FACULTADE DE CIENCIAS

MÁSTER en INNOVACIÓN en NUTRICIÓN, SEGURIDADE e TECNOLOXÍA ALIMENTARIAS

D/D.ª. Lidia Barreira González

Desenvolvemento dun método rápido para asegurar a identidade varietal en aceites de oliva.

Traballo Fin de Máster

Xaneiro 2025

Índice

1. Resumo 3
2. Introdución 6
2.1 Lexislación. 6
2.2 Problemática e fraude alimentario. 8
2.3 Identificación varietal. 9
2.4 Variedades empregadas. 11
3. Obxectivos 12
4. Materiais e Métodos 13
4.1 Obtención de mostras. 13
4.2 Extracción e cuantificación de ADN total. 13
4.3 Identificación morfolóxica. 15
4.4 Identificación das rexións xenéticas a estudar 16
4.5 Amplificación mediante PCR e secuenciación. 17
4.6 Análise bioinformático 18
4.7 Ensaio de xenotipado mediante qPCR TaqMan. 23
5. Resultados e discusión 26
5.2 Extracción e cuantificación de ADN total. 26
5.2 Identificación morfolóxica. 27
5.3 Identificación das rexións xenéticas a estudar 28
5.4 Amplificación mediante PCR e secuenciación. 28
5.6 Ensaio de xenotipado mediante qPCR TaqMan. 35
6. Conclusións 45
7. Bibliografía 47
8. Anexo 49

1. Resumo

O aceite de oliva é un dos produtos cun maior risco de adulteración tanto polos seus elevados beneficios para a saúde e elevada calidade, como polo grande impacto socio-económico e alto prezo de mercado. O fraude alimentario pode deberse tanto á mestura con aceites vexetais máis baratos como á falsificación do orixe, cultivar ou categoría. Para previlo, é moi importante poder realizar análises rápidos, sensibles e in-situ en diferentes puntos da cadea de suministro, asegurando a súa trazabilidade e autenticidade para protexer aos consumidores e apoiar aos produtores(1).

O obxectivo do presente traballo é desenvolver un método baseado en ADN para detectar variedades de olivo, e integrar este método nun dispositivo miniaturizado que poda ser aplicado en diferentes puntos da cadea de valor, dende granxas ata empresas alimentarias. A detección baséase no xenotipado de SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms)(2).

Para o desenvolvemento do método, empregáronse oito mostras de olivas e follas procedentes de Chipre e Turquía. Antes de comenzar, caracterizáronse morfolóxicamente atentendo a caracteres do endocarpo, determinando a identidade e autenticidade varietal. Unha vez identificadas, o ADN de todas as mostras foi extraído para amplificar rexións dos xenes *Cicloartenol sintase* (OEX) e *Lupeol sintase* (OEW) mediante end-point PCR, e os amplicóns visualizáronse mediante electroforese en xel. Finalmente, estes secuenciáronse (Sanger Sequencing by Macrogen) para a súa análise bioinformática (3,4).

Mediante a análise bioinformática empregando Geneious Prime Software, primeiro correxíronse as secuencias individuais para posteriormente alinear todas as variedades de cada xen (con secuencias baixadas de referencia depositadas na base de datos GenBank), e atopar marcadores específicos (SNPs) que permitan a identificación das variedades en matrices complexas(4,5). Con estes marcadores diseñáronse sondas para realizar ensaios de xenotipado TaqMan® que permitan discriminar dous alelos cunha soa diferenza nucleotídica. Esta discriminación baséase na hibridación específica das sondas, para o que se empregan dous colorantes diferentes, VIC e FAM. Deste xeito, poden amplificarse e detectarse alelos específicos no ADN xenómico (ADNg) mediante unha qPCR.

Palabras chave**:** análise de DNA, microfluídica, trazabilidade, autenticidade, aceite de oliva.

Título, resumen y palabras clave:

Desarrollo de un método rápido para asegurar la identidad varietal en aceites de oliva.

El aceite de oliva es uno de los productos con mayor riesgo de adulteración tanto por sus elevados beneficios para la salud y su alta calidad, como por el gran impacto socioeconómico y alto precio de mercado. El fraude alimentario puede deberse tanto a la mezcla con aceites vegetales más baratos como a la falsificación del origen, cultivar o categoría. Para prevenirlo, es muy importante poder realizar análisis rápidos, sensibles y en-situ en diferentes puntos de la cadena de suministro que aseguren su trazabilidad y autenticidad para proteger a los consumidores y apoyar a los productores(1).

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método basado en ADN mediante genotipado de SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms) para detectar variedades de olivo. Luego, se busca integrar este método en un dispositivo miniaturizado que pueda aplicarse en diferentes puntos de la cadena de valor, desde granjas hasta empresas alimentarias.

Para el desarrollo del método se utilizaron ocho muestras de aceitunas y hojas procedentes de Chipre y Turquía. Antes de comenzar, se caracterizaron morfológicamente atendiendo a caracteres del endocarpo, determinando la identidad y autenticidad varietal. Una vez identificadas, se extrajo el ADN de todas las muestras para amplificar ciertas regiones de los genes *Cicloartenol sintasa* (OEX) y *Lupeol sintasa* (OEW) mediante PCR de punto final, y los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en gel. Finalmente, se secuenciaron (Secuenciación Sanger por Macrogen) para su análisis bioinformático.

Con el análisis bioinformático, usando Geneious Prime Software, se corrigieron las secuencias individuales y para luego alinearlas junto con secuencias descargadas de GenBank para cada gen, y así encontrar marcadores específicos (SNPs) que permitan la identificación en matrices complejas. Con estos marcadores, se diseñaron sondas para realizar ensayos de genotipado TaqMan® y así discriminar dos alelos con una sola diferencia nucleotídica. La discriminación se basa en la hibridación específica de las sondas marcadas con dos colorantes diferentes: VIC y FAM. Así se consigue amplificar y detectar específicos en el ADN genómico (ADNg) mediante qPCR.

Palabras clave: análisis de ADN, microfluídica, trazabilidad, autenticidad, aceite de oliva.

Title, summary and keywords:

Development of a rapid method to ensure varietal identity in olive oils.

Olive oil is one of the products with highest risk of adulteration, both for its high health benefits and high quality, as well as for its great socioeconomic impact and elevated market price. Food fraud can occur by blending it with cheaper vegetable oils and, but also by falsifying the origin, cultivar or category. To prevent it, it is very important to be able to perform rapid, sensitive and on-site analyses at different points of the supply chain to ensure traceability and authenticity to protect consumers and support producers (1).

The objective of the present study is to develop a DNA-based method by SNPs genotyping (Single Nucleotide Polymorphisms) to detect olive varieties. Then, the aim is to integrate this method in a miniaturized device that can be applied in different points of the value chain, from farms to food companies.

Eight samples of olives and leaves from Cyprus and Turkey were used to develop the method. Before starting, they were morphologically characterised according to endocarp traits, determining varietal identity and authenticity. Once identified, DNA was extracted from all samples to amplify certain regions of the *Cycloartenol synthase* (OEX) and *Lupeol synthase* (OEW) genes by end-point PCR, and the amplicons were visualised by gel electrophoresis. Finally, they were sequenced (Sanger sequencing by Macrogen) for bioinformatics analysis.

With the bioinformatics analysis, using Geneious Prime Software, the individual sequences were corrected and then aligned with sequences downloaded from GenBank for each gene, to find specific markers (SNPs) that allow identification in complex matrices. With these markers, probes were designed to perform TaqMan® genotyping assays to discriminate two alleles with a single nucleotide difference. The discrimination is based on the specific hybridisation of the probes labelled with two different dyes: VIC and FAM. Thus, specific amplification and detection of genomic DNA (gDNA) is achieved by qPCR.

Keywords: DNA analysis, microfluidics, traceability, authenticity, olive oil.

2. Introdución

O cultivo do olivo ten a súa orixe no período Neolítico e provén da Asia Menor e Oriente Próximo. Posteriormente o mar mediterráneo permitiu a súa expansión hacia Occidente. En España foron os fenicios os encargados de introducir o seu cultivo. O sector oleícola é un dos mais importantes no sistema agroalimentario español, pola súa importancia económica, social, ambiental e sanitaria (6).

Olea europaea L. representa o principal cultivo produtor de aceite (5). Trátase dun cultivo que se pode autopolinizar e produce descendencia cunha elevada diversidade xenética. Isto permitiu que, dende os comezos da súa domesticación, se escolleran os cultivos con mellores características para a propagación vexetativa, derivando nos cultivares que actualmente son empregados para a produción de aceite. Dita domesticación tamén conlevou grandes problemas para o manexo e a preservación do xermoplasma (5).

O aceite de oliva, tanto polos seus beneficios para a saúde como polo seu gran valor nutricional, ten un elevado impacto socioeconómico. Dentro das súas variedades, o aceite de oliva virxe extra destaca pola súa elevada calidade e alto prezo de mercado, relacionado co baixo rendemento de recuperación en comparación co aceite de oliva refinado, resultando en costes de produción moito maiores (7–9).

2.1 Lexislación.

As variedades de olivo poden clasificarse en función das súas aptitudes(6) en:

- **Variedades almazara:** destinadas principalmente á obtención de aceite. O Código Alimentario Español define o aceite de oliva como "o líquido oleófobo que se extrae dos froitos maduros da oliva (*Olea europaea*) sen ter sido sometido a ningunha manipulación ou tratamento non autorizado".
- **Variedades de mesa**: aqueles froitos de variedades determinadas que sometidos a preparacións adecuadas resultan nun produto de consumo con boa conservación como mercancía comercial.
- **Dobre aptitude**: variedades cuxos froitos ofrecen a posibilidade de ser destinados tanto á produción de aceite como ao seu consumo en mesa.

A lexislación específica (10) aplicable ao aceite de oliva e olivas de mesa en España, ríxese pola Normativa Comunitaria mediante o *Regulamento Delegado (UE) nº 2022/2104 sobre as normas de comercialización do aceite de oliva*, e pola Normativa Nacional mediante o *Real Decreto 861/2018, do 13 de xullo, polo que se establece a normativa básica en materia de declaracións obrigatorias dos sectores del aceite de oliva e as olivas de mesa*, o *Real Decreto 84/2021, do 9 de febreiro, polo que se establecen as normas básicas para a aplicación do artigo 167 bis do Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeo e do Consello, do 17 de decembro de 2013, regulador das normas de comercialización do aceite de oliva*, e o *Real Decreto 760/2021 sobre a norma de calidade dos aceites de oliva e os aceites de bagazo de oliva*.

No artigo 5 do Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 da Comisión do 29 de xullo de 2022 (11) establécense as normas específicas para o etiquetado do aceite de oliva na Unión Europea, e contempla que se deben incluír na mesma:

1. A categoría do aceite de oliva, especificadas e definidas no Regulamento (UE) No 1308/2013 (12). Ademais, tamén se deberá incluír información referente á categoría, como se indica no Artigo 6 do Regulamento Delegado (UE) 2022/2104, a cal se recorre xunto a denominación da categoría.

   Categorías:

   a. Aceite de oliva virxe
      i. Aceite de oliva virxe extra: "aceite de oliva de categoría superior obtido directamente de aceites e só mediante procesos mecánicos"
      ii. Aceite de oliva virxe: "aceite de oliva obtido directamente dos aceites e só mediante procesos mecánicos"
      iii. Aceite de oliva lampante
   b. Aceite de oliva refinado
   c. Aceite de oliva que contén exclusivamente aceite de oliva refinado e aceite de oliva virxe: "aceite que contén exclusivamente aceites de oliva sometidos a un tratamento de refinado e aceite obtido directamente de olivas".
   d. Aceite de bagazo de oliva cru
   e. Aceite de bagazo de oliva refinado
   f. Aceite de bagazo de oliva:

i. "aceite que contén exclusivamente aceites resultantes do tratamento do produto obtido tras a súa extracción do aceite de oliva e aceites obtidos directamente de olivas»
ii. “aceite que conteña exclusivamente aceites resultantes do tratamento do bagazo de oliva e aceites obtidos directamente de olivas».

De acordo co establecido no Anexo VII parte VIII do Regulamento (UE) No 1308/2013, só poderán comercializarse ao por menor os aceites a.i, a.ii, c, e f, polo tanto a información relativa ao etiquetaxe só fai referencia ás mesmas.

2. Información sobre condicións de almacenamento do produto.
3. Indicación do lugar de orixe para os aceites de oliva virxe extra e aceite de oliva virxe, así como a recolecta de olivas nun país diferente ao de extracción do aceite.
4. O número da empresa de envasado.

2.2 Problemática e fraude alimentario.

Como se pode observar, na etiquetaxe do produto non é obrigatorio incluír información sobre a variedade empregada na elaboración do aceite. Estes datos forman parte da información de voluntaria inclusión tanto no etiquetaxe como nos documentos de acompañamento durante o transporte do aceite.

A pesar disto, existe un interese crecente no mercado tanto por coñecer a orixe xeográfica e varietal do aceite, como a calidade do mesmo, de forma que permita aos consumidores seleccionar produtos de proximidade.

Actualmente, tanto produtores como consumidores, apostan por dar valor a produtos locais e sostibles de elevada calidade, xerando interese pola identificación das variedades locais de olivo. Para isto precísase dunha tecnoloxía que permita a identificación das mesmas, e que sexa accesible nas diferentes partes da cadea de valor.

Ademais, o elevado prezo do aceite motiva o risco de fraude alimentario, ben sexa mesturándoo con aceites vexetais máis baratos, como falsificando o seu orixe, cultivar ou categoría (13). Para previlo, é moi importante poder realizar unha análise rápida, sensible e in-situ en diferentes puntos da cadea de suministro asegurando a trazabilidade e autenticidade do produto.

2.3 Identificación varietal.

Segundo o Ministerio de Agricultura, Pesca e Alimentación (14), para levar a cabo a identificación varietal é necesario ter en conta os seguintes aspectos:

a. Datos de pasaporte: a denominación aceptada da variedade, sinonimias, zonas predominantes de cultivo e importancia relativa do cultivar.
b. Caracteres morfolóxicos: escolléronse 28 caracteres para proceder á correcta identificación varietal de acordo aos considerados pola Unión internacional para a Protección de Obtencións Vexetais, os empregados polo Comité Oleícola Internacional e os estudios de Barranco e Rallo (1984) e de Barranco et al. (2000). Estúdanse caracteres da árbore, da folla, do fruto e do oso (endocarpo).
c. Consideración agronómicas e comerciais

Pola enorme cantidade e variedade de cultivares sinónimos e homónimos, o elevado risco de fraude deste produto e o intenso intercambio de material vexetal, entre outros, a identificación varietal é un proceso clave á vez que complexo.

Para a autenticación e trazabilidade do aceite de oliva realízanse, ademais do estudo das características morfolóxicas, análises químicos baseados no análise da composición da mostra. Os compoñentes estudados divídense en compoñentes maiores e menores. Dentro dos maiores atopamos análise de AGs (ácidos graxos) ou de TGs (triglicéridos), e entre os menores ou de fracción insaponificable atopamos análise de hidrocarburos, fracción fenólica, fitoesterois, tocoferois ou pigmentos. Para levar a cabo estes estudos recórrese a técnicas analíticas, destacando os métodos cromatográficos, que permiten a rápida separación e cuantificación dos compostos, e os métodos espectroscópicos (1). A desvantaxe destes estudos de composición é a inestabilidade ante as condicións ambientais. Polo tanto, nin o estudo das características morfolóxicas nin o análise de compostos permite resultados fiables para garantir a trazabilidade do aceite (1,13).

Ante a falta de procedementos confiables desenvolvéronse métodos baseados na identidade xenética para determinar o cultivar do que procede o aceite de oliva. Estes, permiten unha identificación máis fiable, dado que o xenoma, que corresponde co da árbore de procedencia, non se ve afectado polo ambiente, aínda que a veces podemos

atopar alelos extra que correspondan aos alelos do polinizador, contidos no embrión localizado dentro da semente (13).

2.3.1 Identificación xenética das variedades.

Os marcadores xenéticos son ferramentas válidas para a avaliación dos materiais biolóxicos, tanto en estudos xenéticos como en estudos de trazabilidade e auteticidade. Por isto, son ampliamente empregados para a caracterización de cultivares de olivo e a determinación da composición varietal, a orixe e a autenticidade do aceite de oliva (5).

Os métodos baseados no ADN presentan unha maior especificidade, sensibilidade e rendemento se os comparamos cos métodos bioquímicos. A pesar disto, teñen como desvantaxe que as mostras normalmente son complexas e cun baixo contido de material xenético, polo que a extracción é un paso chave (15). Ademais, as nucleasas do aceite, xunto con compostos fenólicos e polisacáridos residuais, poden inhibir a ADN polimerasa dificultando a amplificación do material por PCR(1). Por isto, desenvolvéronse diferentes técnicas de preparación e inmobilización do ADN para o seu posterior análise, empregando por exemplo soportes como sílice ou perlas magnéticas con superficies activas, ademais de diversos protocolos de extracción(1).

Existen moitos tipos de marcadores xenéticos para o estudo da identidade dos cultivares de olivo. Entre os máis destacados atopamos os RAPD, AFLP, ISSR, SNP ou SSR(1,3,5,15). Dentro destes, os SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) e os SSRs ou microsatélites son os máis empregados, xa que son considerados como ideais para as mostras de ADN parcialmente degradado como o que se extrae do aceite de oliva, posto que precisan a amplificación de amplicóns de PCR curtos (3). A pesar de ambos ser bos candidatos, os SNPs son máis abundantes no xenoma, hérdanse dun xeito estable, e na maioría dos casos son bialélicos e codominantes (3). Polo tanto, os SNPs son os marcadores de elección para levar a cabo as tarefas de autentificación e trazabildade de cultivares de olivo.

Os xenes máis comúnmente empregados para a discriminación entre cultivares de olivo son os xenes cicloartenol sintase e lupeol sintase, que codifican proteínas implicadas na síntese de terpenoides (3,5) situadas en gotas de lípidos. Polo tanto, presentan un elevado potencial para a discriminación entre cultivares por ser claves na síntese de ácidos oleicos,

e por contar cun cDNA previamente identificado e amplamente secuenciado. Estudos levados a cabo nestes xenes permitiron o descubrimento de SNPs con potencial para a identificación de cultivares(5). A identificación dos SNPs levouse a cabo mediante o xenotipado e secuenciación do producto de PCR de diferentes cultivares, e o posterior análise comparativo das secuencias(5).

