

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 404 342**

21 Número de solicitud: 201130568

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.04.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES y
APPLIED MOLECULAR DEVELOPMENT, SA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALCHÉ RAMÍREZ, Juan De Dios;
MAHDI, Fendri y
RODRÍGUEZ GARCÍA, María Isabel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel54 Título: **MÉTODO Y KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DEL ORIGEN DEL POLEN DE OLIVO.**

57 Resumen:

Método y kit para la identificación varietal del origen del polen de olivo.

La presente invención se refiere a un método para la identificación del origen varietal del polen del olivo basado en marcadores Simple Sequences Repeats o Repeticiones de Secuencias Simples (SSRs) así como a un kit que comprende los elementos necesarios, preferiblemente cebadores específicos para la amplificación de los marcadores, para llevar a cabo dicho método.

ES 2 404 342 A1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para la identificación varietal del origen del polen de olivo.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para la identificación del origen
5 varietal del polen del olivo basado en marcadores SSRs así como a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho método.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La identificación varietal de las plantas es uno de los elementos más importantes en la agricultura, ya que la variedad vegetal puede determinar por ejemplo las características agronómicas de una planta. Esto es importante para que el agricultor decida cual es la variedad más interesante para cultivar, bien por las características del terreno donde se va a llevar a cabo la siembra, o
15 bien por la necesidad de un tipo de producto determinado que llevar al mercado.

La determinación varietal, en la actualidad se lleva a cabo mediante la obtención de tejidos diploides del vegetal, y analizando su genoma.

20

La identificación del origen del polen resulta interesante en múltiples campos como por ejemplo el de la aeropalinología, y fundamentalmente en las alergias, ya que las personas alérgicas pueden reaccionar de forma diferente al polen proveniente no solo de diferentes especies vegetales, sino también de distintas
25 variedades dentro de una especie (Bousquet *et al.* 1985, *Clin Allergy.*, 14: 249-258; Castro *et al.* 2003, *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 131:164-173). Diversos estudios han demostrado que la reactividad de sueros procedentes de diferentes pacientes es variable en función del origen varietal del polen al que se expongan. En la actualidad existen muchos métodos de muestreo que
30 permiten captar el polen para por ejemplo determinar la composición del aire (Mandrioli *et al.* 1998, *Methods in Aerobiology.* 47-68). Este polen captado se analiza a nivel de especie y permite la realización de calendarios polínicos que detallan las concentraciones de los taxones de pólenes en una determinada

localidad. La identificación del origen varietal de dichos pólenes se convertiría en una herramienta adicional que permitiría la mejora de los calendarios polínicos además de permitir una mejor determinación del riesgo alérgico.

- 5 Por otro lado, dentro de la medicina también resultaría interesante la determinación del origen varietal del polen, ya que permitiría por ejemplo llevar a cabo la certificación del polen utilizado en la preparación de las vacunas o kits de diagnóstico ya que permiten una mejor identificación del mismo lo que proporcionaría una mayor seguridad y una mayor eficacia para el paciente.

10

Además de en medicina, la identificación del polen sería útil en otras áreas como por ejemplo en los bancos de germoplasma, donde su identificación es relevante a la hora de llevar a cabo la administración del polen con un origen varietal certificado para la mejora de especies (Stephan Mercier 1995, *Grana.*
15 6: 367-370).

20

Otra aplicación interesante de la determinación varietal de un vegetal se da a la hora de llevar a cabo el análisis de la propagación de genes a partir de plantas transgénicas. Los organismos transgénicos se pueden difundir en la naturaleza
20 a través, fundamentalmente, de la polinización cruzada. Esto puede afectar a la biodiversidad además de modificar poblaciones genéticamente compatibles de plantas silvestres presentes alrededor del cultivo (Lefol *et al.* 1996, *Sex Plant*
Reprod. 9: 189-196; Ellstrand *et al.* 1999, *Annu Rev Ecol Syst.*, 30: 539-563).

25

En la actualidad el método para determinar el porcentaje de polinización
25 cruzada ocurrida en plantas transgénicas consiste en la recolección y germinación de semillas. La capacidad de identificar el polen de la progenie permitiría determinar la tasa de flujo de genes entre diferentes especies y/o variedades. El disponer de un método para llevar a cabo la identificación del origen varietal del polen, permitiría determinar el grado de dispersión del polen
30 transgénico tras la recolección de muestras.

