

PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO TIPO 11S EN SEMILLAS DE OLIVO (*OLEA EUROPAEA L.*). CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA.

Antonio J. Castro-López, José Carlos Jiménez-López, María Isabel Rodríguez-García* y Juan de Dios Alché

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain
[*mariaisabel.rodriquez@eez.csic.es](mailto:mariaisabel.rodriquez@eez.csic.es)

RESUMEN

Los tejidos de reserva de la semilla del olivo acumulan grandes cantidades de proteínas de almacenamiento en forma de cuerpos proteicos. En este trabajo se analizaron extractos proteicos de cotiledón y endospermo mediante electroforesis bidimensional (2-D). Dichas técnicas permitieron detectar el carácter básico de los péptidos p1 y p2, así como el carácter ácido de p3, p4 y p5. La espectrometría de masas de diversos spot aislados, indicó una homología relevante con la subunidad básica de las leguminas de tipo 11S. También se detectó la presencia de diversas isoformas, algunas posiblemente resultantes de modificaciones postranscripcionales. La abundancia de estas proteínas en las semillas maduras de olivo hace que dicho material pueda ser considerado una fuente nitrogenada de posible uso como complemento en nutrición animal. Otras utilidades relevantes podrían explotar un posible carácter discriminatorio entre variedades para el desarrollo de programas de mejora genética en olivo actualmente en curso.

PALABRAS CLAVE

Semilla, olivo, proteínas de almacenamiento, cotiledón, endospermo, 2D electroforesis, inmunodetección, complemento nutricional

INTRODUCCION

El árbol del olivo (*Olea europaea L.*), es un importante cultivo en muchos países, sobre todo en la cuenca mediterránea, debido a su alta productividad y a la gran calidad del aceite que se obtiene de su fruto [1]. Estos parámetros dependen a su vez de la variedad de olivo que se utilice con tal fin. Por ello, la discriminación de variedades y la evaluación de la variabilidad genética, han sido uno de los puntos clave para la creación y manejo de colecciones de germoplasma de olivo. Inicialmente, dicha discriminación se realizó con el uso de datos morfológicos [2]. Para complementar y aumentar la fiabilidad de esta clasificación, así como para establecer nuevos parámetros utilizables en los programas de mejora, que eliminan el impedimento del extenso periodo juvenil de esta planta, se están desarrollando diversos tipos de marcadores moleculares de variedades. Entre ellos figura el empleo de marcadores isoenzimáticos, determinándose su variabilidad genética [3, 4, 5 y 6].

Posteriormente, se desarrollaron marcadores basados en el ADN, proporcionando una nueva oportunidad para la caracterización genética y biodiversidad en el olivo. Algunos de ellos están basados en el polimorfismo del ADN, como RAPD [7, 8, 9, 10 y 11], AFLP [12], así como el uso de secuencias de ADN repetidas (SSRs) [13, 14 y 10].

El análisis de proteínas de almacenamiento, ha sido otra de las metodologías empleadas para la identificación y discriminación de cultivares en otras especies, existiendo un antecedente de utilización en el olivo [15].

Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo [16, 17] han permitido identificar en los extractos de endospermo y cotiledón de olivo la presencia de dos precursores proteicos (41.0 kDa y 47.5 kDa, respectivamente) mediante electroforesis unidimensional. Dichos precursores fueron resueltos en sus péptidos individuales integrantes, denominados p1 a p5 (20.5, 21.5, 25.5, 27.5 y 30.0 kDa respectivamente). El péptido p1 purificado se utilizó para desarrollar un suero policlonal de conejo que igualmente identificó a los restantes péptidos p2-p5.

Algunos estudios previos han mostrado que estas proteínas de almacenamiento son generadas como subproductos de la industria del aceite de oliva en forma de distintos compuestos como el alpeorajo [18]. El uso de esta fuente nitrogenada para la complementación de la alimentación del ganado, sobre todo ovino y caprino, podría ser una buena opción para dichos residuos. Dicho uso, alternativo a la utilización frecuente de estos residuos secos para la cogeneración

de energía [19] podría además solventar parte de los problemas de contaminación ambiental que estos subproductos generan.

Se conoce muy poco sobre la composición proteica de la aceituna, y más concretamente de la semilla [16, 20 y 17], donde se acumula la mayor parte del contenido proteico, del total de proteínas del fruto del olivo. Por ello, el conocimiento de las características y composición aminoacídica de estas proteínas de almacenamiento en la semilla, así como en los derivados o subproductos de la industria del aceite de oliva, es de gran importancia para el posterior uso de los mismos [18]. Esta información es necesaria para determinar el aprovechamiento proteico que lleva a cabo el ganado potencialmente alimentado con éstas, mediante la degradación proteica en el rumen [21].