2.4 Variedades empregadas.

Para o desenvolvemento do presente proxecto obtivéronse mostras de dúas empresas de Chipre: Atsas Farm e Aparthenasa, así como dunha empresa galega, Aceites Abril e outra turca, Global Organics LTD, no marco do proxecto Horizon Europe TITAN (Número do proxecto: 101060739; https://titanproject.eu/).

As variedades de oliva empregadas son variedades almazara, e entre elas atópanse(16):

5. ***Picual*** (6): é a variedade máis importante de España, con aptitude almanzara. Os seus frutos presentan maduración precoz e é apta para a recolección mecánica, cunha elevada e constante productividade xunto cun elevado rendimento graso. O aceite obtido é de calidade media e alta estabilidade, o que ignifica que é moi resistente á rancidez polo seu altísimo contido en ácido oleico. Os aceites de oliva monovarietais picual representan arredor do 25% da producción mundial de aceite de oliva.
6. ***Arbequina*** (6): é unha variedade para a producción de aceite. É a variedade máis importate de Cataluña, aínda que tamén se atopa ampliamente difundida en Aragón e recientemente tamén en Andalucía. Fora de España atópase en Arxentina. Os seus frutos teñen unha forza de retención media, pero o seu pequeno calibre dificulta a recolección mecanizada. É apreciada pola súa elevada e constante producción, además de que a calidade do seu aceite é excelente polas súas boas características organolépticas, aínda que presenta unha baixa estabilidade. Ten un elevado contido oleoso. É aconsellada para plantacións intensivas polo seu reducido vigor, e é a variedade de base para as Denominacións de Orixe "Les Garrigues" (Lleida) e "Siurana" (Tarragona) de Cataluña.
7. ***Ladoelia***: é unha variedade orixinaria de Chipre, tanto con aptitude almazara como de mesa (aptitude dual), aínda que a producción de aceite é o seu uso principal. Ten

un contido de aceite medio-alto, dando un rendemento do 22-25%. O aceite é altamente valorado polo seu aroma intenso.

8. ***Kato Dry***: é unha variedade orixinaria de Chipre con doble aptitude: mesa e aceite. Foi creada como un clon da variedade Ladoelia para mellorar certas características como o crecemento, o rendemento, o peso do froito, o contido de aceite, a relación pulpa / oso, a conservación da oliva de mesa, a resistencia a factores bióticos e abióticos.
9. ***Kalamatas***: é unha variedade orixinaria de Grecia con aptitude dual. A pesar dista doble aptitude, é principalmente cultivada para producir olivas negras estilo grego. Ten unha alta produtividade, e conserva a cor negra independentemente do método de preparación. Dá un rendemento medio de aceite de excelente calidade.
10. ***Koroneiki***: é unha variedade almanzara que supón a principal variedade produtora de aceite de Grecia. Ten unha produtividade alta e constante, cun rendemento de aceite moi elevado, además de que este aceite está altamente valorado.
11. ***Kilis Yaglik*** (17): a orixe xeográfica desta variedade é Kilis, no sueste de Turquía. Caracterízase por un vigor medio, é resistente ás xeadas, e produce froitos de tamaño medio con alta produtividade. As froitas úsanse xeralmente na extracción de aceite de oliva.

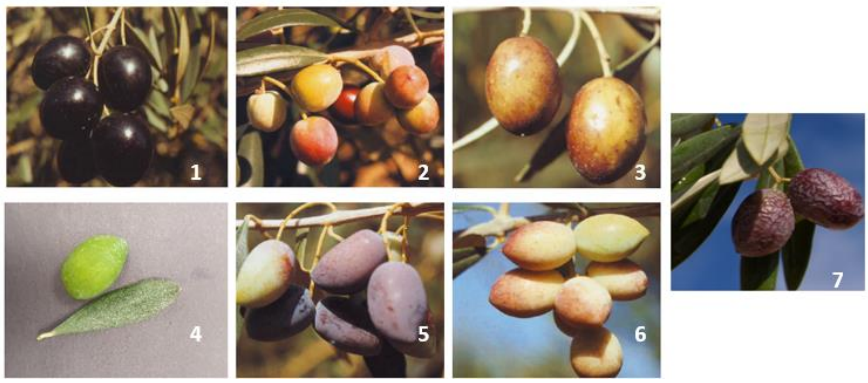


Ilustración 1. Variedades de olivo empregadas. 1: Picual, 2: Arbequina, 3: Ladoelia, 4: Kato Dry, 5: Kalamatas, 6: Koroneiki, 7: Kilis Yaglik.

3. Obxectivos

A finalidade e obxectivo último do presente proxecto de investigación, é o de desenvolver un método que permita determinar de xeito rápido e fiable a identidade varietal das olivas empregadas na elaboración do aceite de oliva. Ademais, búscase que este método de

identificación se poda incluír en dispositivos miniaturizados de microfluídica para ser empregados en diferentes puntos da cadea alimentaria de dito produto.

Para a consecución deste obxectivo principal, establécense unha serie de obxectivos secundarios, tales como:

- Analizar e identificar mediante búsqueda bibliográfica aquelas rexións do material xenético da especie *Olea europaea* que presenten variabilidade intervarietal descrita, e polo tanto, nas que se podan atopar polimorfismos.
- Identificar mediantes ferramentas bioinformáticas polimorfismos intervarietais que permitan discriminar as variedades de olivo de interese de outras variedades comerciais.
- Deseñar, desenvolver e testar un método molecular específico para a identificación das variedades obxecto de estudo neste traballo: *Ladoelia, Kato Dry, Kalamatas,* e *Koroneiki,* así como *Picual* e *Arbequina* de xeito adicional.

4. Materiais e Métodos

4.1 Obtención de mostras.

Obtivéronse mostras de dúas empresas de Chipre: Atsas Farm e Aparthenasa, así como dunha empresa galega, Aceites Abril e outra turca, Global Organics LTD.

As mostras, que constan de oliva e/ou folla, atópanse en bolsas individuais pechadas e identificadas segundo variedade. A variedade turca unicamente foi enviada ao laboratorio INL (International Iberian Nanotechnology Laboratory) en Braga.

A Táboa 1. Códigos empregados nas mostras. recolle as mostras recibidas, o seu código de extracción asignado, e o seu orixe.

4.2 Extracción e cuantificación de ADN total.

O primeiro paso foi a extracción do material xenético de todas as mostras. O kit comercial empregado foi o ***DNeasy Plant Pro and Plant Kits de*** QIAGEN® (© QIAGEN® 2013–24). Este kit permite unha extracción rápida e a obtención de ADN listo para empregar.

As mostras introdúcense nun tubo de disrupción, que permite mediante a tecnoloxía "bead beating" ou "batido con microesferas" e a presencia dunha solución tampón, a lise e homoxenización mecánica das mesmas de xeito rápido e eficiente. Ademáis, a tecnoloxía IRT (Inhibitor Removal Technology) de QIAGEN® permite eliminar os inhibidores de PCR do material xenético liberado. Este material xenético finalmente captúrase nunha membrana de sílice para ser lavado e eluído da membrana, permitindo conseguir material xenético libre de inhibidores cun elevado rendemento e listo para empregar en posteriores aplicacións como a PCR.

Nas mostras de plantas cun alto contido de compostos fenólicos inclúese solución PS para evitar a pérdida de ácidos nucleicos pola súa unión irreversible a ditos compostos. Esta solución foi empregada en todas as mostras excepto nas mostras de follas, como se indica na Táboa 24.Cantidades empregadas para a extracción.

Polo tanto, para levar a cabo o protocolo de extracción (Ilustración 35. Protocolo de extracción.), mestúranse 100 mg de cada mostra con 500 µL de solución CD1 ou 450 µL de solución CD1 máis 50 µL de solución PS (dependendo do tipo de mostra como xa se indicou) a un tubo de lise, e logo a mostra homoxenízase mediante vórtex e centrifúgase para recoller o sobrenadante, o cal se mestura con 250 µL de solución CD2 e se volve a centrifugar para recoller o sobrenadante. Finalmente, o sobrenadante mestúrase con Buffer APP, lévase a vórtex, e introdúcese o lisado nunha MB Spin Column para capturar o material xenético logo dunha centrifugación. Por último, o material xenético lávase na columna mediante o emprego dos buffers AW1 e AW2 mediante centrifugación, e finalmente emprégase o buffer de elución (buffer EB) para obter o ADN final.

A variedade *Kilis Yaglik* únicamente foi enviada ao INL (International Iberian Nanotechnology Laboratory) en Braga, polo que os datos correspondentes á súa extracción e cuantificación foron obtidos por Carla Teixeira (Ph.D Student no grupo "Food Quality & Safety Group").

Unha vez obtido o ADN, lévase a cabo a cuantificación do mesmo no Qubit dsDNA BR (amplio rango) para determinar a cantidade de ADN total. Este é un ensaio de alta sensibilidade que permite traballar con mostras de baixas concentracións de dsDNA.

A cuantificación do material xenético realízase por fluorescencia, de maneira que o kit presenta (entre outras) unha "working solution" que permite obter un sinal fluorescente estable durante tres horas ao mesturalo coas mostras ou o estándar. Antes de realizar as medidas das mostras é necesario calibrar o equipo preparando dous estándares, un cunha concentración de 0 ng/µL e outro cunha concentración de 100 ng/µL, así como preparar a "working solution" mesturando dous reactivos presentes no kit. Para a preparación das mostras, pódese empregar un rango de 1 a 20 µL xunto coa cantidade restante de "working solution" para chegar ata os 200 µL. Neste caso, empregáronse 20 µL de mostra.

O ensaio comeza lendo os estándares, e logo procédese á lectura das mostras tras indicar o volume empregado en cada caso. Calcula a concentración da mostra orixinal así como a concentración da mostra diluida no ensaio.

Todas as mostras, excepto as de Aceites Abril, empregáronse nas posteriores etapas empregando o seguinte código para facilitar o manexo:

Táboa 1. Códigos empregados nas mostras.

Variedade	Orixe	Código extracción	Código secuenciación
Olea europaea var. 'Ladoelia'	Chipre (Atsas Farm)	KY(A/F)	W1_CS_extraction
Olea europaea var. ' Kalamatas'	Chipre (Atsas Farm)	KA(A/F)	W2_CS_extraction
Olea europaea var. ' Koroneiki'	Chipre (Atsas Farm)	KO(A/F)(4-6)	W3_CS_extraction
Olea europaea var. ' Koroneiki'	Chipre, Sia (Aparthenasa)	KO(A/F)(1-3)	W4_CS_extraction
Olea europaea var. ' Koroneiki'	Chipre, Vavarsinia (Aparthenasa)	KO(A/F) (7-9)	W5_CS_extraction
Olea europaea var. 'Ladoelia'	Chipre (Aparthenasa)	KOU(A/F)(1-3)	W6_CS_extraction
Olea europaea var. ' Kato Dry'	Chipre (Aparthenasa)	KD(A/F)(1-3)	W7_CS_extraction
Olea europaea var. 'Kilis Yaglik'	Turquía (Global Organic Ltd.)	KK(A/F)(1-3)	W8_CS_extraction
Olea europaea var. 'Arbequina'	España (Aceites Abril)	ARA (1-3)	
Olea europaea var. 'Picual'	España (Aceites Abril)	PIA (1-3)	
Aceite	España (Aceites Abril)	AC (1-3)	
Pasta	España (Aceites Abril)	PA (1-3)	

[1]

4.3 Identificación morfolóxica.

As mostras identificáronse e autentificáronse morfolóxicamente no Grupo de Investigación de Recursos Xenéticos e Mellora do Olivo (UCOLIVO) pertencente á área de Producción Vexetal da Universidade de Córdoba por parte de Isabel Trujillo Navas.

[1] A/F: as mostras foron tanto de aceituna (A) como de folla (F).

Para a identificación e a autentificación, empregáronse mostras dos endocarpos das olivas.

As características morfolóxicas das diferentes variedades están dispoñibles no Catálogo Mundial de Variedades de Olivo (16).

4.4 Identificación das rexións xenéticas a estudar

Para levar a cabo a correcta identificación das variedades, precísase dunha rexión xenómica que conteña a suficiente variabilidade para diferencialas, pero tamén se atope conservada e, idealmente, previamente caracterizada para poder acceder a información complementaria obtida por terceiros.

Para isto é necesario realizar unha búsqueda bibliográfica que permita identificar aquelas rexións xenómicas previamente caracterizadas no olivo, e así avaliar cales serían as máis interesantes para a búsqueda de SNPs (Single Nucleotide Polymorfisms) que permitan diferenciar entre variedades (Táboa 2. Xenes avaliados para o estudo.). Nestas rexións buscaranse diferenzas alélicas intervarietais, para o cal é necesario secuenciar o xenoma das mostras, e obter a secuencia nucleotídica de cada unha das variedades que nos permita identificar marcadores (no caso de este estudo, os marcadores serán SNPs, ou Single Nucleotide Polymorfisms).

Táboa 2. Xenes avaliados para o estudo.

Referencia	Enlace	Xene
(2)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY847065.1?report=fasta	*cycloartenol synthase*
(2)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY847066.1	*lupeol synthase gene, partial cds*
(2)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ202708.1?report=fasta	*aquaporin PIP1-1*
(18)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=PIP2%3B1+olea	*aquaporin PIP2-1*
(18)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/111404372	*aquaporin TIP1-1-like*
(18)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL898594.1?report=fasta	*trnL tRNA-Leu*
(18)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8690372	*rbcL*
(4)	https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/g06-068	*anthocyanidin synthase*
(4)	https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/g06-068	*chalcone synthase*
(4)	https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/g06-068	*Cu–Zn-superoxide dismutase gene*
(4)	https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/g06-068	*calcium-binding protein*

4.5 Amplificación mediante PCR e secuenciación.

Unha vez identificadas aquelas rexións xenómicas para a búsqueda de SNPs que permitan discernir entre variedades de olivo, estas amplificaranse mediante end-point PCR. Para levar a cabo esta amplificación, tamén é necesario identificar os primers que permitan amplificar selectivamente a secuencia de interese.

Os primers empregados para a amplificación foron os seguintes:

Táboa 3. Primers empregados na PCR.

Información dos primers					
Gene	**Código**	**Secuencia**	**Tamaño amplicón**	**Concentración (nM)**	**Referencia**
OEX (Cycloartenol Synthase)	Cyc1-F Cyc1-R	GCCCATTTCAGATTGCAC GGGATTCTCAGGTCAGGA	755 bp	140 nM	(4)
OEW (Lupeol Synthase)	Lup2-F	CTAACTCGATGGCCGTTTTCTAA	504 bp	125 nM	(3)

Os amplicóns obtidos mediante a PCR foron purificados e enviados a Sanger Sequencing en Macrogen (Madrid, Spain), para obter as secuencias para ser analizadas mediante o software Geneious Prime® (versión 2023.1.2).

O traballo de amplificación, electroforese, e secuenciación, foi levado a cabo por Carla Teixeira (Ph.D Student, INL), no marco do proxecto europeo TITAN: Demonstration of traceability and authenticity in the olive supply chain. Este proxecto é financiado polo programa de investigación e innovación HORIZON EUROPE no marco do convenio de subvención No 101060739, e os resultados de secuenciación foron remitidos para o seu posterior análise bioinformático.

Unha vez levada a cabo a amplificación, as bandas dos amplicóns visualízanse mediante electroforese en xel para o cotexo visual da amplificación específica da rexión de interese. As condición da PCR móstranse a continuación:

Táboa 4. Condicións da PCR.

PCR program				
Step		**T (°C)**	**Time**	**Cycles**
Initial Denaturation		95	4 min	
Amplification	Denaturation	95	30 s	45
	Annealing	57	30 s	
	Extension	72	1 min	
Final Extension		72	6 min	

En tódolos casos para a amplificación con PCR empregáronse 5 µL da mostra de ADN de folla na que se obtivera unha maior concentración.

Para a electroforese en xel de agarosa, o xel prepárase a unha concentración do 2% (p/v) con 100 µL de buffer de borato de sodio (BS) e 4 µL de tinte de ácidos nucleicos. O xel cárgase con 1 µL de loading dye e 5 µL da mostra, e déixase correr en buffer SB a 300V durante 30 minutos.

Unha vez obtidos os produtos de PCR, nos que se atopan en cada mostra os xenes amplificados, estes envíanse a secuenciar mediante secuenciación Sanger á empresa ©Macrogen, Inc, polo método Macrogen Standard Sequencing, para o cal son necesarios 10 µl de ADN e 10 µl de primers, cunha concentración de 10 ng/µl no caso dos produtos de PCR e de 5-10 pmol/µl no caso dos primers. A concentración dos extractos de PCR determínase por fluorescencia mediante Qubit dsDNA BR.

4.6 Análise bioinformático

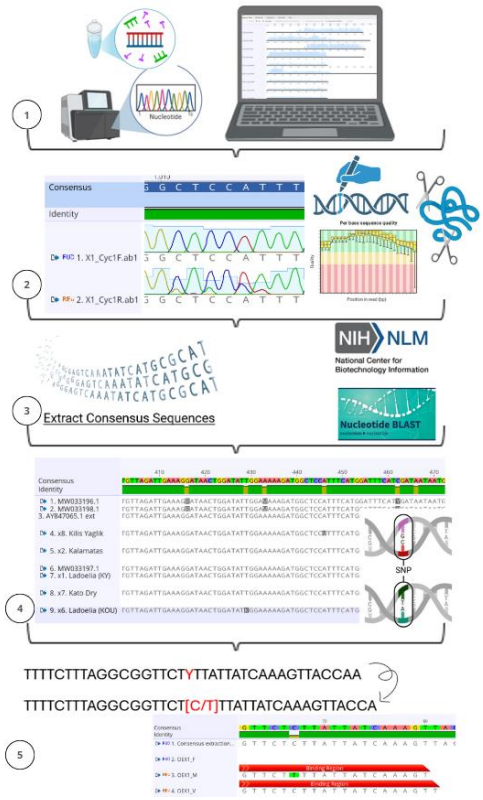


***Ilustración 2. Fluxo de traballo do análise bioinformático**: 1. Secuenciación e carga de secuencias no software Geneious Prime; 2. Edición e limpeza das secuencias: creación da secuencia reverso-complementaria da secuencia reversa, edición de nucleótidos mal asignados ou de baixa calidade, eliminación de extremos.... Ensamblado e corrección do contig; 3. Extracción da secuencia consenso, e búsqueda en bases de datos de secuencias coincidentes e secuencias do mesmo xen noutras variedades; 4. Aliñamento de todas as secuencias atopadas e identificación de SNPs; 5. Deseño e envío das secuencias das sondas.* Imaxe realizada con BioRender.