30

Cabe destacar también que los métodos actualmente disponibles para caracterizar el origen varietal de diversas especies sólo se aplican actualmente

a material diploide Gökirmak et al. 2009, *Genet Resour Crop Evol.*, 56:147–172, por lo que no se está realizando el análisis del polen utilizado comercialmente, por ejemplo, para la polinización artificial de especies. Debido a la autoincompatibilidad existente entre algunas variedades vegetales, por ejemplo del olivo, se hace necesaria una variedad polinizadora. Esto hace que exista por tanto, una necesidad tanto por parte de las empresas suministradoras como por parte de los agricultores de conseguir un método que permita la certificación del origen varietal para que el agricultor pueda determinar cual es el más acorde con sus necesidades.

10

La determinación del origen vegetal del polen se ha encontrado con diversas dificultades como por ejemplo la dotación genética haploide del polen que no permite disponer de toda la información genética de la planta madre, o como la necesidad de un método diferente para el análisis del polen en función de la especie vegetal de la que se trate, ya que el polen presenta diferencias importantes a nivel morfológico, estructural y genético que hacen que cada método haya de ser adaptado en función de la especie que se quiera analizar.

15

Por todo lo descrito anteriormente, se hace necesaria la búsqueda de un sistema que permita la rápida identificación del polen, ya que esto permitiría superar muchas de las barreras existentes en la actualidad para la determinación de la variedad vegetal únicamente mediante el uso de tejidos diploides. Este método presentaría multitud de aplicaciones de utilidad tanto en aspectos agronómicos como médicos.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la identificación del origen varietal del polen de olivo mediante el uso de marcadores SSRs (*Simple Sequences Repeats* o repeticiones de secuencias simples), así como a un kit que comprende los medios necesarios, preferiblemente cebadores específicos para los SSRs, para llevar a cabo dicho método.

25

30

En la presente invención se demuestra, mediante el uso de muestras ciegas que el método de la invención permite la identificación de la variedad vegetal de la que proceden diversos pólenes de olivo. Esta identificación se realiza mediante la amplificación de marcadores SSRs. Estos marcadores presentan un elevado polimorfismo inter e intraespecífico. Además su segregación es codominante por lo que la contribución de ambos alelos es detectable en las muestras. Estas características contribuyen a que estos marcadores presenten una serie de ventajas frente a otros marcadores utilizados previamente como son una alta reproducibilidad, una elevada facilidad de detección, o un gran poder discriminativo. Además, presentan como ventaja adicional la segregación independiente, lo que los convierte en unos marcadores ideales para la determinación del origen varietal del olivo.

El método descrito en la presente invención presenta además como particularidad que es llevado a cabo a partir de muestras de polen de olivo. Esto supone una mejora frente a lo previamente descrito, ya que los granos de polen presentan una dotación genética haploide, lo que hace que presenten una información genética incompleta de la planta madre. Sin embargo, en una población de polen, todas las posibilidades de segregación están representadas, y por tanto una población suficiente de polen comprendería la información genética completa de la planta madre. El polen no ha sido usado con anterioridad fundamentalmente debido a la relativa complejidad de la extracción de su material genético frente a otros tejidos, a la baja cantidad obtenible a partir de polen con respecto por ejemplo a hojas, y a la necesidad de una población suficiente para disponer de la dotación genética completa de la planta madre.

El uso de polen para la identificación presenta como ventaja adicional, además, la no necesidad de dañar el vegetal para obtener tejido para la identificación varietal, ya que este polen se desprende naturalmente de la planta.

Cabe indicar que los métodos a llevar a cabo en granos de polen, han de ser adecuados a cada una de las especies en que se realicen debido

fundamentalmente a las diferencias tanto morfológicas como bioquímicas del polen perteneciente a diferentes especies. Estas diferencias son tanto más acusadas cuanto más alejadas evolutivamente se encuentran las especies.

- 5 La identificación varietal del polen de olivo, debido a la importancia de este elemento en la agricultura, a nivel ambiental o en medicina presenta multitud de aplicaciones como por ejemplo la certificación previa a la venta del polen para la fecundación de plantas o de la inclusión en kits de diagnóstico o de vacunas.
- 10 Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de identificación del origen varietal del polen de olivo (de ahora en adelante método de la invención) que comprende:
- a) Obtener una muestra de polen de olivo,
 - b) extraer el DNA de la muestra obtenida en (a),
 - 15 c) amplificar marcadores SSRs en el DNA obtenido en (b),
 - d) analizar el perfil alélico de los SSRs amplificados en (c) para obtener el genotipo,
 - e) comparar el genotipo del paso (d) con genotipos de variedades vegetales conocidas, y
 - 20 f) determinar la variedad vegetal en base a la comparación de (e).