Los objetivos fundamentales de este estudio han consistido, por una parte, en la caracterización de proteínas de almacenamiento en la semilla de olivo (cotiledón y endospermo separadamente), mediante electroforesis 2D. Una de las finalidades del trabajo es desarrollar métodos analíticos de gran resolución para investigar si existe suficiente variabilidad en estas proteínas para que puedan ser consideradas una forma de identificación varietal de olivo. Otro de los objetivos es determinar la composición peptídica de dichas proteínas, para así poder establecer una posible comparación de las cualidades nutritivas de estas proteínas con otras leguminas, tras analizar las secuencias disponibles en distintas bases de datos.

MATERIAL Y METODOS

Material

El material vegetal consistió en semillas maduras de olivo (*Olea europaea L.*), 210 días después de la antesis (DDA), obtenidas de árboles de la variedad Picual, recolectados en la Estación Experimental del Zaidín (Granada). El análisis se realizó separadamente en el cotiledón y el endospermo de estas semillas.

Métodos

Extracción de proteínas

El cotiledón y el endospermo aislados fueron homogeneizados separadamente en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, hasta obtener de este material un polvo fino. Aproximadamente, 0.1g del homogeneizado resultante fue solubilizado en 1 ml de tampón de lisis que consistía en urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS (3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato) 4% (p/v), SDS 3% (p/v), DTT 60 mM, anfolitos (Amersham Biosciences) 0.5% (v/v) (pH 3–10) y azul de bromofenol 0.01% (p/v). Todo ello, fue resuspendido mediante vórtex. Las proteínas fueron posteriormente precipitadas en 5 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) y DTT 0.2% (p/v) en acetona preenfriada a -20°C durante 1 hora. El precipitado fue lavado dos veces en acetona y resuspendido en tampón de lisis, omitiendo el SDS en dicho tampón.

Tras esta serie de pasos, las proteínas fueron alquiladas durante 2 horas con iodoacetamida, a una concentración final de 200 mM. En último lugar, las muestras fueron centrifugadas a 4 °C durante 60 min a 40000 g, con el fin de eliminar partículas insolubles. Las muestras se guardaron en alícuotas a -80 °C hasta su posterior uso.

La concentración de las proteínas de cada extracción se determinó en cada etapa secuencial de extracción mediante el uso de un microensayo Bio-Rad.

Electroforesis bidimensional

Para la separación analítica mediante electroforesis 2D, las muestras de endospermo y cotiledón, que contenían aproximadamente 75 µg de proteína total, fueron diluidas en un volumen final de 315 µl, en tampón de solubilización y subsecuentemente aplicadas en rehidratación en gel y sometidas a un voltaje de 30 V durante 12 horas en una tira de gel de poliacrilamida deshidratada (Immobiline DryStrip, pH 3-10, NL, Amersham-Pharmacia Biotech). Posteriormente las muestras fueron sometidas a isoelectroenfoque a una temperatura constante de 20 °C en un aparato IPGPhor (Amersham-Pharmacia Biotech) en las siguientes etapas: 300 y 1.000 V durante 1 hora, seguido de un incremento lineal desde 1.000 hasta 8.000 voltios, para alcanzar un voltaje total de 85 kVh.

Una vez que el gel estuvo focalizado, éste se puso en la parte superior de un gel vertical de poliacrilamida (12% T, 2.6% C), para separar la segunda dimensión. El gel concentrador fue reemplazado por una capa de agarosa 1% (p/v), Bis-Tris 0.15 M /HCL 0.1M y SDS 0.2% (p/v).

La migración electroforética a lo largo de la segunda dimensión fue llevada a cabo mediante el uso del tampón del sistema Laemmli [22] en un sistema Protean II xi Cell (Bio-Rad) durante 1h a 20 mA/gel, seguido de 4 horas más a 40 mA/gel. La reproducibilidad del perfil proteico en el sistema 2D fue confirmada, en primer lugar llevando a cabo dos experimentos independientes y en segundo lugar mediante el desarrollo de la segunda dimensión por duplicado.

Después de desarrollar la electroforesis, los geles se utilizaron para la inmunodetección o para su fijación y posterior tinción con plata [23].