Unha vez recibidos os resultados de secuenciación, estes atópanse dispoñibles para descargar en formato .ab, entre outros, que permite a visualización e o análise das secuencias. Neste caso, o programa empregado para o análise das mesmas foi o software Geneious Prime (Geneious Prime® 2024.0.7).

4.6.1 Carga de secuencias no software para o posterior análise.

Polo tanto, en primeiro lugar é necesario cargar as secuencias no programa, as cales agruparon en carpetas separadas para cada xen. Como a secuenciación se realizou polo método de Sanger, para cada secuencia analizada obtense un cromatograma, o dato crudo lido polo secuenciador, a secuencia de nucleótidos e as calidades asignadas a cada un deles. A partir de cada cromatograma, mediante un proceso de basecalling, obtense a secuencia de nucleótidos. Este proceso realízao automáticamente o software, pero é convinte revisar a asignación de bases, xa que en moitas ocasións existen fallos.

4.6.2 Edición e tratamento das secuencias:

Logo de cargar as secuencias é necesario levar a cabo un proceso de curado ou de corrección das mesmas, para asegurar a súa fiabilidade e incrementar a calidade.

Para realizar esta asignación de bases tamén se fai uso dos valores de calidade, que é unha medida da probabilidade de que cada un dos nucleótidos secuenciados sexan erróneos. O Geneious Software permite unha vista da secuencia por colores segundo a calidade das bases, de xeito que canto máis escuro sexa o azul, menor será a calidade da base. Deste xeito, correxirase ruido de fondo por posibles contaminacións (picos minoritarios que impiden a visualización dunha secuencia limpa, con picos ben diferenciados), pero tamén asignacións incorrectas, dobles picos, picos pegados ou outros posibles erros, e introduciranse ou correxiranse os nucleótidos dexenerados que, na maioría dos casos, serán os marcadores xenéticos empregados para diferenciar entre variedades.

Tamén é necesario recortar as bases de mala calidade dos extremos da secuencia, onde existe moito ruido por fallos no secuenciador, o que se coñece como “Trim ends”, e é necesario realizalo antes de ensamblar o contig, xa que estas rexións, de estar presentes, poden producir ensamblaxes incorrectas.

4.6.3 Alineamento das secuencias curadas para obter a secuencia consenso, e búsqueda de coincidencias en bases de datos.

A continuación, logo de curar as secuencias, é necesario aliñar a secuencia F (forward) e R (reverse) de cada variedade para ensamblar o contig. Desta maneira obtemos o amplicón de doble cadea, o cal é necesario tratar para obter unha secuencia o máis pura e fiable posible. Antes de realizar o aliñamento é necesario obter a secuencia reverso-complementaria da secuencia reverse para que hibriden (esto ocorre porque a secuencia reverse amplifícase de xeito 5´-3´, pero para que poda hibridar coa secuencia forward necesitamos a secuencia inversa a esta, é dicir, a secuencia complementaria 3´-5´).

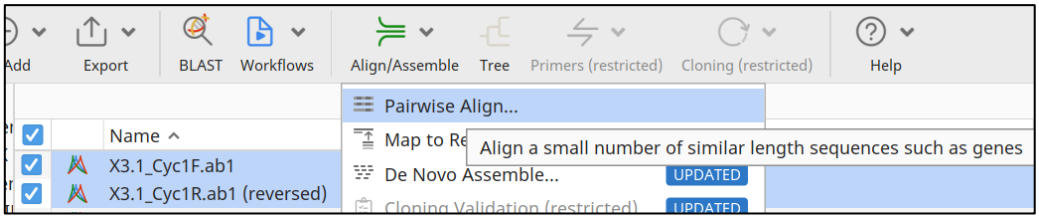


Ilustración 3. Procedemento para a realización dos aliñamentos. Imaxe de Geneious Prime.

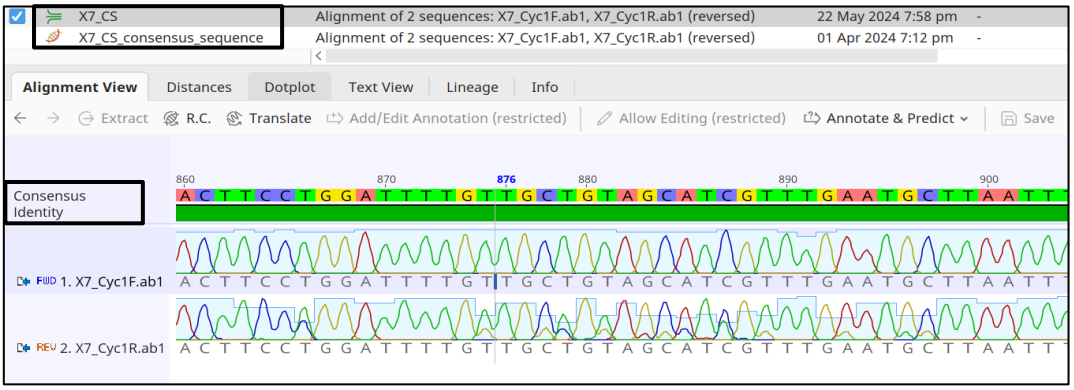


Ilustración 4. Representación das secuencias F e R aliñadas e a consenso derivada deste aliñamento. Imaxe de Geneious Prime.

Unha vez ensamblado o contig podemos extraer a secuencia consenso do mesmo, e ademáis, podemos de novo realizar unha avaliación e corrección da secuencia derivada do aliñamento para obter unha secuencia o máis limpa e precisa posible fixándonos na información aportada por ambas secuencias.

Dentro do contig pódense identificar os primers para extraer o amplicón e quedarnos solo coa rexión de interese, que será a rexión do xene amplificada dentro da cal nos interesa avaliar a presenza de polimorfismos. Unha vez obtida a secuencia consenso para cada variedade e para cada xene, procédese á realización de un blastn con cada unha delas, así como á búsqueda en NCBI de secuencias dos xenes de interese en diferentes variedades.

4.6.4 Alineamento de todas as secuencias e identificación de SNPs.

Unha vez obtidas todas as secuencias de interese, realízanse os aliñamentos. Por un lado realízase o aliñamento das secuencias propias por separado para a identificacion de SNPs que permitan o deseño das sondas para a posterior qPCR, pero tamén se aliñan todas as mostras xuntas para obter máis información sobre a presenza de variacións nucleotídicas.

Unha vez as secuencias están correctamente aliñadas, identifícanse aquelas rexións que poden servir para o deseño de sondas para a identificación varietal por qPCR. É dicir, identifícanse os SNPs para determinar aqueles que permiten diseñar sondas de interese para diferenciar entre o maior número de variedades posibles.

4.6.5 Deseño de ensaios de xenotipado de SNPs.

A qPCR realizarase mediante ensaios de xenotipado de SNPs mediante PCR en tiempo real TaqMan (Custom TaqMan SNP genotyping assays, ThermoFisher scientific). Para levala a cabo, necesitaremos sondas que hibriden específicamente co sitio diana ou target site seleccionado.

Para o deseño das sondas séguese o fluxo de traballo proporcionado pola En resumo, estes consisten en ingresar a secuencia obxectivo marcando os sitios diana específicos (os SNPs) na ferramenta de deseño de ensaios personalizados TaqMan™ de ThermoFisher. Esta ferramenta permite solicitar ensaios de xenotipificación de SNPs, xerando, a partir da secuencia ingresada (a cal debe estar editada para cumprir cos criterios establecidos), dous primers e dúas sondas que permiten levar a cabo a identificación dos SNPs mediante a qPCR. Unha vez que se notifique o deseño exitoso do ensaio, este pode comprarse.

Para aportar estas secuencias, é necesario cumprir unhas características determinadas pola empresa e seguir un fluxo de traballo concreto, o cal se mostra a continuación:

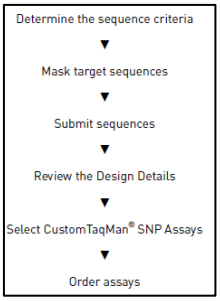


Ilustración 5. Fluxo de traballo para o deseño de sondas.

Polo tanto as secuencias para o deseño das sondas deben cumprir unha serie de criterios recollidos a continuación:

- Secuencia debe ter unha largura de aproximadamente 600 pb (mínimo 61 e máximo 6.000 pb) con un mínimo de 30 pb a cada lado do SNP. Debe introducirse en dirección 5´3´. Cada secuencia diana ou secuencia target debe nomearse do seguinte xeito: conter 4 a 16 caracteres alfanuméricos sen espazos, e non empezar cun guión.
- En canto ao target site, ou sitio diana:
    - site debe atoparse no centro da secuencia.
    - Cada target site debe identificar un SNP.
    - Polo menos debe incluirse un target site (un SNP) por ensaio, e as variacións que non se desexan identificar deben marcarse con Ns.
    - Os target sites deben atoparse polo menos a 40 pb de distancia dos extremos 5´e 3´.
    - Os target sites deben atoparse a máis de dúas bases de distancia de calquera nucleótido N e de calquera outro SNP.
    - Os códigos IUPAC R, Y, M, K, S, W, H, B, V, e D deben convertirse en N, excepto aqueles SNPs que formen parte do sitio diana. É dicir, aquelas bases ambiguas que non se queiran estudar deben enmascararse.
    - Cada sitio diana debe separarse por corchetes dentro da secuencia ([]).
    - Dentro destes corchetes, a primeira base representa o primeiro alelo, e seguido dunha barra / poñerase a segunda base do segundo alelo. Por exemplo: R pasaría a [A/G].
    - Dentro de cada secuencia, os SNPs enuméranse en dirección 5´3´.

Unha vez editadas as secuencias acorde aos anteriores criterios, estas súbense á ferramenta de deseño de ensaios Taqman de ThermoFisher copiando e pegando a secuencia (Ilustración 37. Ferramenta de deseño de sondas TaqMan de ThermoFisher para o envío das secuencias).

Unha vez enviadas as secuencias, e recibido o correo de confirmación, revísanse os detalles para ver se os ensaios foron deseñados correctamente, se fallaron, ou cal é o seu

estado. Unha vez que o deseño dos ensaios é correcto, procédese ao pedido dos mesmos indicando a cantidade de tubos necesarios e procédese á compra dos mesmos.

4.7 Ensaio de xenotipado mediante qPCR TaqMan.

A qPCR realizarase mediante ensaios de PCR en tiempo real TaqMan de Thermo Fisher Scientific Inc, para a identificación de xenotipos mediante SNPs. Como detallado no apartado anterior, estes ensaios compóñense de un par de primers de PCR e duas sondas TaqMan para a discriminación alélica.

Cada sonda consta de unha etiqueta de colorante (VIC ou FAM) no extremo 5´, e no extremo 3´ un quencher non fluorescente (NFQ) unido a unha molécula MGB (minor groove binder ou aglutinante de surco menor). O NFQ impide que o colorante indicador emita un sinal de fluorescencia cando a sonda non hibridou e está intacta, mellorando a precisión da cuantificación, mentra que o MGB aumenta a temperatura de fusión (Tm) sen a necesidade de aumentar a lonxitude da sonda, estabilizando a unión da sonda á secuencia de ADN.

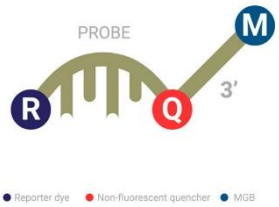


Ilustración 6. Representación dos compoñentes da sonda.

A temperatura de fusión determina as condición de unión da sonda coa secuencia diana, e indica a temperatura á cal a metade das moléculas da sonda están unidas á secuencia diana, e a metade das moléculas de ADN bicatenario se atopan separadas. Se a Tm é baixa, o porcentaxe de unión da sonda á secuencia será tamén pequeno, xa que esta se unirá a secuencias parcialmente coincidentes, mentras que cunha temperatura elevada, a sonda únese específicamente á secuencia obxectivo con unións máis fortes. É importante que a Tm da sonda sexa 5-10ºC superior á Tm dos primers, de xeito que permita que a sonda permanezca unida á secuencia diana ás temperaturas empregadas na extensión da qPCR. A mellor hibridación tamén permite evitar fluorescencia de fondo causada por deshibridación espontánea ou unión inespecífica. (19).

Para a realización da qPCR:

1. O ADN mestúrase coa MasterMix de identificación de xenotipos TaqMan®, os dous primers e as dúas sondas TaqMan® MGB.

2. As sondas hibridan co ADN diana entre os dous primers. O sinal do colorante fluorescente no extremo 5' é extinguido polo NFQ no seu extremo 3'.
3. Durante a qPCR a Taq polimerasa extende os prmers empregando a secuencia diana como guía.
4. Durante a extensión da Taq polimerasa, cando esta chega á sonda TaqMan rompe a molécula, separando o colorante do quencher, permitindo a detección do colorante VIC ou FAM.
5. Con cada ciclo de PCR, hai máis moléculas de colorante liberado, resultando nun aumento da fluorescencia proporcional á cantidade de amplicón sintetizado.

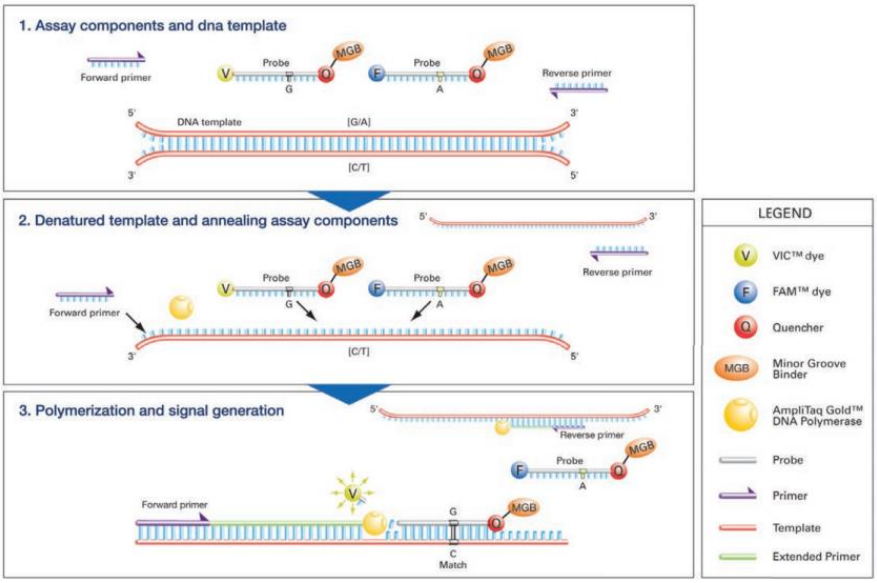


Ilustración 7. Ensaio de xenotipado TaqMan SNP. (1) Os catro compoñentes do ensaio e o ADN diana cos SNPs. (2) ADN diana desnaturalizado e hibridación dos compoñentes. (3)

A qPCR realízase nunha placa de 96 pocillos, empregando a TaqPath™ ProAmp™ Master Mix, a alícuota coa secuencia da sonda a unha concentración 20X e o material xenético de cada variedade a unha concentración de 0.2 ng/µL.

As condicións para a qPCR móstranse na seguinte táboa:

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-Read	60°C	30 seconds	Hold
Initial denature / Enzyme activation	95°C	5 minutes	
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal / Extend	60°C	60 seconds[1]	
Post-Read	60°C	30 seconds	Hold

Ilustración 8. Condicións para a qPCR.

Cada reacción de PCR axustouse para 20µL, e para cada variedade realizáronse 3 réplicas, polo que os cálculos se realizaron para un total de 3.2 reaccións. Para unha reacción o volume de cada reactivo é o seguinte (o volume de ADN depende da concentración da alícuota):

Táboa 5. Volume de cada reactivo para unha reacción de qPCR.

	µL
total	20
MM	10
Sonda	1
ADN	ata 9

As variedades empregadas no ensaio, así como o código empregado para a identificación na placa (correspondendo o 1 cun branco onde a cantidade de DNA é 0) son as seguintes:

Táboa 6. Variedades estudadas na qPCR.

Variedad	Cod. Placa
Ladoelia	3
Kalamatas	4
Koroneiki	5
Kato Dry	6
Kilis Yaglik	-
Arbequina	7
Picual	8
Korakou	9

A variedade Kilis Yaglik non forma parte do ensaio xa que non se dispón de extracto de ADN.

O deseño da placa é o seguinte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		3	3	3	4	4	4	5	5	5		
C		6	6	6	7	7	7	8	8	8		
D		9	9	9								1
E												1
F												1
G												
H												

Ilustración 9. Deseño da placa de qPCR.

Para cada variedade realizouse o ensaio por triplicado, e as variedades seguen a codificación empregada na Táboa 7. Cantidades e mostras empregadas en cada ensaio de qPCR.

As cantidades de DNA en cada ensaio (OEX1, 2 ou 3 atendendo á sonda empregada respectivamente) son as seguintes (a mostra ARA2 presentaba unha concentración tan baixa que se empregaron o máximo de µL, que son 9, pero cunha concentración inferior a 0.2ng/µL. Para cumprir esta concentración serían necesarios 13.09 µL):

Táboa 7. Cantidades e mostras empregadas en cada ensaio de qPCR.

Ensaio	Variedad	Cod. Placa	Código extracción	ADN medio total (ng/µL)	µL para 0.2 ng/µL
OEX 1 / OEX 3	Ladoelia	3	KYA2+KYF2	0.114	1.75
	Kalamatas	4	KAF1+KAF2	0.071	2.83
	Koroneiki	5	KOF4+KOF5	0.121	1.66
En OEX3 non se empregou Arbequina	Kato Dry	6	KDF2+KDF3	0.054	3.70
	Arbequina	7	ARA2	0.014	13.89
	Picual	8	PIA2-3	0.062	3.23
	Korakou	9	KOUA2+KOUF1	0.065	3.09
OEX 2	Ladoelia	3	KYA3	0.118	1.7
	Kalamatas	4	KAA1	0.0976	2
Para a repetición de OEX2 só se empregaron as variedades en azul.	Koroneiki	5	KOF6	0.17	1.2
	Kato Dry	6	KDF1	0.0813	2.5
	Arbequina	7	ARA3	0.0236	8.5
	Picual	8	PIA1	0.0946	2.1
	Korakou	9	KOUF2	0.0755	2.6

Táboa 8. Cantidade e concentración final empregadas da mostra ARA2.