Se entienden por "marcadores SSRs" en la presente invención repeticiones de 1 a 6 pares de bases de DNA, presentes en el genoma de la planta, en las que el número de repeticiones es variable entre diferentes alelos lo que permite la

25 discriminación de diferentes variedades. Los marcadores SSRs se encuentran situados en regiones no codificantes por lo que no son transcritos en RNA. Por ello el material genético a extraer en el método de la invención es DNA.

Para que se pueda identificar el origen varietal del polen de olivo, se ha de

30 disponer de una población suficiente de polen para que sea representativa del genoma parental, es decir, ha de incluir todas las posibilidades de segregación del genotipo parental. Además, es necesario que de esta población se extraiga suficiente cantidad de material genético para poder llevar a cabo la

amplificación de todos los marcadores necesarios para la identificación. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 50 ng. En una realización más preferida del método de la invención la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 200 ng.

Para llevar a cabo la correcta identificación del origen varietal del polen, es necesario disponer de varios marcadores, ya que un único marcador no sería suficientemente discriminatorio debido a las elevadas posibilidades parentales y no llevarían a una correcta identificación. Por el contrario, el uso de un alto número de marcadores supondría un gasto innecesario de recursos ya que no llevaría a una determinación mejor del origen varietal. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 3. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son al menos 6. En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son al menos 10. En una realización particular de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son 10.

En los ejemplos de la presente invención los SSRs usados y que resultan útiles para la discriminación del origen varietal del polen de olivo son *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43*. Estos marcadores permiten una perfecta discriminación del origen varietal del polen del olivo, sin la adición de datos duplicados o superfluos que no aportan información para la identificación. Cabe indicar que los SSRs desarrollados para una especie en particular podrían ser utilizados en especies estrechamente relacionadas, pero el porcentaje de loci que se amplifican decrece significativamente cuando aumenta la distancia genética. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención los marcadores amplificados en el paso (c) se seleccionan de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*,

ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPIU71B, GAPIU59, GAPIU101, GAPIU103A, UDO99-24 y UDO99-43. En una realización más preferida del método de la invención los marcadores amplificados en el paso (c) son ssrOeUA-DCA3; ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPIU71B, GAPIU59, GAPIU101, GAPIU103A, UDO99-24 y UDO99-43.

Para llevar a cabo la amplificación de los marcadores se utilizan cebadores específicos para cada uno de los marcadores SSRs. Los cebadores se pueden encontrar unidos a fluoróforos como por ejemplo aunque sin limitarse a FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína), NED (2'-cloro-5'-fluoro-7',8' fenil-1.4-dicloro-6-carboxifluoresceína) para facilitar la posterior detección de los elementos amplificados. La tabla 1 refleja los marcadores de la invención así como los cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación de dichos marcadores para su posterior detección mediante fluoróforos unidos a los cebadores utilizados.

Tabla 1. Características de los cebadores de los 10 microsatélites SSR utilizados y secuencias amplificadas.

Marcador SSR	Secuencia amplificada	Secuencia del cebador Sentido (marcado con sonda fluorescente)	Secuencia del cebador Antisentido	*T ^a (°C)
ssrOeUA-DCA3	SEQ ID NO:1	FAM - SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	52
ssrOeUA-DCA9	SEQ ID NO:2	FAM - SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	51
ssrOeUA-DCA16	SEQ ID NO:3	FAM - SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	50
ssrOeUA-DCA18	SEQ ID NO:4	HEX - SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	50
GAPIU59	SEQ ID NO:5	NED - SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	50
GAPIU71B	SEQ ID NO:6	HEX - SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	50
GAPIU101	SEQ ID NO:7	NED - SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	51
GAPIU103A	SEQ ID NO:8	NED - SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	50
UDO99-024	SEQ ID NO:9	HEX - SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28	52
UDO99-043	SEQ ID NO:10	FAM - SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	50

*T^a se refiere a la temperatura de hibridación.

FAM, HEX y NED se refieren a los fluoróforos unidos a los cebadores para su detección.

