



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Cultura *in vitro* e análise molecular de *Olea europaea* L. cultivar Galega Vulgar



Carla Sofia Alves Cerqueira

2013



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Cultura *in vitro* e análise molecular de *Olea europaea* L. cultivar Galega Vulgar

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra)

Carla Sofia Alves Cerqueira

2013



## **Agradecimentos**

Ao longo deste trabalho, foram várias as pessoas que contribuíram de alguma forma para que tudo corresse pelo melhor, não podendo deixar de lhes prestar aqui um agradecimento especial.

Em primeiro lugar ao meu orientador Professor Doutor Jorge Canhoto, por toda a orientação e ensinamento, disponibilidade, apoio e simpatia demonstrados ao longo deste percurso.

À Elisa Figueiredo, pela preciosa ajuda no ingresso ao mundo dos PCRs, pela revisão do texto, pela sua presença e disponibilidade, incentivo, apoio, paciência e simpatia.

À Dr.<sup>a</sup> Ludovina Lopes pela ajuda prestada no início deste trabalho e pela contagiante boa disposição.

À D. Eulália Rosa, por todo o auxílio e atenção prestados em todo este percurso, desde à preparação dos meios de cultura, à ajuda na remoção do mesocarpo das azeitonas, e pelo convívio e incentivo.

À Lara Currais, por toda a ajuda ao longo do trabalho, dicas ricas, pela presença e convívio.

A todos os colegas de laboratório, à Ana Alves e Ana Almeida, ao Renato e ao João pelo companheirismo, simpatia e boa disposição em grande parte do percurso. À Hélia, à Nélia, ao Pedro, não Nelson, ao David e ao Rui pela simpatia.

Aos meus pais, por todo o apoio ao longo do percurso académico e carinho.

À minha família.

Ao meu querido Carlos, que por mais que lhe seja cada vez mais difícil suportar a minha partida semanal para Coimbra, só quer a minha felicidade.

À D. Rosa pelo apoio e atenção ao longo do processo de escrita.

Às meninas da Residência São Salvador, pelo carinho, amizade, incentivo e ambiente fantástico durante todo este percurso académico, que fazem da nossa casinha de madeira um cantinho tão especial.

## Índice

Resumo . . . . .	v
Abstract . . . . .	vii
1. Introdução . . . . .	1
1.1. Oliveira . . . . .	1
1.1.1. Taxonomia de <i>Olea europaea</i> L. cv. Galega vulgar . . . . .	2
1.1.2. Descrição botânica da <i>Olea europaea</i> L. cv. Galega vulgar . . . . .	3
1.1.3. Origem e distribuição geográfica . . . . .	4
1.1.4. Importância económica . . . . .	5
1.1.5. Variedades cultivadas em Portugal . . . . .	8
1.2. Propagação da oliveira . . . . .	10
1.2.1. Estacaria semi-lenhosa . . . . .	10
1.2.2. Enxertia . . . . .	11
1.2.3. Cultura <i>In Vitro</i> . . . . .	11
1.2.3.1. Proliferação de meristemas caulinares . . . . .	12
1.2.3.2. Embriogénese somática . . . . .	13
1.3. Embriogénese Polínica . . . . .	15
1.4. Marcadores genéticos . . . . .	17
1.4.1. Marcadores baseados na amplificação de DNA <i>in vitro</i> . . . . .	18
1.4.1.1. Marcadores baseados na técnica de PCR com uso de <i>primers</i> arbitrários . . . . .	19
1.5. Objectivos . . . . .	21
2. Materiais e métodos . . . . .	22
2.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira . . . . .	22
2.2. Indução de embriogénese somática . . . . .	23
2.3. Ensaio de indução de embriogénese polínica . . . . .	26
2.4. Análise estatística . . . . .	30

2.5. Ensaio com marcadores genéticos .....	30
2.5.1. Extração de DNA genómico .....	30
2.5.2. Quantificação de DNA .....	31
2.5.3. Protocolo de RAPDs .....	32
2.5.3.1. Polimerase Chain Reaction .....	33
2.5.3.2. Condições de Amplificação .....	33
2.5.3.3. Separação e visualização dos produtos de amplificação .....	33
2.5.4. Análise de dados .....	34
3. Resultados .....	35
3.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira .....	35
3.2. Indução de embriogénese somática .....	36
3.3. Ensaio de indução de embriogénese polínica .....	42
3.5. Ensaio com marcadores genéticos .....	45
3.5.1. Quantificação de DNA .....	45
3.5.2. Separação e visualização dos produtos de amplificação .....	46
3.6. Análise de dados .....	47
4. Discussão .....	50
4.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira .....	50
4.2. Indução de embriogénese somática .....	51
4.3. Ensaio de indução de embriogénese polínica .....	54
4.5. Ensaio com marcadores genéticos .....	55
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	58
6. Bibliografia .....	60