	Como máx=9µL	
ARA2	µL	ng/µL
	9	0.1296

5. Resultados e discusión

5.2 Extracción e cuantificación de ADN total.

Tras levar a cabo o protocolo de extracción do material xenético das mostras, este cuantificouse mediante fluorescencia no Qubit dsDNA BR. En algúns casos, a cantidade de ADN era demasiado pequena para ser cuantificable, polo que o equipo mostraba o resultado de: sample out of range TOO LOW. Os resultados da cuantificación móstranse a continuación:

Táboa 9. Resultados da cuantificación.

Variedade	Código	Orixe	Proveedor	a (Cuantificacitra (Cuanti		ADN total (ng/µL)
Koroneiki	KOA1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0206
	KOA2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0148
	KOA3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KOF1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0204
	KOF2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0321
	KOF3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0235
Kato Dry	KDA1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KDA2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KDA3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KDF1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0813
	KDF2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0482
	KDF3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0599
Kalamatas	KAA1	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0976
	KAA2	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KAA3	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KAF1	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0646
	KAF2	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0765
	KAF3	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0128
Kypriaki	KYA1	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0099
	KYA2	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.1
	KYA3	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.118
	KYF1	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.0805
	KYF2	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.128
	KYF3	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	X
Koroneiki	KOA4	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KOA5	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KOA6	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	KOF4	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.104
	KOF5	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.137
	KOF6	Chipre	Atsas Farm	21/02/2024	20	0.17
Arbequina	ARA1	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	ARA2	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.0144
	ARA3	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.0236
Picual	PIA1	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0,0946
	PIA2	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.0724
	PIA3	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.0513
Korakou	KOUA1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0305
	KOUA2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0547
	KOUA3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0365
	KOUF1	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0749
	KOUF2	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0755
	KOUF3	Chipre	Aparthenasa	21/02/2024	20	0.0491
Aceite	AC1	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	AC2	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
	AC3	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	Sample Out of Range TOO LOW
Pasta	PA1	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.881
	PA2	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.577
	PA3	España	Aceites Abril	21/02/2024	20	0.821
Kilis Yaglik	KKA1	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	3.43
	KKA2	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	4.54
	KKA3	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	12,9
	KKF1	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	0.744
	KKF2	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	0.811
	KKF3	Turquía	Global Organic Ltd.	21/02/2024	20	0.38

Os resultados de cuantificación de Kilis Yaglik foron cedidos por Carla Teixeira (INL).

5.2 Identificación morfolóxica.

Para a identificación e a autentificación, empregáronse mostras dos endocarpos das olivas, e os resultados obtidos mostran que unha das variedades identificada como *Kipriaki*, en realidade correspóndese coa variedade internacionalmente coñecida como *Ladoelia*, e que ambos nomes en realidade son sinónimos. No caso dunha das mostras clasificada como *Korakou* (código 6) sí que se identificou unha incorrecta asignación, identificando a mesma como unha segunda mostra da variedade *Ladoelia*.

Táboa 10. Resultados da identificación morfolóxica.

Familia	Xénero	Especie	Cultivar / mostra	Nome científico	Orixe	Código extracción	Código secuenciación
Oleaceae	Olea	Olea europaea L.	Ladoelia	*Olea europaea* var. 'Ladoelia'	Chipre (Atsas Farm)	KY	1
Oleaceae	Olea	Olea europaea L.	Ladoelia	*Olea europaea* var. 'Ladoelia'	Chipre (Aparthenasa)	KOU	6

5.3 Identificación das rexións xenéticas a estudar

As rexións xenómicas seleccionadas para a búsqueda de SNPs, son os xenes *Cycloatenol synthase* (OEX) e *Lupeol synthase* (OEW). Estes son os dous dos xenes máis ampliamente estudados no olivo, e a súa secuencia está dispoñible en bases de datos para algunhas variedades.

Además, atópase reportada evidencia previa da presenza de SNPs nos mesmos que pemiten discernir entre variedades(4), por isto, ambos xenes foron os escollidos para levar a cabo o estudo de caracterización xénica das variedades, identificando diferenzas alélicas entre as mesmas dentro deles.

5.4 Amplificación mediante PCR e secuenciación.

Certas rexións dos xenes Cycloatenol synthase (OEX) e Lupeol synthase (OEW) foron amplificados mediante end-point PCR. Os primers empregados detállanse no punto: 4.5 Amplificación mediante PCR e secuenciación.

No caso do OEX (*Cycloartenol Synthase*), tomouse como referencia o traballo de (4) tanto para a elección dos primers como para o protocolo de PCR a seguir. As condicións de PCR, así como a información sobre as mostras empregadas móstranse a continuación:

Sample		Stock name & ng/uL		For 5 ng
Kypriaki	CY01	CYL01 2	1.64	3
Kalamatas	CY02	CYL02 1	1.94	2.6
Koroneiki	CY03	CYL03 1	6.24	0.8
Sia Koroneiki	CY04	CYL04 2	4.03	1.2
Vavatsinia Koroneiki	CY05	CYL05 2	2.69	1.9
Vavatsinia Korakou	CY06	CYL06 1	13.5	0.4
Vavatsinia Kato Dry	CY07	CYL07 3	8.07	0.6
Kilis Yaglik	TR01	TRL01 2	0.811	6.2

PCR program				
Step		T (°C)	Time	Cycles
Initial Denaturation		95	4 min	
Amplification	Denaturation	95	30s	40
	Annealing	57	30s	
	Extension	72	1 min	
Final Extension		72	6 min	

Ilustración 11. Condicións PCR xene OEX.

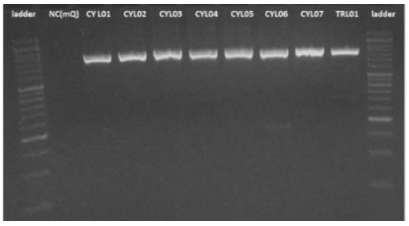


Ilustración 10. Xel de electroforese OEX.

Por último, a concentración das mostras que se enviarán a secuenciar determinouse por fluorescencia mediante Qubit dsDNA BR, obtendo concentracións comprendidas entre os 38 e os 65 ng/µL.

No caso do xene OEW (Lupeol Synthase), tomouse como referencia tanto para a elección dos primers como para o protocolo de PCR a seguir o traballo de (3). :

Sample		Stock name & ng/uL		For 5 ng
Kypriaki	CY01	CYL01 2	1,64	3
Kalamatas	CY02	CYL02 1	1,94	2,6
Koroneiki	CY03	CYL03 1	6,24	0,8
Sia Koroneiki	CY04	CYL04 2	4,03	1,2
Vavatsinia Koroneiki	CY05	CYL05 2	2,69	1,9
Vavatsinia Korakou	CY06	CYL06 1	13,5	0,4
Vavatsinia Kato Dry	CY07	CYL07 3	8,07	0,6
Kilis Yaglik	TR01	TRL01 2	0,811	6,2

PCR program				
Step		T (°C)	Time	Cycles
Initial Denaturation		95	10 min	
Amplification	Denaturation	95	30 s	45
	Annealing	60	30 s	
	Extension	72	30 s	
Final Extension		72	10 min	

Ilustración 12. Condicións de PCR para OEW.

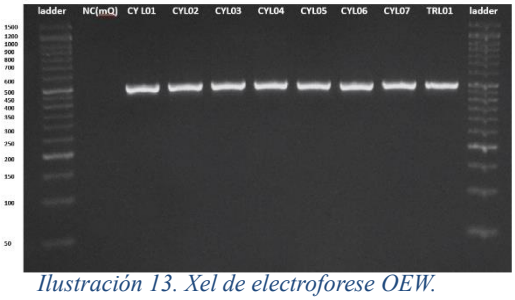


Ilustración 13. Xel de electroforese OEW.

A concentración das mostras que se enviarán atópanse entre os 22 e os 33 ng/µL.

Finalmente enviáronse a secuenciar un total de 16 mostras de 8 variedades, é dicir, cada variedade amplificouse cos dous sets de primers: Cyc1-755bp e Lup2-504bp. Enviáronse 14 µl de cada mostra e 10 µl de cada primer.

As mostras secuenciadas móstranse na seguinte táboa:

Táboa 11. Mostras amplificadas e secuenciadas.

Especie	Cultivar / mostra	Nome científico	Orixe	Código extracción	Código secuenciación
Olea europaea L.	Ladoelia	*Olea europaea* var. 'Ladoelia'	Chipre (Atsas Farm)	KY	W1_CS_extraction
Olea europaea L.	Kalamatas	*Olea europaea* var. ' Kalamatas '	Chipre (Atsas Farm)	KA	W2_CS_extraction
Olea europaea L.	Koroneiki	*Olea europaea* var. ' Koroneiki'	Chipre (Atsas Farm)	KO 4-5	W3_CS_extraction
Olea europaea L.	Koroneiki	*Olea europaea* var. ' Koroneiki'	Chipre, Sia (Aparthenasa)	KO 1-3	W4_CS_extraction
Olea europaea L.	Koroneiki	*Olea europaea* var. ' Koroneiki'	Chipre, Vavarsinia (Aparthenasa)	KO 6-9	W5_CS_extraction
Olea europaea L.	Ladoelia	*Olea europaea* var. 'Ladoelia'	Chipre (Aparthenasa)	KOU	W6_CS_extraction
Olea europaea L.	Kato Dry	*Olea europaea* var. ' Kato Dry'	Chipre (Aparthenasa)	KD	W7_CS_extraction
Olea europaea L.	Kilis Yaglik	*Olea europaea* var. 'Kilis Yaglik'	Turquía	KK	W8_CS_extraction

5.5 Análise bioinformático

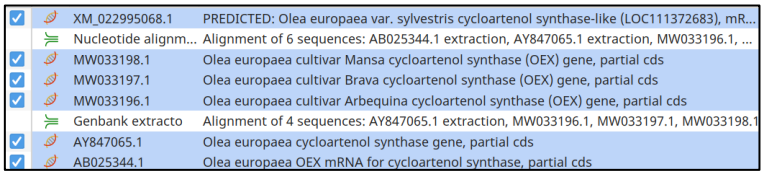
5.5.1 Edición das secuencias, obtención da secuencia consenso, e búsqueda en bases de datos.

Tras cargar as secuencias no software Geneious Prime (Geneious Prime® 2024.0.7), editalas para eliminar asignacións erróneas de nucleótidos, e aliñar as secuencias Forward

e Reverse de cada unha das variedades, obtivéronse as secuencias consenso de cada variedade. Por último procédese á realización de un blastn con cada unha delas, así como á búsqueda en NCBI de secuencias dos xenes de interese en diferentes variedades.

Os resultados das búsquedas (realizadas en Maio de 2024) foron os mostrados nas seguintes ilustracións:

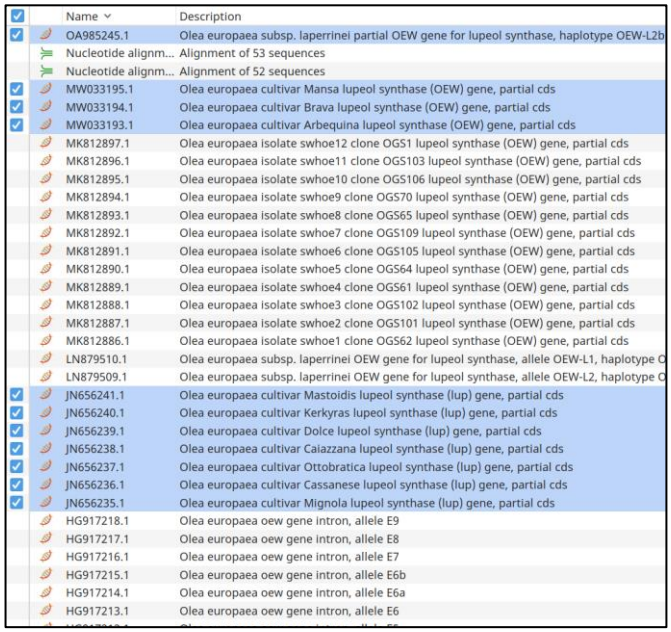
Para o xene OEX atopáronse un total 8 secuencias:



☑	XM_022995068.1	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris cycloartenol synthase-like (LOC111372683), mR...
	Nucleotide alignm...	Alignment of 6 sequences: AB025344.1 extraction, AY847065.1 extraction, MW033196.1, ...
☑	MW033198.1	Olea europaea cultivar Mansa cycloartenol synthase (OEX) gene, partial cds
☑	MW033197.1	Olea europaea cultivar Brava cycloartenol synthase (OEX) gene, partial cds
☑	MW033196.1	Olea europaea cultivar Arbequina cycloartenol synthase (OEX) gene, partial cds
	Genbank extracto	Alignment of 4 sequences: AY847065.1 extraction, MW033196.1, MW033197.1, MW033198.1
☑	AY847065.1	Olea europaea cycloartenol synthase gene, partial cds
☑	AB025344.1	Olea europaea OEX mRNA for cycloartenol synthase, partial cds

Ilustración 14. Secuencias de OEX recollidas en bases de datos. Imaxe de Geneious Prime.

Para o xene OEW atopáronse un total de 53 secuencias (as marcadas en azul corresponden con secuencias de diferentes variedades, o resto corresponden con clons ou intróns de alelos).



	Name	Description
☑	OA985245.1	Olea europaea subsp. laperrinei partial OEW gene for lupeol synthase, haplotype OEW-L2b
	Nucleotide alignm...	Alignment of 53 sequences
	Nucleotide alignm...	Alignment of 52 sequences
☑	MW033195.1	Olea europaea cultivar Mansa lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
☑	MW033194.1	Olea europaea cultivar Brava lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
☑	MW033193.1	Olea europaea cultivar Arbequina lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812897.1	Olea europaea isolate swhoe12 clone OGS1 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812896.1	Olea europaea isolate swhoe11 clone OGS103 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812895.1	Olea europaea isolate swhoe10 clone OGS106 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812894.1	Olea europaea isolate swhoe9 clone OGS70 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812893.1	Olea europaea isolate swhoe8 clone OGS65 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812892.1	Olea europaea isolate swhoe7 clone OGS109 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812891.1	Olea europaea isolate swhoe6 clone OGS105 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812890.1	Olea europaea isolate swhoe5 clone OGS64 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812889.1	Olea europaea isolate swhoe4 clone OGS61 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812888.1	Olea europaea isolate swhoe3 clone OGS102 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812887.1	Olea europaea isolate swhoe2 clone OGS101 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	MK812886.1	Olea europaea isolate swhoe1 clone OGS62 lupeol synthase (OEW) gene, partial cds
	LN879510.1	Olea europaea subsp. laperrinei OEW gene for lupeol synthase, allele OEW-L1, haplotype O
	LN879509.1	Olea europaea subsp. laperrinei OEW gene for lupeol synthase, allele OEW-L2, haplotype O
☑	JN656241.1	Olea europaea cultivar Mastoidis lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656240.1	Olea europaea cultivar Kerkyras lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656239.1	Olea europaea cultivar Dolce lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656238.1	Olea europaea cultivar Caiazzana lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656237.1	Olea europaea cultivar Ottobratica lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656236.1	Olea europaea cultivar Cassanese lupeol synthase (lup) gene, partial cds
☑	JN656235.1	Olea europaea cultivar Mignola lupeol synthase (lup) gene, partial cds
	HG917218.1	Olea europaea oew gene intron, allele E9
	HG917217.1	Olea europaea oew gene intron, allele E8
	HG917216.1	Olea europaea oew gene intron, allele E7
	HG917215.1	Olea europaea oew gene intron, allele E6b
	HG917214.1	Olea europaea oew gene intron, allele E6a
	HG917213.1	Olea europaea oew gene intron, allele E6

Ilustración 15. Secuencias de OEW recollidas en bases de datos. Imaxe de Geneious Prime.

Unha vez obtidas estas secuencias, realízanse os aliñamentos tanto das secuencias propias por separado para a identificacion de SNPs que permitan o deseño das sondas para a posterior qPCR, pero tamén se aliñan todas as mostras xuntas para obter máis información sobre a presenza de variacións nucleotídicas.

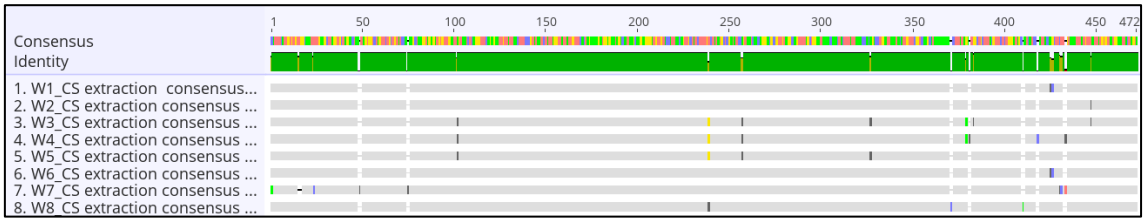


Ilustración 16. Aliñamento das secuencias propias de OEW. Imaxe de Geneious Prime.