Los cebadores de la tabla son utilizados en parejas que permiten la amplificación de cada uno de los marcadores SSR para los que se han diseñado cada uno de ellos. Las parejas son las formadas por los cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. Las secuencias complementarias de cada una de las parejas también serían útiles para la amplificación de la secuencia, y por tanto podrían utilizarse de forma análoga a las parejas descritas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para llevar a cabo el método de la invención (de ahora en adelante kit de la invención). En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende los cebadores específicos para la amplificación de al menos 3 marcadores seleccionados de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*. En una realización más preferida de este aspecto de la invención el kit de diagnóstico comprende los cebadores específicos para la amplificación de al menos 6 marcadores seleccionados de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*. En una realización aun más preferida el kit comprende los cebadores específicos para la amplificación de los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.

En otra realización preferida, el kit comprende al menos 3 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID

NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. En una realización más preferida, el kit comprende al menos 6 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. En una realización aun más preferida el kit comprende las parejas de cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

En la presente descripción, el termino "específicos" implica que los cebadores comprenden una secuencia nucleotídica parcial o totalmente complementaria a las secuencias adyacentes a los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43* empleados por el método de la presente invención, permitiendo su unión específica a dichas secuencias adyacentes y sirviendo de base para la amplificación de la región de ADN comprendida entre los cebadores.

Dicho kit puede comprender además de cebadores todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, sondas, tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la identificación del origen varietal de polen de olivo por la técnica que se ha descrito

anteriormente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
5 componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos
15 ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

20

EJEMPLO 1. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS CIEGAS DE POLEN USANDO MARCADORES SSRs.

25 La identificación de las variedades de olivo se ha basado tradicionalmente en esquemas pomológicos empleando caracteres morfológicos y agronómicos. En la actualidad existen marcadores moleculares que han sido identificados y desarrollados con el fin de identificar las variedades vegetales. Entre estos marcadores destacan los SSRs (Simple Sequence Repeat) que son
30 generalmente motivos de di, tri o tetra-nucleótidos repetidos en tándem a lo largo del DNA. Dichos marcadores han sido exitosamente utilizados en la discriminación varietal en un número considerable de colecciones y bancos de germoplasma de olivo en el mundo a partir de tejidos diploides de los que se

obtiene la dotación genética completa del vegetal. Los microsatélites se consideran unos de los marcadores de DNA más potentes ya que son muy polimórficos, multi-alélicos, codominantes y relativamente reproducibles entre laboratorios. El análisis de los SSRs requiere la extracción de DNA genómico
5 procedente de los tejidos vegetales de distintas partes del árbol (generalmente hojas). El presente análisis se ha realizado con el objetivo de identificar 8 muestras ciegas de polen suministradas por una empresa especializada en la fabricación de vacunas y kit de diagnóstico contra la alergia respiratoria estacional (hipersensibilidad tipo 1). La utilización de material vegetal bien
10 identificado es de capital importancia para una mejor eficiencia y trazabilidad de las vacunas o los kit de diagnóstico.

Las 8 muestras ciegas de polen de olivo supuestamente con distintos orígenes varietales han sido aportadas sin precisar la variedad que representa cada una,
15 ni la procedencia geográfica de las muestras. Solo se han proporcionado códigos de 1 a 8. La metodología consiste en llevar a cabo una extracción de DNA a partir del polen usando el kit Nucleo Spin@Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) partiendo de 30 mg de polen. Se realizó una etapa de pre-lisis añadiendo 80 µl de tampón T1 y 8 µl de proteinasa K al polen e incubando
20 12 h a 56°C. Posteriormente se añadieron 80 µl de tampón B3 a la muestra, que se incubó 5 min a 70 °C. Después de añadir a la solución 80 µl de Etanol 100%, se realizó una centrifugación durante 1 min a 11.000 g en una columna del Kit y luego se realizaron dos lavados con 50 µl del Buffer B5 a 11.000 g de
25 1 y 2 min respectivamente. Finalmente el DNA fue resuspendido en 20 µl de tampón BE tras una centrifugación a 11.000 g durante 1 min. La amplificación de los microsatélites, se realizó mediante PCR en un volumen total de 20µl que incluía: DNA genómico, 1X tampón de PCR, MgCl₂, dNTPs y cada uno de los cebadores sentido y antisentido para cada SSRs marcados con distintos fluorocromos (FAM, HEX y NED) (Tabla 1). La Taq Polimerasa se añadió
30 después de la etapa de la desnaturalización inicial. La PCR se realizó en un termociclador TGradient Thermoblock (Biometra) utilizando las temperaturas de hibridación descritas en la Tabla 1.

