⁰	Nº surcos ¹¹	Dist. surcos ¹²	Mucrón ¹³	
Azapa	ARG	H	EL	A	S	C	P	T	R	M	R	P	
Mission	USA	H	EP	SA	S	C	P	R	R	M	R	P	61
Cordovil de Serpa	PRT	H	EP	SA	S	A	R	P	R	L	G	P	52
Manzanillo de Cabra	SP	H	EP	SA	S	C	R	P	R	M	R	P	67
Nevadillo de Santisteban Pto.	SP	H	EP	SA	S	C	R	R	R	M	R	P	70
Pical	SP	H	EP	A	S	C	P	R	SC	M	R	A	36
Sevillana	SP	H	EP	S	S	C	R	R	R	L	G	P	79
Verdelho	PRT	M	EP	S	S	C	P	R	S	H	R	P	195
S0	URU	M	EP	S	SA	A	R	R	R	M	R	P	
S4	URU	L	O	S	SA	A	R	R	R	M	R	A	

³Peso: bajo = L (< 0.3 g); medio = M (0.3-0.45 g); alto = H (0.45-0.7 g); muy alto = VH (> 0.7 g).
⁴Forma en Posición A: esférica = S (largo/ancho < 1.4); ovoidal = O (largo/ancho 1.4-1.8); elíptica = EP (largo/ancho 1.8-2.2); elongada = EL (largo/ancho > 2.2).
⁵Simetría en posición A: simétrico = S; ligeramente asimétrico = SA; asimétrico = A.
⁶Simetría en posición B: simétrico = S; ligeramente asimétrico = SA.
⁷Posición del diámetro transversal máximo en posición B: hacia la base = B; central = C; hacia el ápice = A.
⁸Forma del ápice en posición A: apuntado = P; redondeado = R.
⁹Forma de la base en posición A: Apuntada = P; truncada = T; redondeada = R.
¹⁰Rugosidad de la superficie: liso = S; rugoso = R; escabroso = SC.
¹¹Número de surcos en el extremo basal: bajo = L (< 7); medio = M (7-10); alto = H (> 10).
¹²Distribución de surcos en la base del endocarpo: regular = R; agrupados alrededor de la sutura = G.
¹³Presencia de mucrón: presente = P; Ausente = A.
¹⁴Código numérico asignado a los diferentes perfiles morfológicos (1 a 247)

Cuadro 2. Lista de estados detectados, en los once caracteres de endocarpos estudiados en las 10 variedades de olivos de diferentes procedencias.



Figura 1. Fotos de endocarpos detectados en las variedades colectadas en Uruguay comparadas con las variedades comerciales de la zona de donde partieron las primeras plantas a Uruguay. 1. Arbequina. 2. Nuestra M.I. 3. G. Hornos. 4. Emancipación. 5 Picual. 6. Salto M.21. 7.Salto GA. 8 Salto M8. 9. Salto Sev. 10 Coratina.

Discusión y Perspectivas

Del análisis de los resultados moleculares obtenidos a partir de microsatélites surge que las variedades comerciales de donde salieron los viajeros que llegaron a América, presentan formas moleculares diferentes entre sí, y con la particularidad que entre ellas (procedentes de España y Portugal) a pesar de sus diferencias en 13 de los catorce marcadores moleculares

presentan toda uno de sus dos variantes genéticas en cada marcador iguales, pero en la combinación de las dos variantes son diferentes.

Las variedades del nuevo Mundo, Misión, Azapá, Cordovil y dos muestras de Uruguay, presentan e mismo patrón en las variates genéticas, comparten en la mayoría de los casos una de las dos variantes genéticas en cada sitio de estudio, y estas variantes están presentes en las variedades Epañolas y portuguesas.

Esto es un indicador que los materiales que se introdujeron a América procedían de sitios donde todavía los olivos se cruzaban libremente y no se habían recurrido a variedades comerciales que se propagan vegetativamente; en este caso hubieran sido iguales al alguna de las variedades del nuevo mundo. Las variedades del nuevo mundo, resultaron todas diferentes entre sí y diferentes a las del viejo mundo. Las muestras de Uruguay que hemos analizado presentan el mismo esquema de variación molecular, diferente a las variedades del Nuevo Mundo y a las de España y Portugal. En consecuencia proponemos que en nuestro estudio preliminar a nivel molecular de alta precisión hemos confirmado que los olivos que se plantaron en Uruguay y que se encuentran en producción, en condiciones de ser propagados y adaptados edafo climáticamente en nuestras condiciones ecológicas son genéticamente diferentes a todas las variedades descritas hasta el momento en zonas de América y Europa, y según las informaciones del Banco de Germoplasma de Córdoba (España) no se encuentran en su sitio de origen