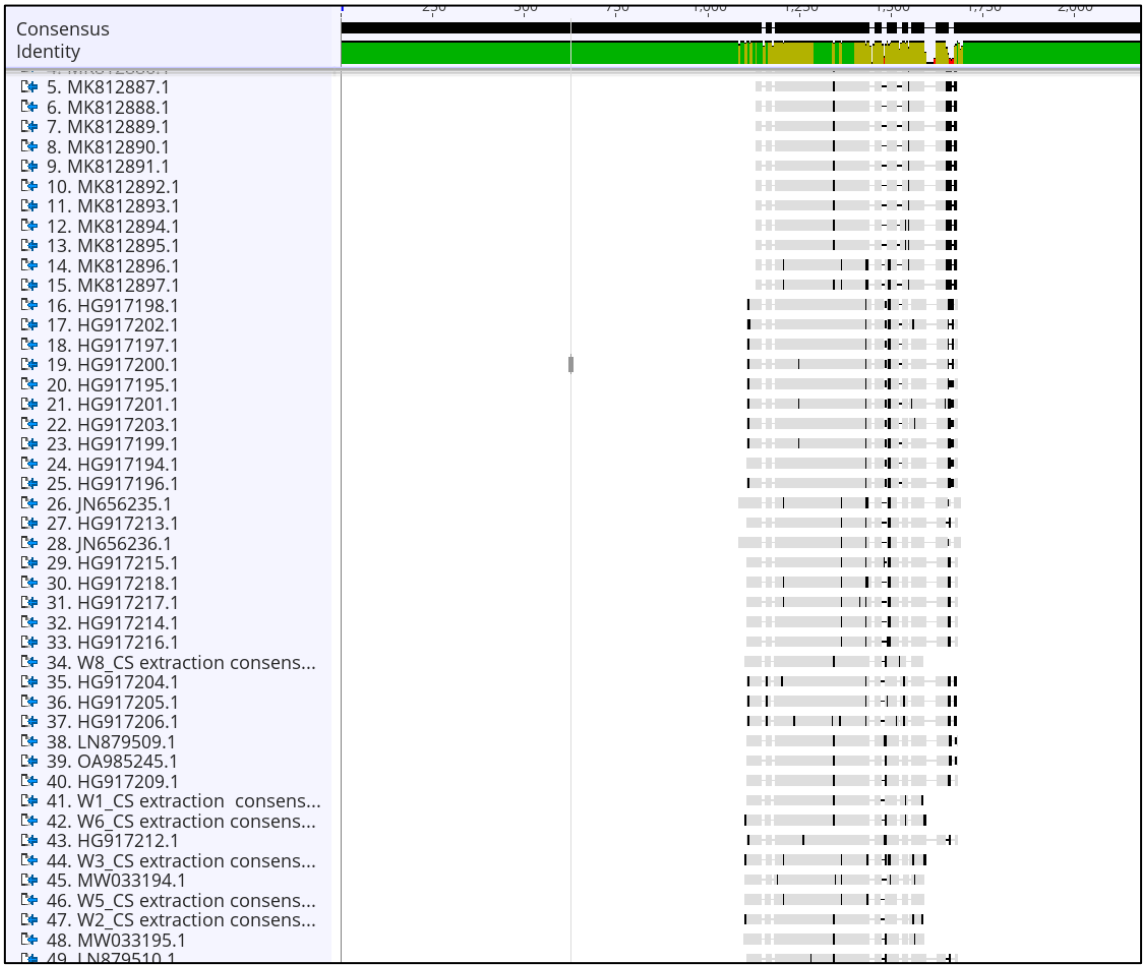


*Ilustración 17. Aliñamento de todas as secuencias do mesmo xene.*Imaxe de Geneious Prime

5.5.2 Búsqueda de SNPs

Unha vez realizados os aliñamentos identifícanse os SNPs para determinar aqueles que permiten diseñar sondas de interese para diferenciar entre o maior número de variedades posibles.

Os SNPs identificados en cada caso son os que se mostran a continuación:

- **No caso do xene *Cicloartenol sintase (OEX)***

Táboa 12. SNPs identificados para cada variedade no xene Cicloartenol sintase

Xene OEX	***SNP1***	***SNP2***	***SNP3***	***SNP4***	***SNP5***	***SNP6***	**Nº SNP**
	C→Y	T→Y	M	T→K	A→M	A→M	**Bases**
	67	318	339	429	446	466	**Posición**
X1: Ladoelia							
X2: Kalamatas	+		+				
X6: Ladoelia				+			
X7: Kato Dry							
X8: Kilis Yaglik		+	+		+	+	

No caso da variedade Koroneiki, a identificación dos SNPs tivo que realizarse por separado pola elevada heteroxeneidade da mesma. Como presenta unha gran cantidade de SNPs, estes xa se seleccionaron segundo a súa idoneidade para o deseño de sondas (é dicir, en lugar de escoller SNPs illados, o cal non foi posible porque non existían rexións con máis de 20pb onde só existira variación nun nucleótido), escolléronse rexións onde houbera varios SNPs próximos.

Táboa 13. Rexións candidatas de sondas para a identificación da var. Koroneiki cos SNPs marcados en amarelo.

Xene OEX	**Sonda 1 130-150 pb**	**Sonda 2 200-228 pb**	**Sonda 3 340-360 pb**	**Sonda 4 444-467 pb**
Olea europaea	GCGATTGTATGATGC TGTTAA	TTGTAATACATTACA TTGTGATGTTTCCA	TTGCTGTAGCATCGT TTGAAT	TATTGGAAAAAGATGG CTCCATTT
Var. Koroneiki	GCGATTGTAYGATGCT GTTAA	TTGWMATACATTACW TTGTGATGYTTCCA	TTGCTGKMGCAWAST TTGAAT	TATTGGACAAAGATRGC TCCCTTT

- **No caso do xene Lupeol sintase (OEW):**

Táboa 14. SNPs identificados para cada variedade no xene Lupeol sintase.

Xene OEW	***SNP1***	***SNP2***	***SNP3***	***SNP4***	***SNP5***	***SNP6***	***SNP7***	***SNP8***	***SNP9***	***SNP10***	**Nº SNP**
	ins C	T→Y	A→G	T→K	T→Y	Ins C	G→T	TG→BC	CA→NC	A→W	**Bases**
	75	103	239	257	327	371	379	425	430	447	**Posición**
W1: Ladoelia								+			
W2: Kalamatas										+	
W3: Koroneiki			+	+	+		+			+	
W4: Koroneiki		+	+	+	+		+				
W5: Koroneiki		+	+	+	+						
W6: Ladoelia								+			
W7: Kato Dry	+								+		
W8: Kilis Yaglik						+					

O SNP1 a pesar de aparecer no alineamento de todas as secuencias, analizando o cromatograma da variedade *Kato Dry* esta ten moi mala calidade, polo que non se ten en consideración (por eso se mostra en vermello). O cromatograma correspondente móstrase a continuación:

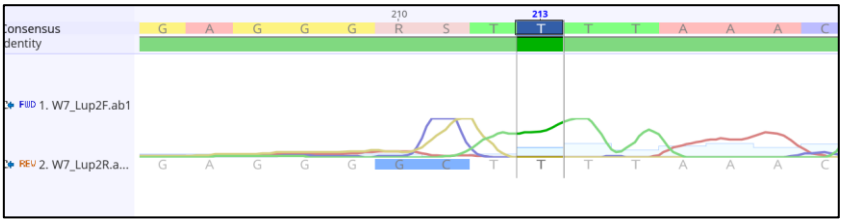


Ilustración 18. Cromatograma de secuenciación correspondiente co SNP1 (variedade Kato Dry). Imaxe de Geneious Prime.

O mesmo ocorre co SNP9. Observando o aliñamento podemos ver que se diferencia un SNP, pero no cromatograma pódese ver que hai fallos na secuenciación. É dicir, non é fiable o aliñamento neste punto, dado que a secuenciación non é correcta, polo que un SNP nesta zona da secuencia pode non identificar correctamente a variedade.

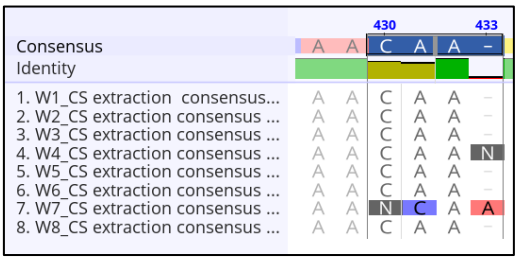


Ilustración 19. Aliñamento do SNP9. Imaxe de Geneious Prime.

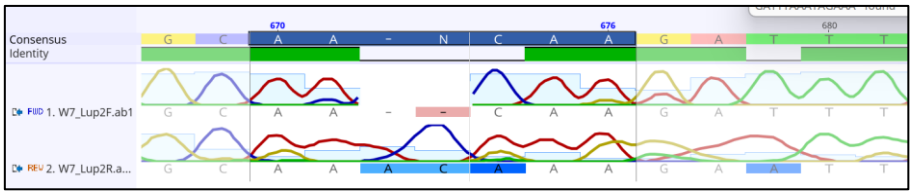


Ilustración 20. Cromatograma correspondente co SNP9 (variedade Kato Dry). Imaxe de Geneious Prime.

5.5.3 Deseño de ensaios para qPCR

Para o deseño dos ensaios foi necesario identificar as secuencias obxectivo cos sitios diana específicos marcados (SNPs), editar as mesmas de xeito que cumplan os criterios establecidos para o deseño exitoso das sondas, e cargar as secuencias na ferramenta de deseño de ensaios Taqman de ThermoFisher.

Finalmente, as secuencias envíanse para o deseño dos ensaios.

As secuencias identificadas para a realización dos ensaios no caso do xene OEX son as seguintes:

Táboa 15. Resumo das sondas empregada sos ensaios.

	Sonda 1	***Sonda 2***	***Sonda 3***		**Sonda 4**
Xene OEX	*SNP1*	*SNP3*	*SNP5*	*SNP6*	Sonda 4
	C→Y	M	A→M	A→M	A/G/A→C/R/C
	67	339	446	466	444-467
Variedade	*Kalamatas*	*Kalamatas + Kilis Yaglik*	*Kilis Yaglik*		*Koroneiki*

- A **primeira sonda** diseñada contén o SNP1, polo que permite a identificación de *Kalamatas*. A secuencia editada atópase na Ilustración 38. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 1: identificación de Kalamatas.

Táboa 16. Resultados do ensaio da sonda 1.

UNIV SANTIAGO DE COMPOSTELA 8356801 16-jul-24 4332077 Custom Taqman(R) SNP Genotyping Assay Service 96-position tube rack v1 2216165 10-digit barcoded tube 3568086678 B01 40x					
OEX1_F	CTCTTCTTTCTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGC	36			
OEX1_R	CATCCAGTGGTTCACCAACAATT	36			
OEX1_V	VIC	AACTTTGATAATAAGAGAACC	8	NFQ	
OEX1_M	FAM	ACTTTGATAATAAAAGAACC	8	NFQ	

- **A segunda sonda** diseñada contén o SNP 3, polo que permite diferenciar *Kalamatas* e *Kilis Yaglik.* A secuencia editada atópase na Ilustración 39. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 2: identificación de Kalamatas e Kilis Yaglik.

Táboa 17. Resultados do ensaio da sonda 2.

UNIV SANTIAGO DE COMPOSTELA 8356801 11-JUL-24 4332077 Custom Taqman(R) SNP Genotyping Assay Service AN7ECWZ_; 96-position tube rack v1 2216165 10-digit barcoded tube 3568086678 B01 40x					
OEX1_F	TCTCTTAACTTCCTGGATTTTGTTGCT	36			
OEX1_R	GACTCTCAATTCACCTATCATTTTCTGCTA	36			
OEX1_V	VIC	AGCATTCAAACGATGCTAC	8	NFQ	
OEX1_M	FAM	AAGCATTCAAACTATGCTAC	8	NFQ	

- A **terceira sonda** diseñada contén o SNP 5 e o 6, polo que permite diferenciar *Kilis Yaglik.* A secuencia editada atópase na Ilustración 40. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 3: identificación de Kilis Yaglik.

Táboa 18. Resultados do ensaio da sonda 3.

UNIV SANTIAGO DE COMPOSTELA 8356801 11-JUL-24 4332077 Custom Taqman(R) SNP Genotyping Assay Service AN7ECWZ_; 96-position tube rack v1 2216165 10-digit barcoded tube 3568086678 B01 40x					
OEX1_F	GTCTTGAGACGTGTTAGATTGAAAGGAT	36			
OEX1_R	ATTGTCCTTGACTTAAAATTCTTCCAAAGC	36			
OEX1_V	VIC	ATGGCTCCATTTCATG	8	NFQ	
OEX1_M	FAM	ATGGCTCCCTTTCATG	8	NFQ	

- A **cuarta sonda** corresponde coa sonda 4 identificada para diferenciar *Koroneiki*. Esta última sonda non pasou os controis de calidade, seguramente por exceso de nucleótidos dexenerados, polo que non foi posible a obtención dun método para a mesma para a realización da qPCR. A secuencia editada atópase na *Ilustración 41. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 4: identificación de Koroneiki.*

5.6 Ensaio de xenotipado mediante qPCR TaqMan.

Para a realización da qPCR foi necesario identificar SNPs dentro das secuencias que permitan discernir entre variedades, e con eles realizar o deseño dun ensaio de qPCR mediante a ferramenta de deseño de ensaios personalizados TaqMan™ de ThermoFisher.

Esta ferramenta permite solicitar ensaios de xenotipificación de SNPs, xerando, a partir da secuencia ingresada (a cal debe estar editada para cumprir cos criterios establecidos), dous primers e dúas sondas que permiten levar a cabo a identificación dos SNPs mediante a qPCR.

Os resultados das sondas creadas para o xene Cicloartenol sintase (OEX) móstranse a continuación), pero para a correcta interpretación das curvas de amplificación, compre ter en conta que:

- Un gráfico de amplificación mostra a variación do logaritmo (ΔRn) co número de ciclo de PCR
- Rn é a señal indicadora de fluorescencia normalizada segundo a señal de fluorescencia do colorante de referencia pasiva (ROX), é dicir, é a fluorescencia do colorante indicador dividida pola fluorescencia de ROX. Rn emprégase para o cálculo de ΔRn (Rn menos a liña base), que se representa en comparación co número de ciclo de PCR na gráfica.
- Cq, parámetro coñecido como umbral de ciclo, corresponde coa intersección entre a curva de amplificación e a liña umbral ou threshold, e permite obter unha medición relativa da concentración do xen obxectivo. É dicir, indica o ciclo a partir do cal comeza a detectarse a fluorescencia por riba do ruído de fondo. Valores de Cq máis baixos supoñen maiores cantidades de material xenético.

Para o ensaio OEX1:

O ensaio OEX1 deseñouse a partir do SNP identificado como SNP1 do xen OEX (Clicloartenol sintase), o cal corresponde coa presenza dun nucleótido dexenerado (Y, que corresponde con C ou T) na variedade *Kalamatas*, e de C no resto de variedades. Atopamos o seguinte aliñamento:

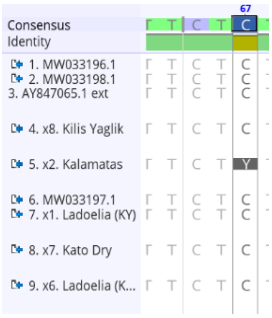
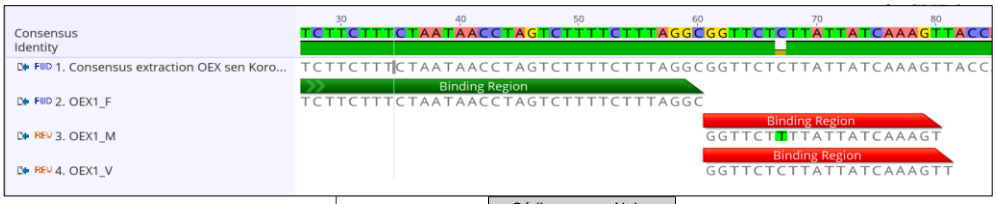


Ilustración 21. Aliñamento

Polo tanto, o deseño da sonda realizouse da seguinte maneira:



	Código	Alelo
Allele1	OEX2_V	C
Allele2	OEX2_M	T

Ilustración 22. Información da sonda OEX1.

Na sonda OEX1_V, o alelo wild type, que contén unha citosina, marcouse co colorante VIC, mentras que na sonda OEX1_M o alelo mutante, o SNP, que correspondería cunha timina, marcouse co colorante FAM.

Ao observar os aliñamentos realizados polo software Geneious Prime, dos resultados da qPCR espérase que con esta sonda que todas as variedades excepto *Kalamatas* presenten un xenotipo homocigoto para a sonda marcada con VIC (alelo 1), e que a variedade *Kalamatas* presente un xenotipo heterocigoto.

Analizando os cromatogramas extraídos da secuenciación, obsérvase que en todas as variedades existe certo grado de heterocigosidade, pero que *Kalamatas* é a única variedade na que o software Geneious Prime asigna un nucleótido dexenerado á secuencia consenso, porque a calidade das bases é baixa , o cal podemos ver mediante o esquema de cores **Base Call Quality** que asigna un tono de azul a cada base en función da súa calidade. Deste xeito: azul oscuro para unha confianza < 20, azul para 20 - 40 e azul claro para > 40.

Polo tanto, atendendo á calidade das lecturas, parece ser que *Kalamatas* é a única variedade na que a priori existe heterocigosidade, aínda que no resto de cromatogramas tamén se poden ver dúas liñas (Anexo: Ilustración 42).

Do resultado da qPCR podemos ver que todas as mostras son homocigotas para o alelo 1 de acordo á asignación establecida polo software, o cal avalía a confianza da amplificación para ambos alelos.

Táboa 19. Resultados da qPCR de OEX1.

Sample	Well	Sample	Target	Dyes	Cq	Cq Conf	Amp Score	Amp Status	Confidence	Allele 1	Allele 2	Call
Ladoelia KY	B2	3	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	35.12	0.46		Inconclusive	0.97009201	0.42093605	0.20138514	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B2		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	38.14	0.78	1.02	Amp				
	B3		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.34668851	0.10090721	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B3		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	37.60	0.67	0.95	Amp				
	B4		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	1	0.29168856	0.10969603	NO_AMPLIFICATION
	B4		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	37.91	0.58	0.91	Amp				
Kalamatas KA	B5	4	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.91281796	0.11540556	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B5		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.33	0.86	1.25	Amp				
	B6		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	34.18	0.27	0.45	Inconclusive	0.97861865	0.90838802	0.10900998	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B6		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.51	0.88	1.25	Amp				
	B7		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	35.84	0.22		Inconclusive	0.97861865	0.86492628	0.11780179	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B7		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.80	0.87	1.20	Amp				
Koroneiki KO	B8	5	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	34.14	0.19		Inconclusive	0.97861865	0.68259549	0.11199462	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B8		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	37.02	0.83	1.17	Amp				
	B9		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.67940497	0.12700605	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B9		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	37.09	0.82	1.17	Amp				
	B10		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.63977635	0.11969709	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B10		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.35	0.81	1.16	Amp				
Kato Dry KD	C2	6	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	33.43	0.30	0.35	Inconclusive	0.97861865	0.83572572	0.11409914	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C2		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.13	0.88	1.22	Amp				
	C3		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	32.75	0.40		Inconclusive	0.97861865	0.9407289	0.1105082	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C3		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	34.80	0.89	1.24	Amp				
	C4		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	33.43	0.34		Inconclusive	0.97861865	1.03133333	0.12093639	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C4		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	34.67	0.89	1.25	Amp				
Arbequina	C5	7	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.57894307	0.10549843	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C5		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	36.05	0.85	1.13	Amp				
	C6		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.54049033	0.10890603	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C6		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	36.56	0.84	1.12	Amp				
	C7		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.60348946	0.10799277	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C7		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.78	0.84	1.13	Amp				
Picual PI	C8	8	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.50113946	0.12572908	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C8		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.65	0.77	1.11	Amp				
	C9		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.36430824	0.11516273	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C9		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	38.20	0.61	0.99	Amp				
	C10		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.94888611	0.50982338	0.27987742	UNDETERMINED
	C10		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.92	0.77	1.06	Amp				
Ladoelia KOU	D2	9	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.73024523	0.11730778	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D2		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	36.77	0.86	1.17	Amp				
	D3		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	34.45	0.23		Inconclusive	0.97861865	0.83623552	0.12734008	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D3		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.54	0.86	1.19	Amp				
	D4		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0.00		No Amp	0.97861865	0.72955334	0.11572695	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D4		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	35.73	0.84	1.18	Amp				
Blanco	D12	1	OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp	1	0.03424698	0.08199954	NO_AMPLIFICATION
	D12		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp				
	E12		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp	1	0.05952871	0.11534262	NO_AMPLIFICATION
	E12		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp				
	F12		OEX1-OEX1_M	FAM-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp	1	0.06443059	0.11185026	NO_AMPLIFICATION
	F12		OEX1-OEX1_V	VIC-NFQ-MGB	Undetermined	0		No Amp				

Pero se pasamos a observar as curvas de amplificación, observamos que:

Na variedade *Kalamatas* existe amplificación tardía do alelo 2, polo que parece que sí que hai certa heterocigosidade aínda que o alelo predominante é o alelo 1.