Las imágenes digitalizadas a 84.7 μm de resolución se obtuvieron usando el escáner Power Look III y el software MagicScan (UMAX Systems GmbH, Germany). La masa molecular experimental de cada mancha fue calibrada mediante el uso de estándares comerciales (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad).

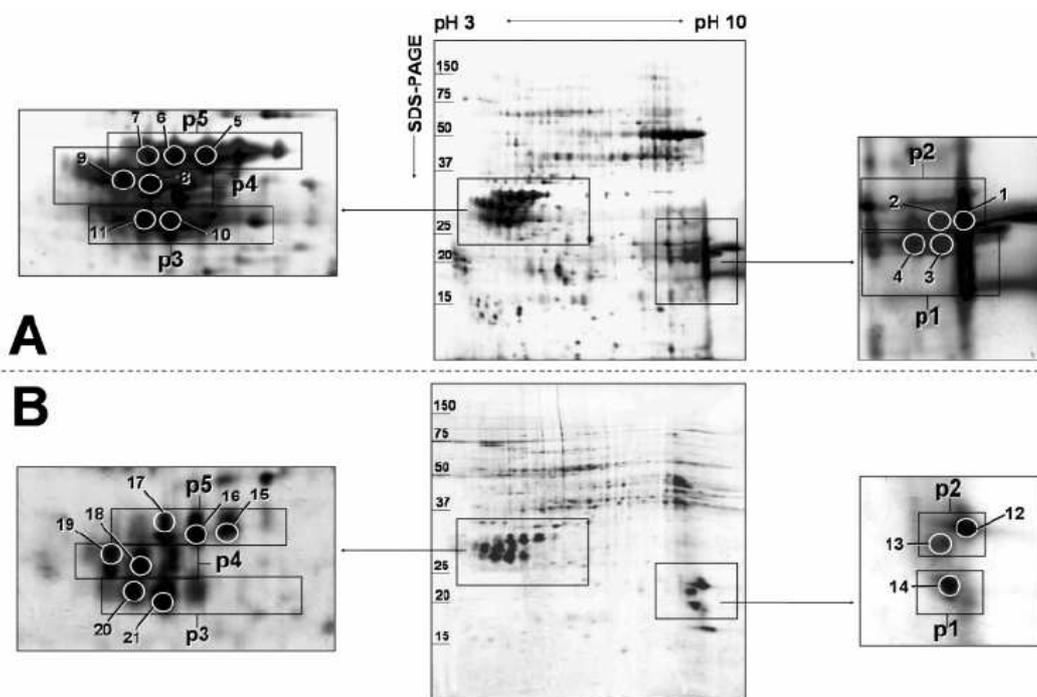
Análisis mediante inmunoblot

El análisis mediante inmunoblot fue llevado a cabo después de la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membranas de fluoruro de polivinilo en un sistema Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, USA). El suero preinmune o el antisuero p1 [17] fueron usados para probar las membranas en una dilución 1:1.000, seguidos de incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa (Promega Co), en una dilución 1:10.000. La detección se realizó mediante el uso de diaminobenzidina como sustrato.

RESULTADOS

Los análisis mediante electroforesis 2D obtenidos de endospermo y cotiledón de olivo se muestran en la Figura 1, donde se detectaron hasta 1.000 y 750 manchas en un mapa 2D de endospermo y cotiledón respectivamente, mediante la tinción con plata.

Figura 1. Mapa 2D de proteínas del endospermo (A) y del cotiledón (B), después de la tinción con plata. Las regiones ampliadas muestran la posible localización de las proteínas p1-p5. Las masas moleculares de los estándares de proteínas se encuentran en la parte izquierda del gel. **Reproducido de Alché et al. (2006) J. Agric. Food Chem., 54: 5562-5570 con permiso de la American Chemistry Society (ACS).**