## Resumo

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das 35 espécies do género *Olea*, não se conhecendo de forma inequívoca o seu local de origem. Esta espécie encontra-se muito difundida na zona Mediterrânica, sendo aqui que se situam 98% das oliveiras cultivadas, representando portanto uma enorme importância económica. São conhecidos cerca de 2000 cultivares, embora alguns sejam os mesmos, mas sob denominação diferente. Em território nacional foram descritos 22 deles, destacando-se o cultivar Galega vulgar pela vasta área que ocupa, cerca de 80% da área total de olival, e pelas características que o tornam tão importante, tais como a resistência à salinidade, ao stress hídrico e a algumas doenças como a provocada pelo fungo *Verticillium*. Para além disso, produz um dos azeites existentes no mercado mais apreciado pelos consumidores devido ao seu sabor característico, aroma, baixa acidez e grande estabilidade oxidativa.

Tendo em conta a importância deste cultivar e o reduzido número de estudos nele realizados, optou-se neste trabalho pela análise do potencial embriogénico desta espécie, quer em termos de embriogénese somática e polínica. Para além disso, tentou-se a manutenção de alguns clones por micropropagação e analisou-se também a variabilidade de alguns cultivares comparativamente à Galega Vulgar.

Relativamente à micropropagação através da proliferação de meristemas axilares, foi testado o meio base OM com a substituição do manitol por sacarose. Testou-se ainda o efeito de alguns reguladores de crescimento tendo-se verificado que a inclusão de ácido indolbutírico (IBA) e de benziladenina (BA) não permitiu uma propagação eficaz. Para além disso, verificou-se uma forma de contaminação endógena que limitou severamente os ensaios. Em relação à embriogénese somática, a sua indução foi estudada em embriões zigóticos maduros (EZ) provenientes de três clones de Galega vulgar (1061, 2052, 502), colocados em cultura intactos ou seccionados em três partes (radicular, meristemática e cotiledonar) em diferentes meios. Foi observada a formação de estruturas embrionárias, embora com aspecto anómalo, nos meios contendo 2 ou 5 mg/l de ácido naftaleno-acético (NAA), 0,5 mg/l de dimetil-alil-amino-purina (2IP) e 8% de sacarose, após cerca de dois meses de cultura. A maior percentagem de indução foi conseguida no meio OM com 2 mg/l de NAA com embriões zigóticos intactos do clone 502, embora não se tenham verificado diferenças significativas na percentagem de

indução de embriogénese somática entre as diferentes situações. Foram utilizados também embriões zigóticos em estados mais precoces de desenvolvimento, tendo a resposta sido muito mais reduzida. Na indução de embriogénese polínica, foram cultivadas anteras com 2 ou 3 mm, não tendo havido, em situação alguma, a formação de embriões, apenas calo. No entanto, por esmagamento de anteras de 2 mm em cultura, foi possível observar grãos de pólen multinucleados nas anteras cultivadas em meios com BA combinado com NAA ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

A análise de variabilidade foi feita recorrendo a marcadores RAPD, utilizando *primers*, descritos anteriormente como discriminativos para Galega, que demonstraram um polimorfismo de 95%. Os sete cultivares estudados foram agrupados em três grupos, de acordo com o índice de similaridade, com uma boa correlação entre eles ( $r=0.81132$ ). Assim, a Galega Grada de Évora parece ser próxima da Cobrançosa e Cordovil e as Galega Grada Normal, Grada de Serpa e a Galega X podem não ser mesmo Galegas, aparecendo separadas da Galega vulgar. Os resultados aqui obtidos devem ser complementados com análises mais aprofundadas para otimizar os protocolos desenvolvidos para os poder confirmar.