Esto convierte a los genotipos encontrados en Uruguay como originales, lo que les confiere mayor valor, ya que además de haber resistido el tiempo desde su introducción entre 250 y 350 años, adaptado a las condiciones edafo climáticas del país , se encuentran en producción y además constituyen genotipos (cultivares-variedades) presentes solamente en Uruguay. Esto ha sido observado en algunas variedades Españolas y Amércia por Díez et al. (2014)

Todas estas características detalladas anteriormente, no sólo le confieren un valor histórico y antropológico excepcional, sino que además son capaces de ser propagados vegetativamente y convertirse en materiales de cultivo comercial, con potencialidades de producir un fruto y un aceite exclusivo, propio del país, factible de ser explorado no solamente como un producto distintivo de Uruguay, sino que puede convertirse en un producto fruto de olivos excepcionales y únicos de nuestro país.

Nuestra tarea continúa con la prospección de nuevos sitios, completar la caracterización molecular y morfológicas de todos los materiales encontrados, para su posterior propagación, multiplicación y convertirlos en variedades propias de Uruguay.

Biliografía

Baccino E, Scaltritti, J; Silveira, A. López, S. Gándara, J. y Jorge Pereira. 2013. Evaluacion de los descriptores morfológicos y moleculares de variedades de Olivo e Uruguay. Pg. 9-21. Jornada de Divulgación Programa de Investigación en Producción Frutícola 29 de octubre de 2013 Serie Actividades de Difusión N° 721.

Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafin F. and Trujillo I., 2000. World catalogue of olive varieties. Consejo Oleícola Internacional, Madrid.

Cabo, 1891, II, 382 1956, I, 393.

<http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/historia/puti/puti1.htm>

Cipriani, G.; Marrazzo, M.T.; Marconi, R.; Cimato, A. & Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.104, pp. 223-228.

Conde, P. y J. Villamil. 2012. Following olive footprints in Uruguay. Libro: Following olive footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses. v.: 1, p.: 414 – 420. Independent Free Lance Olive Researcher, Grower and Intl. Consultant, AARINENA Olive Network Following Olive Footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses Mohamed EL-KHOLY Focal Point Cairo, Egypt 440

MCuervo, 1894, IV, p. 270-271.

<http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/historia/puti/puti1.htm>

Diez CM, Trujillo I, Martínez-Urdioz N, Barranco D, Marfil P, Gaut BS, Rallo L. 2015. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytol.* Apr;206(1):436-47.

Garcilaso de la Vega, Inca. 1965 *Obras Completas*, Carmelo Sáenz de Santa María (ed.), 4 vols., Atlas, Madrid. 1966 *The Royal Commentaries of the Incas and the General History of Peru*, H.V. Livermore (ed.), traducción Arnold Toynbee, 2 vols., University of Texas Press, Austin. 1985

López Castiglioni, S y A. Silveira Silva. 2001. Estudios de las variedades de *Olea europaea* L. establecidas en Uruguay, con énfasis en su Historia, Caracterización establecidas en Uruguay, con énfasis en su historia, caracterización y diversidad genética a partir de marcadores molecular. Tesis para la obtención de Ingeniero Agrónomo. 208 páginas. <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2011/3828lop.pdf>

Haring C.H. 1947. *The Spanish Empire in America*. Editorial: Oxford Univ. Press, 1947, 1947

Perales C.M.A., J.S. Padilla R., E. González G. y H.R. Reyes P. 2005. Following olive footprints in Mexico. Libro: Following olive footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses. v.: 1, p.: 246-253. Mohamed EL-KHOLY Focal Point Cairo, Egypt 440

Perez Castellanos. J.M. 1914. Olivos. In: *Observaciones sobre agricultura*. Montevideo, Barreiro y Ramos. pp. 206-225.

Tapia-Contreras, A. I. 2012. Following olive footprints in Chile. Libro: Following olive footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses. Mohamed EL-KHOLY Focal Point Cairo, Egypt 440.

Taylor. J.M. 2012. Following olive footprints in Mexico. Libro: Following olive footprints (*Olea europaea* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses. v.: 1, p.: 421-321, Mohamed EL-KHOLY Focal Point Cairo, Egypt 440.

Trujillo, I., Ojeda, M., Urdioz, N., Potter, N., Barranco, D, Rallo, L., y C. M., Diez. 2014. *Tree Genetics & Genomes*

Vossen, P. (2005). Producing Olive Oil. Olive Production Manual. UC ANR. 3353

- Investigación Financiada por El Consejo Oleícola Internacional, Facultad de Agronomía y Programa de Fruticultura del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.