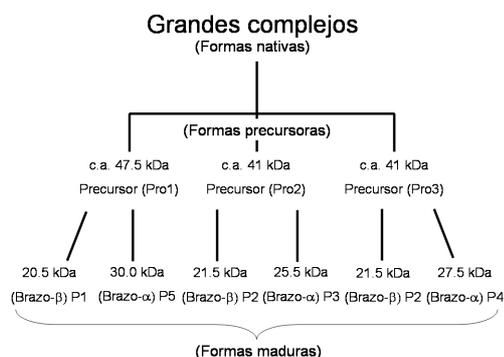
Independientemente de las diferencias en los niveles de expresión de proteínas en ambos tejidos, el estudio se centró en dos grupos de manchas. Uno de los grupos estaba formado por péptidos básicos de alrededor de 20 kDa. El otro grupo consistía en péptidos ácidos de entre 26-30 kDa. Ambos grupos estaban presentes tanto en el endospermo como en el cotiledón, y representaron en torno al 70% del total de proteínas presentes en los extractos. En ambos grupos de péptidos, había numerosas manchas correspondientes a péptidos con similar masa

molecular, pero diferenciándose en la posición del gradiente de pH (figura 1). Este patrón se mostró muy reproducible en diferentes extracciones del mismo grupo de proteínas. Las masas moleculares estimadas mediante espectroscopia de masas (MS), de las manchas seleccionadas de la Figura 1 son las siguientes: (Tabla 1)

Tabla 1. Masas moleculares estimadas para los spot seleccionados de la figura 1A y 1B

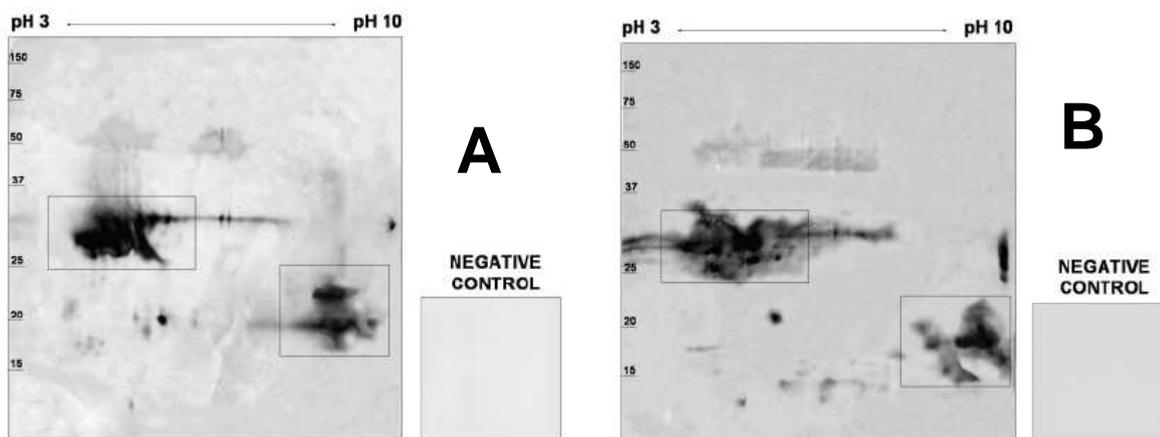
ENDOSPERMO			COTILEDÓN		
	Spot nº	Masas Moleculares estimada (kDa)		Spot nº	Masas Moleculares estimada (kDa)
Básicos	1	21.46	Básicos	12	20.89
	2	21.67		13	20.42
	3	20.04		14	19.95
	4	19.73			
Ácidos	5	28.84	Ácidos	15	25.41
	6	30.90		16	25.41
	7	30.20		17	25.70
	8	28.51		18	24.95
	9	28.84		19	25.12
	10	26.92		20	23.71
	11	27.54		21	23.77

Figura 2. Modelo propuesto para la composición de subunidades de las diferentes proteínas tipo 11S de semillas maduras de olivo. . Modificado de Alché et al. (2006) *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5562-5570 con permiso de la ACS



La comparación de los geles correspondientes a SDS-PAGE teñidos con plata (Figura 1), con los experimentos de inmunoblotting, mostró que el antisuero reconoció al antígeno original (p1), al igual que a p2, p3, p4 y p5, presentes en extractos de semillas maduras (Figura 2). Como se aprecia en dicha figura, el antisuero p1 reconoció también múltiples manchas dentro de los dos principales grupos de proteínas (básicas y ácidas), después del análisis por electroforesis 2D de extractos proteicos de endospermo y cotiledón. El suero preinmune dio una respuesta negativa en ambos casos.

Figura 3. Inmunodetección de proteínas tipo 11S. Blots correspondientes a extractos proteicos de endospermo (A) y cotiledón (B), separados mediante electroforesis 2D y probados con el suero anti-p1. Los controles negativos se llevaron a cabo mediante incubación, en este caso con el suero preinmune. Reproducido de Alché et al. (2006) *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5562-5570 con permiso de la ACS



DISCUSIÓN

El interés en las proteínas de almacenamiento de semillas en distintos cultivos es notable. Al interés que tiene el estudio de la regulación de la expresión génica como materia de investigación básica, se une el alto valor biológico de estas proteínas, ya que éstas representan un parámetro muy importante en la calidad nutricional [24].