**Palavras-chave:** androgénese, clones, embriogénese somática, manitol, micropropagação, RAPDs.

## Abstract

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the 35 species included in the genus *Olea*, for which the precise zone of origin was not yet determined. This species is widespread around the Mediterranean area, where 98% of the cultivated olive trees are present, assuming a relevant economic impact. About 2000 cultivars of *Olea europaea* are known, although some represent the same genotype with a different name. In our country are known at less 22 cultivars, but the cultivar Galega vulgar due to the large area in which is cultured (80% of the orchards) is particularly important. The characteristics that make this cultivar so interesting are its resistance to salinity, water stress and some diseases such as that caused by the fungus *Verticillium*. Moreover, its oil is much appreciated by consumers, because of their characteristic flavor, aroma, low acidity and high oxidative stability.

Taking into account the importance of this cultivar and the small number of studies carried on it, it was decided to analyze the embryogenic potential of this species, both in terms of somatic and pollen embryogenesis. In addition, it was attempted to maintain some clones by micropropagation and to analyze the variability of some cultivars compared to Galega Vulgar.

Micropropagation assays through the proliferation of axillary buds, on the OM medium supplemented with sucrose instead of mannitol with sucrose were performed. The effect of some growth regulators such as indolebutyric acid (IBA) and benzyladenine (BA) was also evaluated. The results showed that neither mannitol or these growth regulators were able to improve the micropropagation rates. Besides, a severe endogenous contamination appeared on these conditions hence impairing shoot proliferation. Somatic embryogenesis, was induced in mature and immature zygotic embryos (EZ) from three Galega vulgar clones (A, B and C), placed in culture intact or divided in three sections (root, meristem and cotyledons) in different culture media. Embryonic structures of abnormal phenotypes were produced on media supplemented with 2 or 5 mg/l naphthalene acetic acid (NAA), 0.5 mg/l dimethyl-allylamino purine (2iP) and 8% sucrose, after about two months of culture. The highest percentage of induction was achieved in OM medium plus 2 mg/l NAA on intact zygotic embryos of clone 502, although no significant differences were found among genotypes or culture media. Pollen embryogenesis, was tested in anthers at different developmental stages (2

and 3 mm). Pollen embryos were never formed but callus formation occurred in most of the cultures. Cytological analyses of cultured anthers showed the presence of some multinucleate pollen grains in anthers (2 mm) cultured in medium with BA combined with NAA or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

The analyses of genetic diversity were performed using RAPDs with primers previously used in Galega. The seven cultivars tested were separated into three groups according to the similarity index, with a *good* correlation between them ( $r = 0.81132$ ). Thus, the Galega Grada Évora seems closer Cobrançosa and Cordovil and Galega Grada Normal, Grada Serpa and Galega X may not be related with Galega, appearing separated from Galega vulgar. More work needs to be performed to strongly sustain the results here presented.

**Key-words:** androgenesis, clones, mannitol, micropropagation, somatic embryogenesis, RAPDs.

### 1. Introdução

#### 1.1. Oliveira

Já é longa a presença da oliveira na história. Na Grécia antiga era vista como uma dádiva da deusa Atena, simbolizando a liberdade e a pureza. A história conta que a primeira oliveira surgiu numa disputa entre Atena, deusa da paz e da sabedoria, e Poseidon, deus dos mares, por uma terra que iria ser fundada. Zeus, que terminava a disputa, ficando deslumbrado com a árvore de aparência delicada, mas capaz de render frutos valiosos, que alimentavam e curavam, deu a vitória a Atena. A cidade ficou com o nome da deusa e esta passou a ser a protectora da cidade, ensinando aos seus habitantes o cultivo da oliveira e o seu aproveitamento (Castro Caldas, 1998). Para o poeta e dramaturgo grego Sófocles, a oliveira era a “*árvore invencível que nasce de si mesma*”, demonstrando a crença, que os antigos gregos tinham, de que a árvore tinha origem divina. Já na mitologia romana acreditava-se que Rómulo e Remo, descendentes dos deuses e fundadores de Roma, viram a luz do dia pela primeira vez debaixo dos galhos de uma oliveira, tendo sido Minerva a sua criadora.

Os ramos da oliveira eram usados pelos gregos para trançarem as grinaldas e coroas como símbolo de poder, conquista e sabedoria, que são desde o início dos jogos olímpicos até aos dias de hoje entregues aos atletas vencedores. A sua madeira era utilizada no fabrico dos ceptros dos reis e o seu azeite era utilizado pelos egípcios para unguir os seus convidados nos grandes banquetes (Blanco, [www.jardimdeflores.com.br](http://www.jardimdeflores.com.br)).