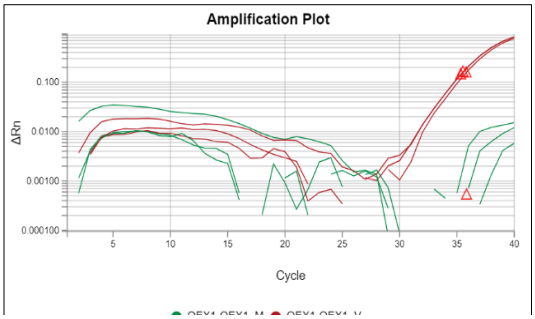


Ilustración 23. OEX1: curva de amplificación de Kalamatas.

Na variedade *Ladoelia*, na mostra 1 pódese inferir certa amplificación tardía do alelo 2, pero na mostra 9 non, polo que non se pode afirmar a heterocigosidade do xenoma desta variedade neste SNP.

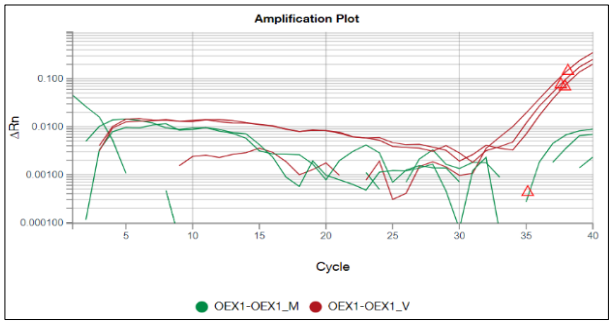


Ilustración 25. OEX1: Curva de amplificación de Ladoelia (KY)

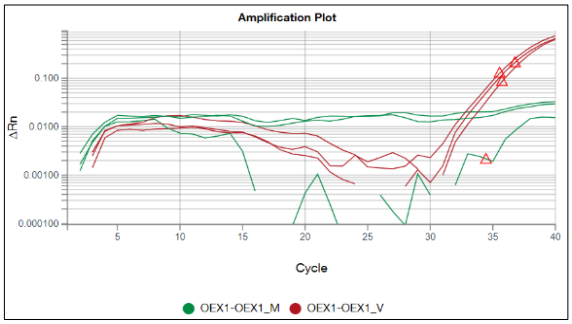
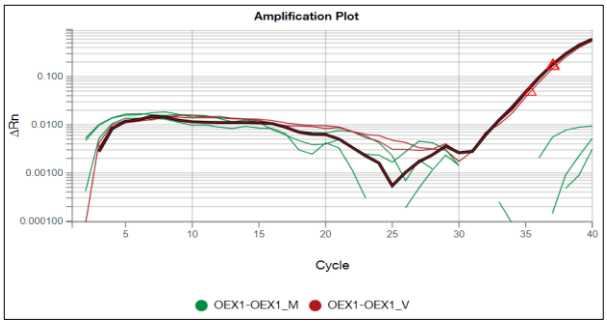


Ilustración 24. OEX1: Curva de amplificación de Ladoelia (KOU)

En *Koroneiki* (imaxe dereita), e en *Kato Dry* (imaxe esquerda) tamén se pode observar amplificación tardía que indica certo grado de heterocigosidade.



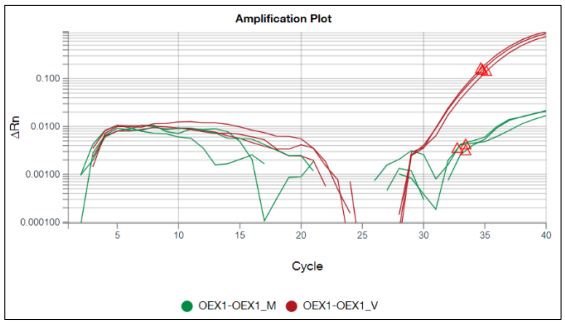


Ilustración 26. OEX1: Curvas de amplificación de Koroneiki e Kato Dry.

Por outra banda, nas variedades *Arbequina* e *Picual* está clara o xenotipo homocigótico do alelo 1, como se mostra na seguinte curva de amplificación:

Polo tanto, esta sonda podería ser interesante para a identificación de variedades autóctonas (*Arbequina* e *Picual*), dado que ambas presentan homocigose para este alelo, fronte á heterocigosidade do resto de variedades estudadas.

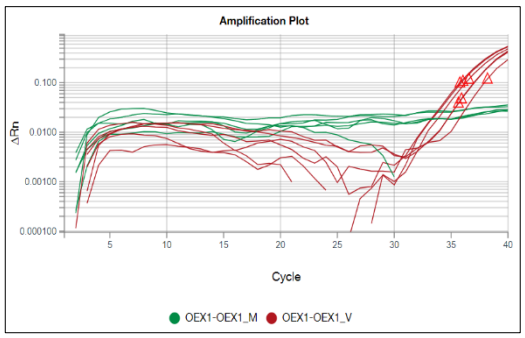


Ilustración 27. OEX1: Curvas de amplificación das variedades Arbequina e Picual.

Ensaio OEX2:

O ensaio OEX2 deseñouse a partir do SNP identificado como SNP3, que consta dun nucleótido dexenerado (M) en posición 339 no aliñamento na variedade *Kilis Yaglik* e *Kalamatas*. Este nucleótido dexenerado pode representar tanto a unha adenina (A) coma unha citosina (C). No resto das variedades nesa posición, segundo o software de secuenciación, existe unha citosina. Observamos o seguinte aliñamento:

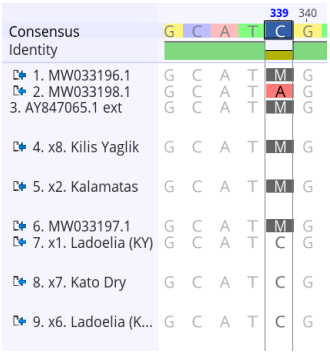
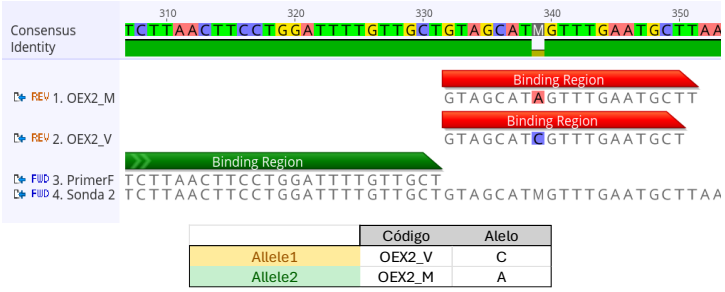


Ilustración 28. Aliñamento do SNP3.

Polo tanto, empréganse duas sondas TaqMan (unha cunha etiqueta de colorante VIC, que corresponde co alelo C (alelo 1): OEX_V, e outra cunha etiqueta de colorante FAM, que corresponde co alelo A (alelo 2): OEX_M. As sondas resultantes son as seguintes:



	Código	Alelo
Allele1	OEX2_V	C
Allele2	OEX2_M	A

Ilustración 29. Información da sonda OEX2.

Espérase que todas as mostras presenten un xenotipo homocigótico para a sonda 1, excepto *Kilis Yaglik* e *Kalamatas* cun xenotipo heterocigótico. Á marxe dese aliñamento, do análise dos cromatogramas, *Arbequina* e *Koroneiki* tamén parecen presentar certo xenotipo heterocigoto, a pesar de que no caso de *Koroneiki* o software asigne unha adenina (o que sería homocigoto para o alelo 2). Os aliñamentos e cromatogramas atópanse no Anexo: Ilustración 43.

A pesar da secuencia consenso ofrecida polo software de secuenciación, do análise dos cromatogramas extraemos que:

- A variedade *Ladoelia* e *Kato Dry* parecen presentar un segundo pico minoritario que pode representar certo grado de heterocigose.
- A variedade *Kalamatas* e *Kilis Yaglik* presentan claramente ambos alelos.

- A variedade *Koroneiki* parece presentar heterocigose en algúns cromatogramas.

Para confirmar estas hipóteses, realizouse a qPCR, e posteriormente unha repetición da mesma con algunha das variedades xa que os resultados non eran totalmente claros.

Os resultados de ambas qPCRs son os seguintes:

Táboa 20. Resultados das dúas qPCR de OEX2.

Well	Var	Sample	19/09/2024	23/09/2024	Conclusión	Corresponde coa hipótese
B2	Ladoelia KYA3	3	NO_AMPLIFICATION	HOMOZYGOUS_ALLELE1		
B3		3	HOMOZYGOUS_ALLELE1	HOMOZYGOUS_ALLELE1	Homocigótica VIC	Si
B4		3	HOMOZYGOUS_ALLELE1	HOMOZYGOUS_ALLELE1		
B5	Kalamatas KAA1	4	NO_AMPLIFICATION	HETEROZYGOUS		
B6		4	UNDETERMINED	HOMOZYGOUS_ALLELE2	Heterocigótica	Si
B7		4	NO_AMPLIFICATION	HETEROZYGOUS		
B8	Koroneiki KOF6	5	UNDETERMINED	HETEROZYGOUS		
B9		5	HETEROZYGOUS	HETEROZYGOUS	Heterocigótica	Si
B10		5	HOMOZYGOUS_ALLELE1	HETEROZYGOUS		
C2	Kato Dry KDF1	6	HOMOZYGOUS_ALLELE1			
C3		6	HOMOZYGOUS_ALLELE1		Homocigótica FAM	Si
C4		6	HOMOZYGOUS_ALLELE1			
C5	Arbequina ARA3	7	HETEROZYGOUS			
C6		7	HETEROZYGOUS		Heterocigótica	Si
C7		7	HETEROZYGOUS			
C8	Picual PIA1	8	HOMOZYGOUS_ALLELE2	HOMOZYGOUS_ALLELE2		
C9		8	HOMOZYGOUS_ALLELE2	HOMOZYGOUS_ALLELE2	Homocigótica FAM	Non hai
C10		8	HOMOZYGOUS_ALLELE2	HOMOZYGOUS_ALLELE2		
D2	Ladoelia KOUF2	9	HOMOZYGOUS_ALLELE1			
D3		9	HOMOZYGOUS_ALLELE1		Homocigótica VIC	Si
D4		9	HOMOZYGOUS_ALLELE1			
D12	Blanco	1	NO_AMPLIFICATION	UNDETERMINED		
E12		1	NO_AMPLIFICATION	UNDETERMINED		
F12		1	NO_AMPLIFICATION	UNDETERMINED		

Podemos ver que as hipóteses anteriormente plantexadas resultaron certas, confirmando a heterocigosidade das variedades, pero se analizamos as curvas de amplificación podemos ver que:

- As variedades *Ladoelia* (imaxe esquerda) e *Kato Dry* (imaxe dereita) presentan certa amplificación tardía do alelo 2 (marcado con FAM) con valores de Cq moi baixos (considéranse bos a partir de 0,8), polo que se descartan os mesmos asumindo que a amplificación non é fiable, e non se pode confiar en que os niveis de amplificación de esa sonda superen o valor umbral cun nivel de confianza do 95% (como está establecido polo software). A pesar disto, cabe destacar que non se pode descartar a amplificación de ambos alelos con extractos onde a concentración de ADN sexa maior.

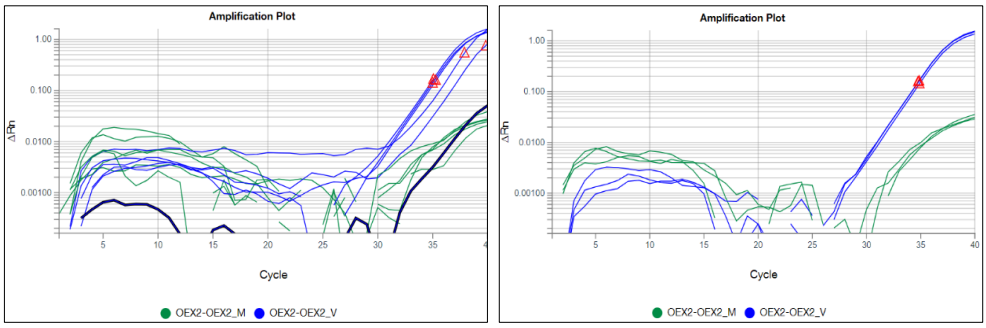
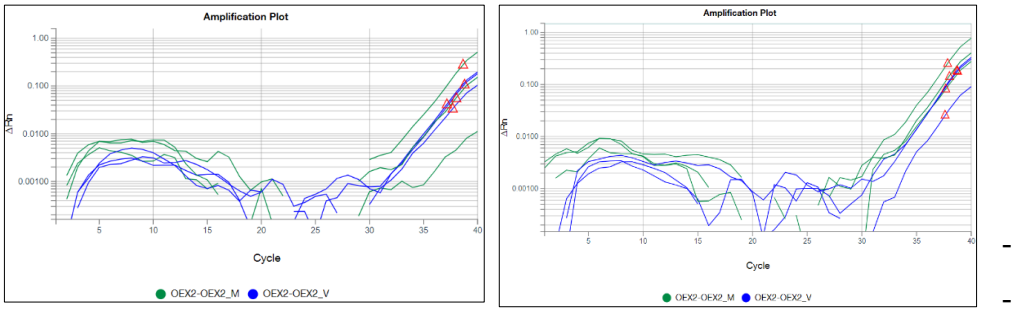


Ilustración 30. Curvas de amplificación de Ladoelia (dereita) e Kato Dry (esquerda)

- Na variedade *Kalamatas*, a pesar de que na primeira qPCR non estaba claro o xenotipo heterocigoto, na segunda confirmouse:



-
-

Ilustración 31. Curvas de amplificación da variedade Kalamatas.

Ensaio OEX3:

O ensaio OEX3 deseñouse a partir do SNP identificado como SNP5, que consta dun nucleótido dexenerado (M) en posición 446 no aliñamento na variedade Kilis Yaglik. Este nucleótido dexenerado pode representar tanto a unha adenina (A) coma unha citosina (C). No resto das variedades nesa posición, segundo o software de secuenciación, existe unha adenina. Observamos o seguinte aliñamento:

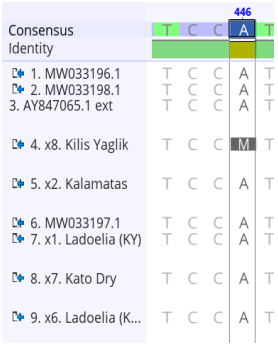
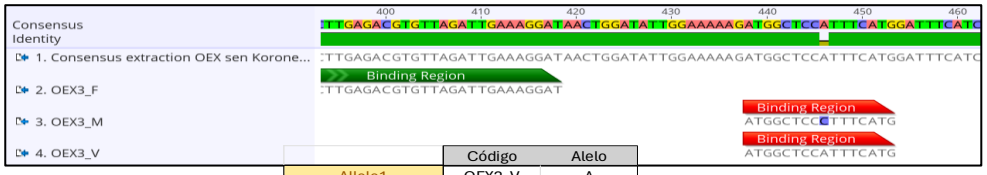


Ilustración 32. Aliñamento do SNP5.

Polo tanto, empréganse dúas sondas TaqMan: unha cunha etiqueta de colorante FAM, que corresponde co alelo C (alelo 2): OEX3_M, e outra cunha etiqueta de colorante VIC, que corresponde co alelo A (alelo 1):OEX3_V. As sondas resultantes son as seguintes:



	Código	Alelo
Allele1	OEX2_V	A
Allele2	OEX2_M	C

Ilustración 33. Información da sonda OEX3.

Espérase que todas as mostras empregadas na PCR presenten un xenotipo homocigótico do alelo marcado con VIC, xa que non se dispón de extracto para a realización de qPCR coa variedade *Kilis Yaglik*. Cabe destacar que a pesar de que a base nucleotídica establecida polo software de secuenciación é a adenina en todos os casos, no análise dos cromatogramas (adxuntos no Anexo: Ilustración 44) pódese observar un segundo pico minoritario que pode indicar que ese mesmo alelo tamén contén citosina pero en menor proporción.

O resultado da qPCR mostra que todos as variedades analizadas son homocigóticas para o alelo 1 marcado con VIC, como se observa na seguinte táboa:

Táboa 21. Resultado da qPCR de OEX3.