Las proteínas de almacenamiento de semillas son las más abundantes en algunas de las plantas que constituyen la base para la alimentación humana. Sin embargo, las correspondientes a las semillas de olivo (una de los principales cultivos en el área mediterránea), no son generalmente destinadas para el consumo humano, ya que en general el fruto del olivo es procesado íntegramente para la producción de aceite. A su vez, dicha

industria oleícola genera una gran cantidad de subproductos, que causan problemas en su almacenamiento, pudiendo constituir una fuente de contaminación para el medio ambiente. Estos residuos son en algunos casos usados para la co-generación de energía, aunque algunos estudios previos ya han sugerido su posible utilización en alimentación ganadera [21]. En dichos estudios se analiza la digestibilidad de estos subproductos por los animales de experimentación, mediante la estimación tanto *in vivo* como *in sacco* de la degradación proteica, demostrándose la composición aminoacídica de estos subproductos [18, 25].

Los resultados mostrados en el presente trabajo, además de caracterizar bioquímicamente la composición peptídica de estas proteínas en la semilla madura, permiten proponer dichos péptidos como posibles marcadores moleculares, sobre la base de la presencia de múltiples isoformas que se muestran en los correspondientes geles. Es fundamental en este sentido, establecer si existe polimorfismo en dicha composición peptídica entre las diferentes variedades. Dichos marcadores podrían ser aplicados al estudio de la diversidad genética, y a la discriminación de variedades de olivo, tanto cultivado como silvestre, facilitando además la estimación en su interrelación genética [26, 27, 28 y 29]. Las estimaciones de la diversidad genética entre cultivares y formas silvestres, proporcionará a su vez, un poco de luz en el posible (s) origen(es) del olivo cultivado [30, 31, 32, 33, 34, 35 y 4].

El conocimiento de la diversidad genética entre los cultivares de olivo existentes, es esencial para el éxito de los programas de cultivo a largo plazo y la maximización de los recursos del germoplasma. El interés de la clasificación de las especies de olivo no sólo está basado en la filogenia del género, sino también en el papel jugado por las especies silvestres como fuente de variabilidad en las generaciones de olivos.

CONCLUSIONES

- 1) Las proteínas mayoritarias tanto en el endospermo como en el cotiledón de la semilla del olivo, son proteínas de almacenamiento de tipo 11S, que representan en torno al 70 % de las proteínas totales.
- 2) La presencia de múltiples manchas a las que se les atribuyen los nombres de p1 a p5, encontradas en la separación electroforética 2D, está de acuerdo con la información descrita anteriormente con el modelo proteínas Legumin-like tipo 11S-12S, en otras especies de plantas.
- 3) Los datos obtenidos, así como el anticuerpo utilizado en este trabajo pueden constituir herramientas esenciales para estudiar la capacidad nutritiva de estas proteínas en la semilla, así como en los subproductos derivados de la industria oleícola que las contienen. Esto nos ayudaría a determinar su posible utilización como base o complemento nutricional.
- 4) Las técnicas desarrolladas aquí permitirían definir una "huella peptídica" característica para cada variedad, que se podría usar en la discriminación de variedades de olivo, así como para analizar la diversidad genética de esta especie.
- 5) El transporte de proteínas de almacenamiento de la vacuola hasta los cuerpos proteicos, así como su movilización durante la germinación, constituye un importante punto a investigar en detalle en el futuro. Mas aún, el aislamiento y caracterización de la secuencia completa de los ADNc para p1-p5, permitirá la comparación de la secuencia aminoacídica deducida de éstas, con los obtenidos de diferentes especies de plantas, permitiendo la clasificación de estas proteínas de almacenamiento de semillas de olivo de acuerdo con su contenido aminoacídico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado gracias a los proyectos AGL2003-00719 y MEC BFU2004-00601/BFI. Los autores agradecen al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la concesión de una beca predoctoral (I3P-CSIC 2002), y a Concepción Martínez Sierra su ayuda técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] UNCTAD, United Nations Conference on Trade and Development <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/olive/market.htm> 2005.
- [2] Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafin F. & Trujillo I. (2000a). *World Catalogue of Olive Varieties*. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.