Na religião há também um forte simbolismo relativamente à oliveira, bem como ao seu fruto e óleo, estando presente em vários episódios da Bíblia, representando a paz, riqueza e fama. A passagem em que Noé, depois de quarenta dias e quarenta noites a navegar na arca, manda a pomba para perceber se já está perto de terra, quando a pomba volta trazendo no bico um raminho verde de oliveira, símbolo do restabelecimento da paz entre Deus e os homens (Castro Caldas, 1998). Outro exemplo das narrativas bíblicas descreve quando o Messias rezava no Monte das Oliveiras antes de ser entregue ao rei Herodes para ser julgado. São exemplos de passagens importantes da Bíblia onde a oliveira está presente. A religião Cristã manteve até aos dias de hoje essa simbologia da oliveira e seu óleo, é com um ramo de oliveira que se lança a água benta sobre os crentes na altura da Quaresma e o seu óleo é usado para unguir sacerdotes e em cerimónias de baptismo.

Também no Corão há referência à oliveira e ao seu óleo quando se escreve “Deus é a luz dos Céus e da Terra. Sua Luz tem a semelhança de um candeeiro... que se acende graças a uma árvore bendita, a oliveira, ..., cujo azeite reluz embora não o toque o fogo” (Castro Caldas, 1998).

### 1.1.1. Taxonomia de *Olea europaea* L. cv. Galega vulgar

A Galega (Fig. 1) é uma das muitas variedades de *Olea europaea* L., pertencente a uma família de angiospérmicas, as Oleaceae. Esta família engloba cerca de 30 géneros, incluindo *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Olea* e *Syringa* (Oliveira, 2007), e 600 espécies distribuídas por regiões tropicais e temperadas (Donini, 2008), sendo algumas arbustos e outras de porte arbóreo (Alves, 2007). O género *Olea* engloba 35 espécies, das quais a *Olea europaea* L. é a mais importante em termos económicos e a única que produz um fruto comestível (Gandul-Rojas, 2006). *O. europaea* está dividida em 6 subespécies, sendo elas a *O. europaea* L. subsp. *europaea* da zona do Mediterrâneo (*O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea* na forma cultivada e *O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr. na forma selvagem), *O. europaea* L. subsp. *cuspidata* (Wall) de África e Ásia, *O. europaea* L. subsp. *laperrinei* (Batt. & Trab.) da zona do Sahara, *O. europaea* L. subsp. *maroccana* (Greuter & Burdet) de Marrocos, *O. europaea* L. subsp. *cerasiformis* (G. Kunkel & Sunding) da Madeira, *O. europaea* L. subsp. *guanchica* das Canárias (Green, 2002; Rugini, 2008).

Análises recentes permitiram contabilizar cerca de 2000 cultivares de oliveira na bacia do Mediterrâneo em 2003 (Rotondi, 2003). O cultivar Galega vulgar tem como sinónimas *galega*, *galega meuda*, *molar*, *molarinha*, *negroa*, *negrucha* (Santos, 2010).



**Figura 1:** Oliveira da variedade Galega vulgar (Fonte: <http://lusatrilogia.com/azeitona-galega/>)

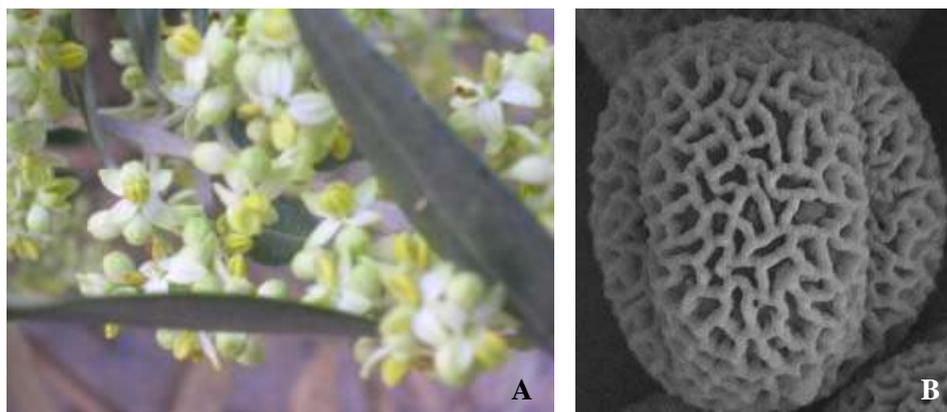
### 1.1.2. Descrição botânica da *Olea europaea* L. cv. *Galega vulgar*