Variedad	Well	Sample	Target	Cq	Cq Conf	Amp Score	Call	Manual Call
Ladoelia KY	B2	3	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0	0.416071524	NO_AMPLIFICATION	HOMOZYGOUS_ALLELE1
			OEX3-OEX3_V	36.66798401	0.812128872	0.993040609		
	B3	3	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		NO_AMPLIFICATION	HOMOZYGOUS_ALLELE1
			OEX3-OEX3_V	36.55985641	0.724832425	0.926604116		
	B4	3	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		NO_AMPLIFICATION	HOMOZYGOUS_ALLELE1
			OEX3-OEX3_V	36.66113281	0.80893213	1.008319889		
Kalamatas KA	B5	4	OEX3-OEX3_M	34.09401321	0.641734461	0.706599456	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.03121185	0.958395224	1.459432883		
	B6	4	OEX3-OEX3_M	34.68365479	0.578855353	0.684206627	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.50636673	0.954037995	1.403397686		
	B7	4	OEX3-OEX3_M	34.91913986	0.573985175	0.693880984	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.51593018	0.957441802	1.407469255		
Koroneiki KO	B8	5	OEX3-OEX3_M	37.11247635	0.468629605	0.559251758	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	38.56668091	0.517651627	1.239684238		
	B9	5	OEX3-OEX3_M	35.65649414	0.438582536	0.596921195	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	37.64947128	0.931023189	1.277763991		
	B10	5	OEX3-OEX3_M	35.60169601	0.405574313	0.601047308	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	37.77116394	0.93341003	1.283843602		
Kato Dry KD	C2	6	OEX3-OEX3_M	34.01976776	0.626889598	0.680644075	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	34.50370026	0.965306621	1.407000292		
	C3	6	OEX3-OEX3_M	34.51060104	0.665407274	0.696380054	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	34.9261055	0.963395801	1.425778107		
	C4	6	OEX3-OEX3_M	33.94781113	0.574463699	0.679607936	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	34.37660217	0.964323332	1.434471325		
Picual PI	C8	8	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0	0.364764926	NO_AMPLIFICATION	
			OEX3-OEX3_V	36.07969284	0.796064726	0.978783666		
	C9	8	OEX3-OEX3_M	36.50582886	0.470119195	0.578012419	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	36.10411453	0.912308011	1.201239844		
	C10	8	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	36.50845718	0.859494287	1.12033936		
Ladoelia KOU	D2	9	OEX3-OEX3_M	35.32857132	0.67672945	0.639938002	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.68623734	0.955539341	1.335572241		
	D3	9	OEX3-OEX3_M	35.04647827	0.648437198	0.665389812	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.50495529	0.956629059	1.361047024		
	D4	9	OEX3-OEX3_M	34.17594528	0.54560614	0.654146154	HOMOZYGOUS_ALLELE1	
			OEX3-OEX3_V	35.48098373	0.957481964	1.37548384		
Blanco	D12	1	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		NO_AMPLIFICATION	
			OEX3-OEX3_V	Undetermined	0			
	E12	1	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		NO_AMPLIFICATION	
			OEX3-OEX3_V	Undetermined	0			
	F12	1	OEX3-OEX3_M	Undetermined	0		NO_AMPLIFICATION	
			OEX3-OEX3_V	Undetermined	0			

A pesar disto, no análise das curvas de amplificación pódese observar certa amplificación tardía non significativa da sonda marcada con FAM (alelo 2), o cal se pode explicar pola presenza de picos secundarios de menor intensidade correspondentes con este alelo.

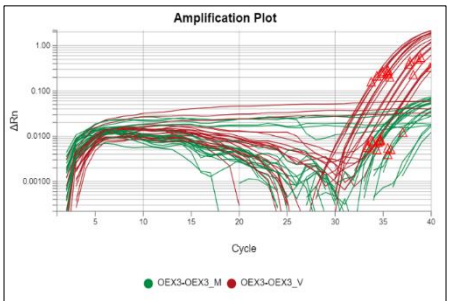


Ilustración 34. Curvas de amplificación de OEX3.

En todos os casos das curvas de amplificación da sonda marcada con FAM (OEX3_M), os valores de Cq Conf, que reflexan a fiabilidade do Cq (ciclo de PCR no que a curva de amplificación intersecta coa liña umbral, e indica cantos ciclos foron necesarios para a obtención de amplificación nas mostras), son moi baixos (considéranse bos a partir de 0,8, segundo a documentación de soporte de ThermoFisher), polo que se descartan os mesmos asumindo que a amplificación non é fiable, e non se pode confiar en que os niveis de amplificación de esa sonda superen o valor umbral cun nivel de confianza do 95% (como está establecido polo software). O mesmo ocorre cos valores de calidade da amplificación (Amp Score), os cales se consideran bos a partir de 1.1, polo que a calidade da amplificación non é fiable cunha confianza do 95%.

Resultados dos ensaios:

Os ensaios de xenotipado mediante qPCR permitiron obter resultados con certa inconcordancia con respecto ao esperado tras realizar o análise das secuencias. Isto, como xa se comentou, seguramente se deba á baixa concentración de material xenético nas mostras, non permitindo a correcta amplificación dos alelos minoritarios, pero tamén a erros na lectura do secuenciador, o que da lugar a certa variabilidade.

Para o xene *Cicloartenol sintase*, foi posible diferenciar as variedades *Arbequina* e *Picual* combinando as sondas 1 e 2.

Táboa 22. Matriz de resultados esperados coa combinación de ambos ensaios.

Matriz de resultados	*OEX1*	*OEX2*
Ladoelia KYA	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*
Kalamatas	*VIC/FAM*	*VIC/FAM*
Koroneiki	*VIC/FAM*	*VIC/FAM*
Kato Dry	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*
Arbequina	*VIC/VIC*	*VIC/FAM*
Picual	*VIC/VIC*	*FAM/FAM*
Ladoelia KOUF	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*

Centrándonos en cada ensaio por separado:

- Podemos ver que na sonda 1 en case todas as variedades excepto *Arbequina* e *Picual*, onde se ve un claro xenotipo homocigótico, se atopa certa amplificación tardía o alelo 2 marcado por FAM, como tamén se ve nos cromatogramas na Ilustración 42, polo que non se pode descartar a heterocigose nesas variedades. Polo tanto, logo de realizar os ensaios a sonda 1 parece óptima para a identificación de *Arbequina* e *Picual*.
- No caso da sonda 2, esperábase que esta permitira identificar as variedades *Kalamatas* e *Kilis Yaglik*, así como *Arbequina* ao analizar a secuencia dispoñible en bases de datos. Os resultados obtidos concordan coas hipóteses, pero ademais tamén mostran que esta sonda é válida para a identificación da variedade *Picual*.
- A sonda 3 foi deseñada para a identificación de *Kilis Yaglik*, variedade da cal non se posúe material xenético, polo que se esperaba que no resto das variedades os resultados mostraran xenotipos homocigóticos para o alelo 1 marcado con VIC (xenotipo salvaxe). Os ensaios permitiron confirmar as hipóteses, polo que sería interesante repetilos no futuro, contando con mostras de *Kilis Yaglik* para así confirmar que o ensaio é apto para a identificación da mesma.

Táboa 23. Resultados dos ensaios de xenotipado.

Xene OEX: resultados	***OEX1***		***OEX2***		***OEX3***	
	Esperados	**Obtidos**	**Esperados**	**Obtidos**	**Esperados**	**Obtidos**
Ladoelia KYA	*VIC/VIC*	*VIC/FAM**	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Kalamatas	*VIC/FAM*	*VIC/FAM**	*VIC/FAM*	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Koroneiki	*VIC/FAM*	*VIC/FAM**	*VIC/FAM*	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Kato Dry	*VIC/VIC*	*VIC/FAM**	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Arbequina	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*	*VIC/FAM*	*VIC/FAM*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Picual		*VIC/VIC*		*FAM/FAM*		*VIC/VIC*
Ladoelia KOUF	*VIC/VIC*	*VIC/FAM**	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*	*VIC/VIC*
Kilis Yaglik	*VIC/VIC*		*VIC/FAM*		*VIC/FAM*	

Os alelos marcados cun asterisco (*) indican que a amplificación é tardía, polo que o xenotipo non se pode asegurar.

Non se dispón da secuencia de Picual para realizar os aliñamentos.

Non se dispón de material xenético de *Kilis Yaglik* para realizar o ensaio.

Para o xene *Lupeol sintase (OEW)*, foi posible identificar SNPs, pero non foi posible completar os ensaios para a identificación das variedades cos mesmos. No futuro

traballarase nesta liña para conseguir desenvolver tanto un método de discriminación de variedades de olivo con este xene, como un método onde se combinen os ensaios de ambos xenes (OEX e OEW) para conseguir mellorar a identificación varietal.

6. Conclusións

1. Debido a que as mostras de oliva teñen unha cantidade de ADN moi baixa, o cal se veu reflexado nas baixas concentracións dos extractos, polo que sería interesante optimizar os protocolos de extracción de xeito que permitan obter mostras máis concentradas.
2. A identificación morfolóxica previa das variedades e necesaria para a identificación das variedades que se usan como referencia antes de proceder ao desenvolvemento dunha técnica molecular.
3. Existe pouca información depositada nas bases de datos xenómicas sobre diferentes rexións xénicas no ADN do olivo debido a que o seu xenoma aínda non está suficientemente mapeado. Polo tanto, só foi posible atopar entre 8 e 53 secuencias coincidentes cos xenes de interese na base de datos do GenBank, o cal dificulta a discriminación fiable das variedades dado que cantas máis secuencias rexistradas, maior seguridade de que unha variación nucleotídica é representativa da poboación
4. Únicamente foi posible identificar os SNPs no xene Cicloartenol Sintase, e dentro deste, só se atoparon alelos que permitiran diferenciar as variedades *Kalamatas, Ladoelia, Kilis Yaglik* e *Koroneiki*, por isto, sería interesante a avaliación de outras rexións xenómicas con potencial variabilidade para a identificación de máis variedades. Ademáis, destacar que a variedade Koroneiki presenta unha elevada variabilidade neste xene. É dicir, atópanse locus bialélicos (presenza de dous alelos en cada locus) prácticamente ao longo de toda a secuencia. Isto pode ser debido ben a unha modificación que alterara dito xen nesta variedade, modificando así a proteína que codifica para alcanzar unha mellor adaptación a unhas condicións determinadas, ou ben a que esta variedade surxe dun entrecruzamento de dúas variedades con diferenzas en dito xene.

5. Estes ensaios permitiron mediante a sonda 1 diferenciar as variedades *Arbequina* e *Picual* cun xenotipo homocigoto para o alelo 1 do resto das variedades, mediante a sonda 2 diferenciar cun xenotipo heterocitogo as variedades *Kalamatas*, *Koroneiki* e *Arbequina*, e por outro lado a variedade *Picual* cun xenotipo homocigoto para o alelo 2, e mediante a sonda 3 comprobar o xenotipo homocigoto para o alelo salvaxe en todas as variedades.
6. En base aos SNPs, deseñaronse tres sondas. Así, a amplificación mediante a sonda 1 permite diferenciar as variedades *Arbequina* e *Picual* cun xenotipo homocigoto para o alelo 1 do resto das variedades. Mediante a sonda 2, diferenciase cun xenotipo heterocitogo as variedades *Kalamatas*, *Koroneiki* e *Arbequina*, e por outro lado a variedade *Picual* cun xenotipo homocigoto para o alelo 2. Finalmente mediante a sonda 3, comprobase o xenotipo homocigoto para o alelo salvaxe en todas as variedades. Polo tanto, empregando as sondas 1 e 2 nun dispositivo miniaturizado poderíanse diferenciar *Arbequina* e *Picual* cun xenotipo diferente do resto de variedades, permitindo así o desenvolvemento dun método para a identificación destas dúas variedades Españolas fronte as principais variedades Gregas e Turcas.

7. Bibliografía

1. Ben-Ayed R, Kamoun-Grati N, Rebai A. An Overview of the Authentication of Olive Tree and Oil. Comp Rev Food Sci Food Safe. marzo de 2013;12(2):218-27.

2. Carvalho J, Yadav S, Garrido-Maestu A, Azinheiro S, Trujillo I, Barros-Velázquez J, et al. Evaluation of simple sequence repeats (SSR) and single nucleotide polymorphism (SNP)-based methods in olive varieties from the Northwest of Spain and potential for miniaturization. Food Chemistry: Molecular Sciences. diciembre de 2021;3:100038.

3. Bazakos C, Dulger AO, Uncu AT, Spaniolas S, Spano T, Kalaitzis P. A SNP-based PCR–RFLP capillary electrophoresis analysis for the identification of the varietal origin of olive oils. Food Chemistry. octubre de 2012;134(4):2411-8.

4. Reale S, Doveri S, Díaz A, Angiolillo A, Lucentini L, Pilla F, et al. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Golding B, editor. Genome. septiembre de 2006;49(9):1193-205.

5. Hakim IR, Kammoun NG, Makhloufi E, Rebaï A. Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm. Diversity. 30 de diciembre de 2009;2(1):17-27.

6. MAPA. Material vegetal: Olivo - Ministerio - mapa.gob.es [Internet]. [citado 20 de enero de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=6

7. Australian Oils Research, Mailer R, Gafner S, American Botanical Council. Adulteration of Olive (Olea europaea) Oil [Internet]. ABC-AHP-NCNPR Botanical Adulterants Prevention Program; 2020 oct [citado 17 de enero de 2025]. Disponible en: https://www.herbalgram.org/resources/botanical-adulterants-prevention-program/adulterants-bulletins/olive-oil-adulteration-bulletin-january-2020/

8. Chedid E, Rizou M, Kalaitzis P. Application of high resolution melting combined with DNA-based markers for quantitative analysis of olive oil authenticity and adulteration. Food Chemistry: X. junio de 2020;6:100082.

9. COI. Consumer behaviour study in Spain [Internet]. 2022 jun. Disponible en: https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/06/IOC-Consumer-behaviour-study-in-Spain.html#6_Prices

10. Aceite de oliva y aceituna de mesa: Normativa Básica de Aplicación [Internet]. MAPA; [citado 20 de enero de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/normativa%20basica.aspx

11. Unión Europea. Reglamento Delegado (UE) 2022/2104 de la Comisión de 29 de julio de 2022 [Internet]. DOUE-L-2022-81606 nov 4, 2022 p. 22. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2022-81606

12. Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 1308/2013 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de diciembre de 2013 [Internet]. p. 184. Disponible en: https://www.boe.es/doue/2013/347/L00671-00854.pdf

13. Agrimonti C, Vietina M, Pafundo S, Marmiroli N. The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. Trends in Food Science & Technology. mayo de 2011;22(5):237-44.

14. CARACTERES UTILIZADOS EN LA DESCRIPCIÓN DE LAS FICHAS VARIETALES [Internet]. MAPA; Disponible en: https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/docs/Caracteres%20Olivo.pdf

15. Tahmasebi S, Rabiei Z. Challenges for Genetic Identification of Olive Oil. En: Sladonja B, editor. The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive [Internet]. InTech; 2013 [citado 17 de enero de 2025]. Disponible en: http://www.intechopen.com/books/the-mediterranean-genetic-code-grapevine-and-olive/challenges-for-genetic-identification-of-olive-oil

16. International Olive Oil Council,. World Catalogue of Olive Varieties. 2000.

17. Arslan D, Özcan MM. Changes in Chemical Composition and Olive Oil Quality of Turkish Variety «Kilis yağlık» with Regard to Origin of Plantation. Glob J Agric Innov Res Dev. 9 de enero de 2014;1(2):51-6.

18. Costa J, Mafra I, Oliveira MBPP. Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. Trends in Food Science & Technology. julio de 2012;26(1):43-55.

19. Ellen Prediger, PhD, Former Senior Scientific Writer, IDT. How to design primers and probes for PCR and qPCR [Internet]. IDT (Integrated DNA Technologies); 2024 abr. Disponible en: https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes

8. Anexo

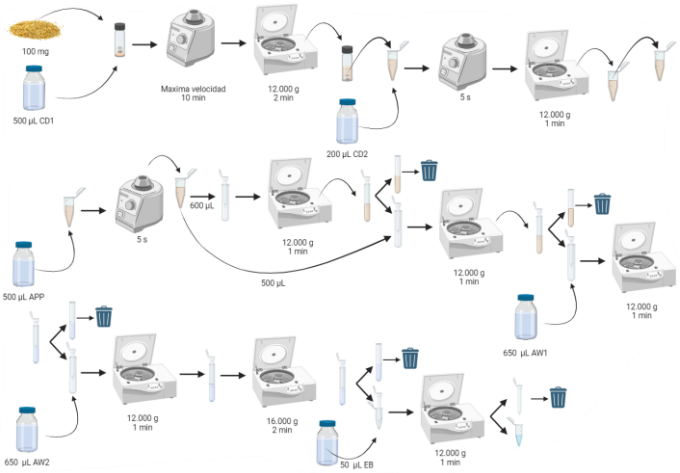


Ilustración 35. Protocolo de extracción.

Táboa 24.Cantidades empregadas para a extracción

Variedade	Código	Orixe	Proveedor	Tecido (mg)	CD1 (µL)	PS (µL)	EB (µL)	Data (Extracción)
Koroneiki	KOA1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	16/01/2024
	KOA2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	16/01/2024
	KOA3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	16/01/2024
	KOF1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	16/01/2024
	KOF2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	16/01/2024
	KOF3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	16/01/2024
Kato dry	KDA1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	17/01/2024
	KDA2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	17/01/2024
	KDA3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	17/01/2024
	KDF1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	17/01/2024
	KDF2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	17/01/2024
	KDF3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	17/01/2024
Kalamatas	KAA1	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	18/01/2024
	KAA2	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	18/01/2024
	KAA3	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	18/01/2024
	KAF1	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	18/01/2024
	KAF2	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	18/01/2024
	KAF3	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	18/01/2024
Kypriaki	KYA1	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KYA2	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KYA3	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KYF1	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
	KYF2	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
	KYF3	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
Koroneiki	KOA4	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KOA5	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KOA6	Chipre	Atsas Farm	~ 100	450	50	50	02/02/2024
	KOF4	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
	KOF5	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
	KOF6	Chipre	Atsas Farm	~ 100	500	-	50	02/02/2024
Arbequina	ARA1	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	ARA2	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	ARA3	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
Picual	PIA1	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	PIA2	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	PIA3	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
Korakou	KOUA1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOUA2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOUA3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOUF1	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KOUF2	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KOUF3	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
Aceite	AC1	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	AC2	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	AC3	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
Pasta	PA1	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	PA2	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	PA3	España	Aceites Abril	~ 100	450	50	50	15/02/2024
Koroneiki	KOA7	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOA8	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOA9	Chipre	Aparthenasa	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KOF7	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KOF8	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KOF9	Chipre	Aparthenasa	~ 100	500	-	50	15/02/2024
Kilis Yaglik	KKA1	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KKA2	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KKA3	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	450	50	50	15/02/2024
	KKF1	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KKF2	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	500	-	50	15/02/2024
	KKF3	Turquía	Global Organic Ltd.	~ 100	500	-	50	15/02/2024

Name and label of samples			Varietal identification and authentication	
Name	Code	Origin	Correct name of variety	Origin Country
KATO DRY	CYØ7	CYPRUS	Kato Drys	Cyprus
KILIS YAGLIK	TRØ1	TURKEY	Kilis Yaglik	Turkey
KALAMATAS	CYØ2	CYPRUS	Kalamata	Greece
KIPRIAKI	CYØ1	CYPRUS	Ladoelia	Cyprus
KORAKOU	CYØ6	CYPRUS	Ladoelia	Cyprus
KORONEIKI	CYØ4	CYPRUS	Koroneiki	Greece
KORONEIKI	CYØ5	CYPRUS	Koroneiki	Greece
KORONEIKI	CYØ3	CYPRUS	Koroneiki	Greece

Ilustración 36. Resultados da identificación morfolóxica proporcionados por Isabel Trujillo.