Los fragmentos amplificados fueron analizados en un secuenciador, y los perfiles alélicos de las muestras analizadas se compararon con los perfiles de 190 accesiones procedentes de distintas colecciones de germoplasma de distintos países incluidas en la base de datos del grupo de la reproducción sexual de plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Los SSRs analizados para la correcta identificación varietal de los granos de polen son los indicados en la tabla 1: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43*.

La amplificación se ha realizado exitosamente en todos los marcadores SSRs analizados aunque en algunos de ellos ha sido imposible obtener amplificación en algunos loci. En dichas muestras, la identificación se ha basado en el resto de los loci.

Todos los microsatélites utilizados han sido polimórficos presentando un promedio de 4,8 alelos por locus. Se han detectado un total de 48 alelos en los 8 individuos analizados. El contenido en información polimórfica (PIC) presentó una media de 0,62 para todo el conjunto de los 10 marcadores. El PIC es un coeficiente indicativo del nivel de información aportado por el marcador que se calcula basándose en la heterocigosidad esperada y también en las frecuencias alélicas. Estos datos demuestran el alto poder discriminativo de los marcadores utilizados. Los valores de la probabilidad de identidad (PI) indican que 4 de los marcadores han sido los más discriminativos con una probabilidad de identidad acumulada de $5,8 \times 10^{-4}$. El PI representa la probabilidad de que un genotipo determinado sea idéntico al de otros dos individuos elegidos al azar, por lo que cuanto menor sea este coeficiente (más próximo a cero), mayor es la probabilidad de que todos los genotipos sean diferentes entre sí. El PI máximo sería teóricamente 1 y en este caso teórico todos los genotipos serían idénticos. Como la probabilidad calculada para este ejemplo es muy cercana a cero, podemos deducir que el conjunto de marcadores utilizado es altamente discriminativo.

En la tabla 2, se detallan los perfiles alélicos obtenidos para las muestras ciegas analizadas. Se han identificado 7 perfiles alélicos distintos representando 7 genotipos previamente identificados mediante los mismos marcadores y cuyos perfiles existen en la base de datos del grupo de la reproducción sexual de plantas del departamento de Bioquímica, Biología molecular y celular de plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Tabla 2. Identificación de los perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen.

DENOMINACIÓN ACCESIÓN COLECCIÓN	Código del genotipo en la base de datos	Alelos identificados																			
		166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	-	172	216	210	220	184	184	132	132	
Ciega 1	1P	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	-	172	216	210	220	184	184	132	132	
Loaime	Lo22	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	191	217	172	216	220	184	184	132	170	
Ciega 2	2P	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	220	184	184	132	170	
Pical (Genotipo 2)	11	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	220	184	184	132	170	
Ciega 3	3P	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	184	184	132	170	
Ciega 5*	5P	168-166	176	235	245	152	152	117-121	127-141	193-173	204-211	191-197	217	172-207	216	220	164	184	132	147	
Manzanilla de Jaén	Mn23	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	184	184	-	-	
Ciega 4 *	4P	-	-	-	-	122	152	117-121	127-141	183-161	193-204	-	-	207-172	212-216	220	164	184	132	170	
Pical (Genotipo 1)	S7P	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	220	184	184	132	170	
Ciega 6	6P	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	199	199	147	158	
Arbequina	S1P	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	199	199	147	158	
Ciega 7	7P	168	172	235	249	152	152	-	-	183	193	191	199	207	216	220	184	184	-	-	
Lucio	U4	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	216	220	184	184	184	220	
Ciega 8	8P	168	172	235	249	152	152	117	121	183	193	191	199	207	216	220	184	184	184	220	
Lucio	U4	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	216	220	184	184	184	220	

*Las muestras ciegas 4 y 5 contienen polen de más de una variedad. Existe posibilidad de contaminación ocurrida durante la recolección, purificación y/o manejo de las muestras.
 La muestra 4 presentó 4 alelos en lugar de 2 en 3 loci. Dicha muestra presentó dificultad en la amplificación de los SSRs lo que también indica que puede existir una contaminación de la muestra o que está formada por pólenes de más de una variedad..
 La muestra 5 presentó 3 alelos en lugar de 2 en 4 loci y 4 alelos en lugar de 2 en el otro locus. No se ha observado en la literatura que los microsátélites mencionados puedan presentar más de dos alelos, lo que refuerza la hipótesis de contaminación.