A *Galega vulgar* é uma árvore que tende a crescer em altura, exibindo um porte médio ou grande, de grande rusticidade que se pode encontrar em solos pouco férteis e secos. Apresenta uma grande longevidade, embora com crescimento lento, o que leva a que a sua entrada na fase produtiva demore cerca de 5 anos, atingindo o seu máximo de produtividade aos 10 anos (Rugini, 1995). O seu tronco é grosso e rugoso, tem uma arborescência mediana e os ramos são curtos, rijos e acinzentados, sendo a sua rebentação muito abundante.

As raízes ramificam-se lateralmente de forma considerável, chegando a entrelaçar-se com raízes das oliveiras mais próximas. Caso se encontrem em local com deficiência hídrica aprofundam-se até encontrar humidade no solo (Barranco *et al.*, 2008).

As folhas são persistentes, longas e largas, lanceoladas e com uma consistência flácida ou média (Leitão *et al.*, 1986). Apresenta, tricomas na página inferior pelo que a cor é mais acinzentada relativamente à página superior, mais esverdeada. Possuem um comprimento de 3 a 9 cm, com uma nervura central bem definida (Barranco *et al.*, 2008).

As flores, de cor branca, apresentam-se em números de 18-25 por inflorescência (Santos, 2010), podendo variar com as condições fisiológicas e ambientais. Em cada inflorescência podem existir flores perfeitas (hermafroditas, com androceu e gineceu bem desenvolvidos) e flores estaminíferas ou imperfeitas (flores masculinas com um ovário rudimentar ou mesmo ausente, não reunindo condições para gerar fruto). A flor é composta por um cálice sinsépalo, persistente, com 4 sépalas e uma corola simpétala com 4 pétalas (Fig. 2A). Cada flor possui 2 estames (Fabbri, 2004), que produzem uma grande quantidade de grãos de pólen (Fig. 2B) alergénico (Rapoport in Barranco *et al.*, 2008).

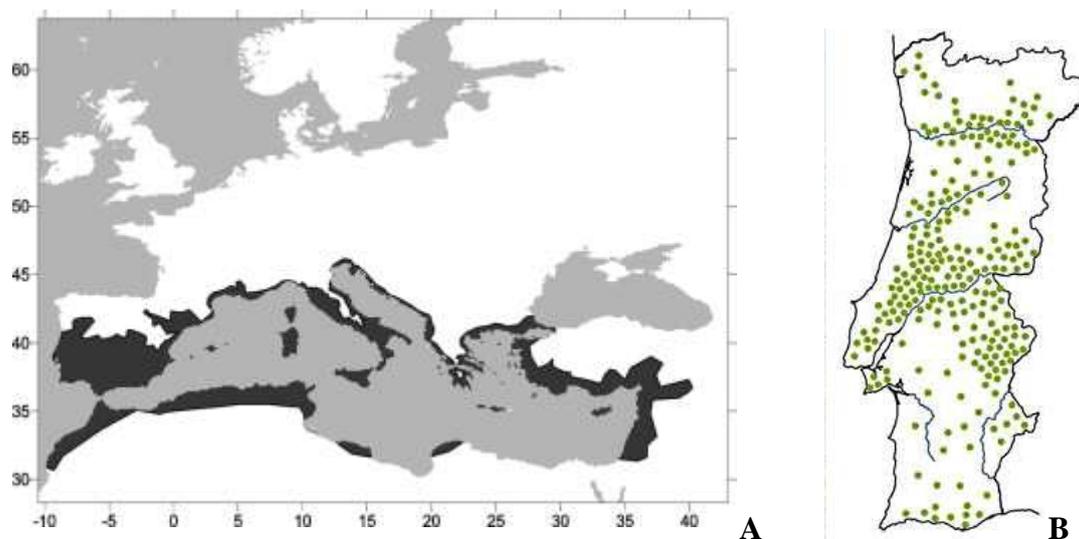


**Figura 2:** (A) Inflorescência de oliveira (Fonte: Santos, 2010). (B) Grãos de pólen de oliveira observados por microscopia electrónica de varrimento (fotos cedidas por R. Costa).