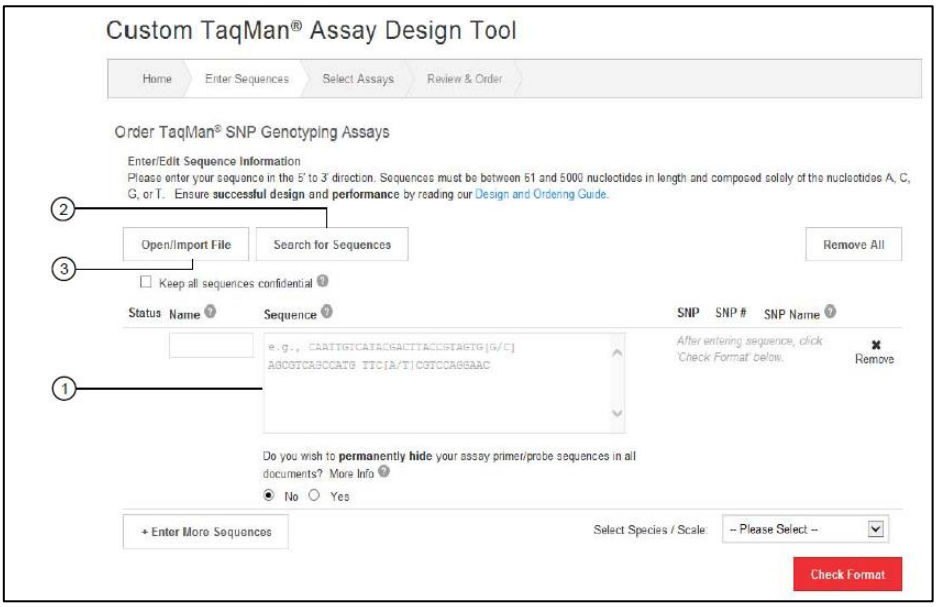


Ilustración 37. Ferramenta de deseño de sondas TaqMan de ThermoFisher para o envío das secuencias

Ilustración 38. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 1: identificación de Kalamatas.

Ilustración 39. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 2: identificación de Kalamatas e Kilis Yaglik.

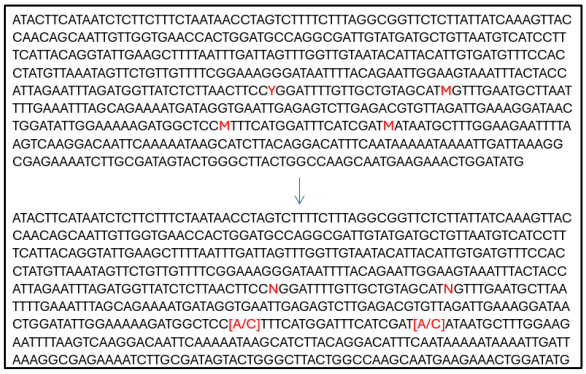


Ilustración 40. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 3: identificación de Kilis Yaglik.

ACACACAGATTCGATACTTCATAATCTCTTCTTTCTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGCGGTTCTCT
TATTATCAAAGTTACCAACAGCAATTGTTGGTGAACCACTGGATGCCAGGCGATTGTATGATGCT
GTTAATGTCATCCTTTCATTACAGGTATTGAAGCTTTTAATTTGATTAGTTTGGTTGWMATACATTAC
WTTGTGATGYTTCCACCTATGTTAAATAGTTYNNNNGTTTTCGGAAAGGGATAATNTTTACAGAAT
TGGAAGTAAATTTACTACCAWTAGAATTTAGATGGTTATCTCTTAACTTCCTGGATTTTGTTGCTGK
MGCAWASTTTGAATGCTTAATTTTGAAATTTAGCARAAAATGAW-
WGGTGAGTTRAGAGTCTTGAGACRTGWTRKRWTRN--
ARAGAANKAACTGGA**TATTGGACAAAGATRGCTCCCT**TTCAYGGATWTCATCS-
NNNNATAATARYGCTKTGRAAGAATTTTAAKTSTAGGACAATTCAMAAATAAGCATCTYACAGGAS
ATTTCWMTAAAAATAAAATTGATTAA

↓

ACACACAGATTCGATACTTCATAATCTCTTCTTTCTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGCGGTTCTCT
TATTATCAAAGTTACCAACAGCAATTGTTGGTGAACCACTGGATGCCAGGCGATTGTATGATGCT
GTTAATGTCATCCTTTCATTACAGGTATTGAAGCTTTTAATTTGATTAGTTTGGTTGNNATACATTACN
TTGTGATGNTTCCACCTATGTTAAATAGTTNNNNNNTTTTCGGAAAGGGATAATNTTTACAGAATT
GGAAGTAAATTTACTACCANTAGAATTTAGATGGTTATCTCTTAACTTCCTGGATTTTGTTGCTGNN
GCANASTTTGAATGCTTAATTTTGAAATTTAGCARAAAATGANNNGGTGAGTTRAGAGTCTTGAGA
CNTGNTNNNNTNNNNANAGAANNAACTGGA**TATTGGA[A/C]AAAGAT[G/A]GCTCC[A/C]TT
TCANGGATNTCATCNN**NNNNATAATANNGCTNTGNAAGAATTTTAANTNTAGGACAATTCANA
AATAAGCATCTNACAGGANATTTCNNTAAAAATAAAATTGATTAA

Ilustración 41. Secuencia editada para a obtención de sondas e primers para a realización do qPCR. Sonda 4: identificación de Koroneik

*Ilustración 42. **OEX1:** Cromatogramas da secuenciación das diferentes variedades. X1: Ladoelia (KY); X2: Kalamatas; X3-5: Koroneiki; X6: Ladoelia KOU; X7: Kato Dry; X8. Kilis Yaglik, e aliñamento de Arbequina coas sondas.*

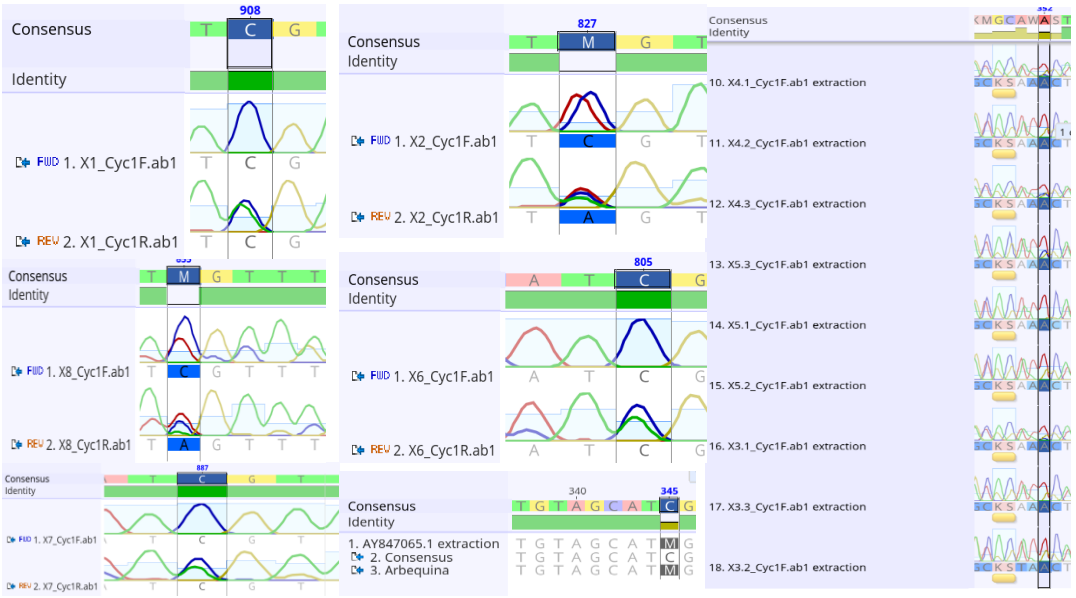


*Ilustración 43. **OEX2:** Cromatogramas da secuenciación das diferentes variedades. X1: Ladoelia (KY); X2: Kalamatas; X3-5: Koroneiki; X6: Ladoelia KOU; X7: Kato Dry; X8. Kilis Yaglik, e aliñamento de Arbequina .*

Táboa 25. Resultados qPCR OEX2.

	Well	Sample	Target	Cq	Cq Conf	Amp Score	Amp Status	Confidence	Allele 1	Allele 2	Call
Ladoelia KYA3	B2	3	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0		No Amp	1.00	0.08	0.05	NO_AMPLIFICATION
	B2		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0	0.59	No Amp				
	B3		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0	0.44	No Amp	0.98	1.00	0.22	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B3		OEX2-OEX2_V	39.82	0	1.22	Inconclusive				
	B4		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0	0.53	No Amp	0.98	1.89	0.37	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B4		OEX2-OEX2_V	37.88165283	0.965	1.35	Inconclusive				
Kalamatas KAA1	B5	4	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000		No Amp	1.00	0.36	0.11	NO_AMPLIFICATION
	B5		OEX2-OEX2_V	37.1598053	0.905	0.90	Inconclusive				
	B6		OEX2-OEX2_M	38.65665436	0.423	1.11	Inconclusive	0.86	0.35	0.83	UNDETERMINED
	B6		OEX2-OEX2_V	38.79367447	0.222	0.89	Inconclusive				
	B7		OEX2-OEX2_M	38.03577042	0.880	0.85	Inconclusive	1.00	0.24	0.33	NO_AMPLIFICATION
	B7		OEX2-OEX2_V	37.70447159	0.829	0.76	Amp				
Koroneiki KOF6	B8	5	OEX2-OEX2_M	35.55788422	0.992	1.37	Amp	0.85	0.69	1.67	UNDETERMINED
	B8		OEX2-OEX2_V	36.3266983	0.962	1.11	Inconclusive				
	B9		OEX2-OEX2_M	37.65936279	0.969	1.22	Inconclusive	0.98	0.86	1.08	HETEROZYGOUS
	B9		OEX2-OEX2_V	37.97696304	0.962	1.18	Inconclusive				
	B10		OEX2-OEX2_M	35.32115173	0.969	1.28	Amp	0.98	1.16	1.15	HETEROZYGOUS
	B10		OEX2-OEX2_V	36.04794312	0.955	1.29	Amp				
Kato Dry KDF1	C2	6	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000	0.49	No Amp	0.98	1.52	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C2		OEX2-OEX2_V	34.88513184	0.985	1.37	Amp				
	C3		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000		No Amp	0.98	1.66	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C3		OEX2-OEX2_V	34.75363159	0.985	1.38	Amp				
	C4		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000		No Amp	0.98	1.73	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	C4		OEX2-OEX2_V	34.8551712	0.983	1.39	Amp				
Arbequina ARA3	C5	7	OEX2-OEX2_M	36.32222366	0.965	1.28	Amp	0.98	0.93	1.10	HETEROZYGOUS
	C5		OEX2-OEX2_V	36.97244263	0.969	1.18	Inconclusive				
	C6		OEX2-OEX2_M	35.61401749	0.984	1.34	Amp	0.98	0.86	1.58	HETEROZYGOUS
	C6		OEX2-OEX2_V	36.99943542	0.964	1.22	Amp				
	C7		OEX2-OEX2_M	35.75063324	0.965	1.27	Amp	0.98	1.19	1.20	HETEROZYGOUS
	C7		OEX2-OEX2_V	35.93151474	0.971	1.28	Amp				
Picual PIA1	C8	8	OEX2-OEX2_M	36.43795776	0.954	1.23	Inconclusive	0.98	0.15	1.26	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C8		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.000	0.57	No Amp				
	C9		OEX2-OEX2_M	38.16505814	0.960	1.20	Inconclusive	0.98	0.14	1.16	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C9		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.000	0.55	No Amp				
	C10		OEX2-OEX2_M	38.13505554	0.947	1.22	Inconclusive	0.98	0.15	1.21	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C10		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.000	0.55	No Amp				
Ladoelia KOUF2	D2	9	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000	0.48	No Amp	0.98	1.53	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D2		OEX2-OEX2_V	34.98849487	0.984	1.37	Amp				
	D3		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000	0.46	No Amp	0.98	1.59	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D3		OEX2-OEX2_V	35.26005173	0.981	1.38	Amp				
	D4		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.000		No Amp	0.98	1.78	0.14	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	D4		OEX2-OEX2_V	35.05615616	0.981	1.40	Amp				
Blanco	D12	1	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0		No Amp	1.00	0.08	0.10	NO_AMPLIFICATION
	D12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0		No Amp				
	E12		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0		No Amp	1.00	0.18	0.31	NO_AMPLIFICATION
	E12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0		No Amp				
	F12		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0		No Amp	1.00	0.04	0.06	NO_AMPLIFICATION
	F12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0		No Amp				

Táboa 26. Resultados repetición qPCR OEX2.

	Well	Sample	Target	Cq	Cq Conf	Amp Score	Amp Status	Confidence	Allele 1	Allele 2	Call
Ladoelia KYA3	B2	3	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00	0.41	No Amp	0.97	1.01	0.12	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B2		OEX2-OEX2_V	38.03	0.96	1.22	Inconclusive				
	B3		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00	0.43	No Amp	0.97	0.72	0.10	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B3		OEX2-OEX2_V	38.30	0.83	1.09	Inconclusive				
	B4		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00	0.52	No Amp	0.97	1.16	0.13	HOMOZYGOUS_ALLELE1
	B4		OEX2-OEX2_V	37.97	0.97	1.25	Inconclusive				
Kalamatas KAA1	B5	4	OEX2-OEX2_M	37.67	0.95	0.98	Inconclusive	0.97	0.50	0.47	HETEROZYGOUS
	B5		OEX2-OEX2_V	38.76	0.28	1.00	Inconclusive				
	B6		OEX2-OEX2_M	37.84	0.98	1.20	Inconclusive	0.97	0.20	1.08	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	B6		OEX2-OEX2_V	37.60	0.83	0.74	Inconclusive				
	B7		OEX2-OEX2_M	38.01	0.95	1.06	Inconclusive	0.97	0.54	0.63	HETEROZYGOUS
	B7		OEX2-OEX2_V	38.68	0.35	1.02	Inconclusive				
Koroneiki KOF6	B8	5	OEX2-OEX2_M	37.69	0.98	1.20	Inconclusive	0.97	0.80	0.97	HETEROZYGOUS
	B8		OEX2-OEX2_V	38.11	0.95	1.16	Inconclusive				
	B9		OEX2-OEX2_M	36.83	0.98	1.20	Inconclusive	0.97	0.90	1.01	HETEROZYGOUS
	B9		OEX2-OEX2_V	37.74	0.96	1.18	Inconclusive				
	B10		OEX2-OEX2_M	37.90	0.97	1.23	Inconclusive	0.97	0.70	1.05	HETEROZYGOUS
	B10		OEX2-OEX2_V	38.78	0.27	1.14	Inconclusive				
Picual PIA1	C8	8	OEX2-OEX2_M	37.79	0.98	1.33	Inconclusive	0.97	0.16	1.70	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C8		OEX2-OEX2_V	36.03	0.72	0.65	Amp				
	C9		OEX2-OEX2_M	36.96	0.93	1.01	Inconclusive	0.97	0.11	0.59	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C9		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.00	0.39	No Amp				
	C10		OEX2-OEX2_M	36.51	0.95	1.21	Inconclusive	0.97	0.14	1.13	HOMOZYGOUS_ALLELE2
	C10		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.00	0.56	No Amp				
Blanco	D12	1	OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00		No Amp	1.00	0.10	0.12	NO_AMPLIFICATION
	D12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.00		No Amp				
	E12		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00		No Amp	1.00	0.10	0.12	NO_AMPLIFICATION
	E12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.00		No Amp				
	F12		OEX2-OEX2_M	Undetermined	0.00		No Amp	1.00	0.10	0.12	NO_AMPLIFICATION
	F12		OEX2-OEX2_V	Undetermined	0.00		No Amp				

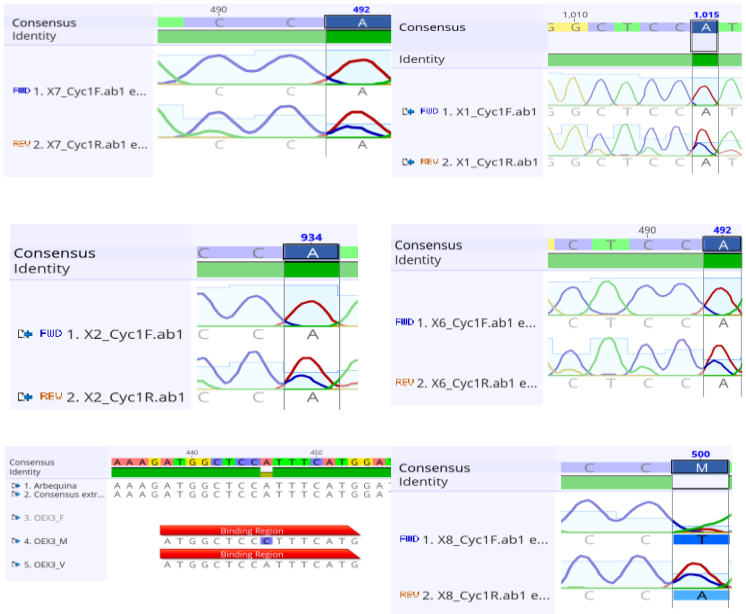


*Ilustración 44. **OEX3**: Cromatogramas da secuenciación das diferentes variedades. X1: Ladoelia (KY); X2: Kalamatas; X6: Ladoelia KOU; X7: Kato Dry; X8. Kilis Yaglik, e aliñamento de Arbequina.*