La tabla 3 indica el resultado final de la identificación del origen varietal de las muestras ciegas de polen suministradas.

5 Tabla 3. Identificación del origen varietal de las muestras ciegas de polen.

MUESTRAS CIEGAS	VARIEDAD SEGÚN LA BASE DE DATOS DE LA EEZ-CSIC	PRODECENCIA	DIFUSIÓN DE LA VARIEDAD
Muestra ciega 1	Loaime	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada
Muestra ciega 2	Picual	EEZ-CSIC. Granada	Variedad principal – Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 3	Manzanilla de Jaén	Colección de Sierra Nevada	Variedad difundida – provincia de Jaén y Córdoba
Muestra ciega 4*	Picual estándar	Colección de Jaén	Variedad principal – Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 5*	Manzanilla de Jaén	Colección de Sierra Nevada	Variedad difundida – Provincia de Jaén y Córdoba
Muestra ciega 6	Arbequina	EEZ CSIC. Granada	Variedad principal – Cataluña, Aragón y Andalucía.
Muestra ciega 7	Lucio	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada
Muestra ciega 8	Lucio	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada

* Estas muestras incluyen más de una variedad. La tabla indica una posible identificación de la variedad mayoritaria o más probable en cada una de ellas.

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende:
 - 5 a) Obtener una muestra de polen de olivo,
 - b) extraer el DNA de la muestra obtenida en (a),
 - c) amplificar marcadores SSRs en el DNA obtenido en (b),
 - d) analizar el perfil alélico de los SSRs amplificados en (c) para obtener el genotipo,
 - 10 e) comparar el genotipo del paso (d) con genotipos de variedades vegetales conocidas, y
 - f) determinar la variedad vegetal en base a la comparación de (e).

- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 50 ng.

3. Método según la reivindicación 2 donde la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 200 ng.

- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 3.

5. Método según la reivindicación 4 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 6.

- 25 6. Método según la reivindicación 5 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 10.

7. Método según la reivindicación 6 donde los marcadores SSRs amplificados son 10.

- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) se seleccionan de la lista

que comprende *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.

- 5 9. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 10. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para al menos 3 de los marcadores de la lista que comprende *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 15 11. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 10 que comprende cebadores específicos para al menos 6 de los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 20 12. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 11 que comprende cebadores específicos para los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 25 13. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que comprende al menos 3 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24,
- 30

SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

5 14. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 13 que comprende al menos 6 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

15 15. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 14 que comprende las parejas de cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

ES 2 404 342 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<120> Método y kit para la identificación varietal del origen del polen del olivo
<130> ES1641.747
<160> 30
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 1
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagaga 38

<210> 2
<211> 46
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 2
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaga 46

<210> 3
<211> 84
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 3
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga 60
gagagagaga gagagagaga gaga 84

<210> 4
<211> 54
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 4
cacacacact cacacagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaga 54

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 5
ctctctctct ctctctct 18

<210> 6
<211> 38
<212> DNA
<213> Olea europaea
<400> 6
gaagagagag agagaagaag aagaagaaga agaagaag 38

ES 2 404 342 A1

<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Olea europaea	
<400> 7	
gagagagaga gagagaggga gagag	25
<210> 8	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Olea europaea	
<400> 8	
tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tc	52
<210> 9	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Olea europaea	
<400> 9	
cacacacaca cacacacaca catatacaca caca	34
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Olea europaea	
<400> 10	
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgt	24
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador Sentido ssrOeUA-DCA3	
<400> 11	
cccaagcggg ggtgtatatt gttac	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador Antisentido ssrOeUA-DCA3	
<400> 12	
tgcttttgtc gtgtttgaga tgttg	25
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Cebador Sentido ssrOeUA-DCA9	

<400> 13
aatcaagtct tccttctcat ttcg 24

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Antisentido ssrOeAU-DCA9

<400> 14
gatccttcca aaagtataac ctctc 25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Sentido ssrOeUA-DCA16

<400> 15
ttaggtggga ttctgtagat gggtg 25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Antisentido ssrOeUA-DCA16

<400> 16
ttttaggtga gttcatagaa ttagc 25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Sentido ssrOeUA-DCA18

<400> 17
aagaaagaaa aaggcagaat taagc 25

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Antisentido ssrOeUA-DCA18

<400> 18
gttttcgtct ctctacataa gtgac 25

<210> 19
<211> 20
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido GAPIU59
 <400> 19
 ccctgctttg gtcttgctaa 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido GAPIU59
 <400> 20
 caaagtgca ctttctctcg 20