- [3] Loukas M., Krimbas C.B. (1983) History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Hort Sci* 58:121–127
- [4] Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., di Guisto F. (1993) Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J Hered* 84:34–42
- [5] Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P. (1996) Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica* 91:9–20
- [6] Trujillo, I., Rallo, L. & Arus, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120, 318–324.
- [7] Mekuria G.T., Collins G.G., Sedgley M. (1999) Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J Hort Sci Biotechnol* 74:309–314
- [8] Gemas V.J., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R., Feveiro P. (2000) Interand Intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD techniques. *J Hort Sci Biotechnol* 75:312–319
- [9] Gonzalo-Claros M., Cresillos R., Aguilar M.L., Canovas F.M. (2000) DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116:131–142
- [10] Hess J., Kadereit W., Vargas P. (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol Ecol* 9:857–868
- [11] Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I. (2002) Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor Appl Genet* (online DOI 10.1007/s00122-002-0981-6)
- [12] Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414
- [13] Rallo P., Dorado G., Martin A. (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 101:984–989
- [14] Sefc K.M., Lopes M.S., Mendona D., Rodrigues Dos Santos M., Laimer Da Camara Machado M., Da Camara Machado A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol Ecol* 9:1171–1173
- [15] Durante M., Petrucelli R., Bartolini G. & Bernardi R. (1992). Impiego delle proteine di riserva per l'identificazione delle cultivar di olivo (*Olea europaea* L.). *Atti Convegno "Olive Oil Quality"*, Florence, Italy. 57–60.
- [16] Alche J.D., Jimenez-Lopez J.C., Wei W., Castro-Lopez A.J. & Rodríguez-García M.I. (2006). Biochemical characterization and cellular localization of 11S type storage proteins in olive (*Olea europaea* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5562-5570
- [17] Wang W., Alché J.D., Castro A.J. & Rodríguez-García M.I. (2001). Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *Olea europaea*. *Int J Dev Biol.* 45 (S1): 63-64
- [18] Martín García A.I., Moumen A., Yáñez Ruíz D.R., Molina Alcaide E. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim Feed Scie Techn.* 107: 61-74
- [19] Fernández-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Heredia A., Guillén R. & Jiménez A. (2003). Aplicación de un tratamiento al vapor para aprovechamiento integral del alpeorujo. In: *Simposium Científico-Técnico Expoliva03*
- [20] Ross J.H.E., Sanchez J., Millan F. & Murphy D.J. (1993). Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissue. in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea Americana*). *Plant Sci.* 93: 203-210
- [21] Landau S., Silanikove N., Nitsan Z., Barkai D., Baram H., Provenza F.D. & Perevolotsky A. (2000). Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Appl Anim Behav Sci.* 69: 199-213
- [22] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685.
- [23] Rabilloud, T.; Brodard, V.; Peltre, G.; Righetti, P. G.; Etori, C. (1992). Modified silver-staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 13, 264-266.
- [24] Milisavljević, M.D.J.; Timotijević, G.S.; Radović, S.R.; Brkljacic, J.M.; Konstantinovic, M.M.; Maksimovic, V.R. (2004). Vicilin-like storage globulin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5258-5262.
- [25] Molina Alcaide E., Yáñez Ruíz D.R., Moumen A. & Martín García A.I. (2003). Ruminant degradability and in vitro intestinal digestibility of sunflower meal and in vitro digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal comparison between goats and sheep. *Anim Feed Scie and Techn.* 110: 3-15.
- [26] Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R., Rallo L., Gimenez M.J. (2001) Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc Hort Sci* 126:64–71
- [27] Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. (2002) Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 104:223–228
- [28] Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S. (1995) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J Am Soc Hort Sci* 120:538–542
- [29] Sanz-Cortes F., Badenes M.L., Paz S., Iiguez A, Licer G. (2001) Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J Am Soc Hort Sci* 126:7–12
- [30] Besnard G., Baradat P., Berville A. (2001) Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102:251–258
- [31] Besnard G., Berville A. (2000) Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Life Sci* 323:173–181
- [32] Besnard G., Khadari B., Baradat P., Berville A. (2002a) *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theor Appl Genet* 104:1353–1361
- [33] Besnard G., Khadari B., Baradat P., Berville A. (2002b) Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive
- [34] Bronzini de Caraffa V., Giannettini J., Gambetti, C. And Maury, J. (2002). Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*, 123, 263–271.
- [35] Lumaret R., Amame M., Ouazzani N., Baldoni L., Debain C. (2000) Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild taxa of the genus *Olea* L. *Theor Appl Genet* 101:547–553