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido GAPIU71B
 <400> 21
 gatcaaagga agaaggggat aaa 23

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido GAPIU71B
 <400> 22
 acaacaaatc cgtacgcttg 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido GAPIU101
 <400> 23
 catgaaagga gggggacata 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido GAPIU101
 <400> 24
 ggcacttggt gtgcagattg 20

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido GAPU103A
 <400> 25
 tgaatttaac tttaaaccca caca 24

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido GAPU103A
 <400> 26
 gcatcgctcg atttttatcc 20

<210> 27
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido UDO99-024
 <400> 27
 ggatttatta aaagcaaac atacaaa 27

<210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido UDO99-024
 <400> 28
 caataacaaa tgagcatgat aagaca 26

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sentido UDO99-043
 <400> 29
 tcggctttac aaccatttc 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Antisentido UDO99-043

<400> 30
tgccaattat ggggctaact

20



- ②① N.º solicitud: 201130568
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.04.2011
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MATSUKI Y et al. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. <i>Molecular Ecology Notes</i> . 2007. VOL: 7 No: 2 Págs: 194-198 ISSN 1471-8278.	1-15
A	POLJUHA et al. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. <i>SCIENTIA HORTICULTURAE</i> , ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, 2008.VOL: 115 No: 3 Págs: 223-230 ISSN 0304-4238 Doi: doi:10.1016/j.scienta.2007.08.018.	1-15
A	FENDRI MAHDI et al. Simple Sequence Repeat Identification and Endocarp Characterization of Olive Tree Accessions in a Tunisian Germplasm Collection. <i>HortScience</i> , 2010, VOL: 45 No: 10 Págs: 1429-1436 ISSN 0018-5345.	1-15
A	MUZZALUPO I et al. Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers. <i>Advances in Horticultural Science</i> , 2008, VOL: 22 No: 2 Págs: 142-148 ISSN 0394-6169.	1-15
A	BANDELJ DUNJA et al. Microsatellites as a powerful tool for identification of olive (<i>Olea Europaea</i> L.) planting material in nurseries. <i>Annales Series Historia Naturalis</i> , 2007 VOL: 17 No: 1 Págs: 133-138 ISSN 1408-533X.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.05.2013

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MATSUKI Y et al. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. <i>Molecular Ecology Notes</i> VOL: 7 No: 2 Págs: 194-198 ISSN 1471-8278.	2007
D02	POLJUHA et al. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. <i>SCIENTIA HORTICULTURAE</i> , 20071024 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, VOL: 115 No: 3 Págs: 223-230 ISSN 0304-4238 Doi: doi:10.1016/j.scienta.2007.08.018.	2008
D03	FENDRI MAHDI et al. Simple Sequence Repeat Identification and Endocarp Characterization of Olive Tree Accessions in a Tunisian Germplasm Collection. <i>Hortscience</i> , 2010, VOL: 45 No: 10 Págs: 1429-1436 ISSN 0018-5345.	2010
D04	MUZZALUPO I et al. Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers. <i>Advances in Horticultural Science</i> , VOL: 22 No: 2 Págs: 142-148 ISSN 0394-6169.	2008
D05	BANDELJ DUNJA et al. Microsatellites as a powerful tool for identification of olive (<i>Olea Europaea</i> L.) planting material in nurseries. <i>Annales Series Historia Naturalis</i> . VOL: 17 No: 1 Págs: 133-138 ISSN 1408-533X.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986)

En las reivindicaciones 1-8 de la solicitud de patente se reivindica un método de identificación del origen varietal del polen del olivo, que comprende una serie de etapas: obtener una muestra de polen, extraer el DNA de la muestra, amplificarlo con microsatélites y analizar los resultados. En las reivindicaciones 9-15 se reivindica un kit de identificación varietal para llevar a cabo el método anteriormente mencionado.

En el documento D01 se divulga un estudio con microsatélites empleando un grano de polen.

Los documentos D02, D03, D04 y D05 reflejan diferentes ensayos realizados en variedades de olivo, que emplean microsatélites. En ninguno de estos documentos citados se realizan los ensayos partiendo de material haploide, como en el caso del objeto de la invención, que emplea una muestra de polen.

Por tanto, las reivindicaciones 1-15 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.