O fruto (azeitona) da oliveira, é uma drupa de dimensões variáveis consoantes as variedades (Gandul-Rojas, 2006) rica em lípidos, com uma única semente constituída pelo endocarpo (no interior do qual se localiza a semente), mesocarpo (polpa) e exocarpo. A azeitona adquire uma tonalidade negra na maturação, sendo um fruto que apresenta grande resistência ao desprendimento, não sendo ideal para a colheita por vibração. No entanto, no final da maturação, a sua queda é acentuada (Santos, 2010).

### 1.1.3. Origem e distribuição geográfica

Geralmente é admitido que a oliveira teve a sua origem na Ásia Menor e também em Creta, havendo vestígios do seu fruto identificados em jazidas do Paleolítico Superior tanto no Norte de África como na Europa. Foi provavelmente a primeira planta arbórea a ser domesticada, sabendo-se que a cultura data de 3000 a.C. na Fenícia, Síria e Palestina (Castro Caldas, 1998), tendo Kaniewski (2012) alargado o centro da domesticação ao Crescente Fértil, região que abrange atualmente Israel, Jordânia, Líbano, oeste da Síria, sudeste da Turquia e, ao longo dos rios Tigre e Eufrates, no Iraque e nos flancos oeste do Irão. Pela altura da Idade do Bronze a domesticação desta árvore espalhou-se pela Bacia do Mediterrâneo seguindo rotas terrestres e marítimas para a Itália, Espanha, África do Norte e França (Angiolillo, 1999). Tendo em conta esta dispersão, podemos dizer que a oliveira é a árvore típica do Mediterrâneo, região onde actualmente se situam 98% das oliveiras cultivadas a nível mundial (Fig. 3A; Moriondo, 2008).



**Figura 3:** Mapa de distribuição da *O. europaea* na Europa (A) (Fonte: Moriondo, 2008) e em Portugal (B) (Fonte: [www.infopedia.pt/\\$oliveira,2](http://www.infopedia.pt/$oliveira,2)).

No que diz respeito a Portugal, terão sido os romanos os responsáveis pela introdução da oliveira (Gemas, 2004), sendo o cultivar Galega vulgar aquele que tem uma maior área de cultura com cerca de 80% do olival português (Fig. 3 B) (Gemas, 2004; Cordeiro, 2008). Outro cultivar muito utilizado é a Cobrançosa considerado também um cultivar nacional, uma vez que as restantes variedades encontram-se restritas a zonas geográficas bem delimitadas e, como tal, são consideradas regionais. Deste modo a Galega vulgar encontra-se difundida por todo o país, sendo particularmente importante nas zonas da Beira Interior, Ribatejo, Alentejo e Algarve (Jacob, 2011).

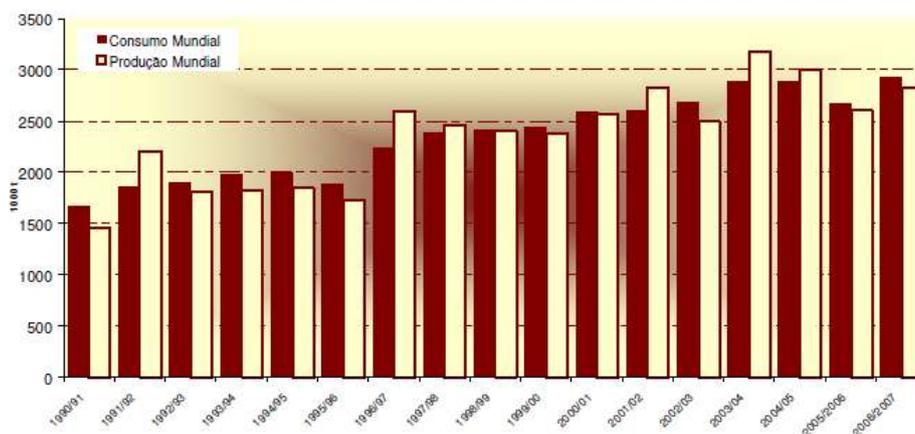
No século XV com as expedições dos portugueses e dos espanhóis a oliveira foi além das águas do Atlântico chegando à América. Contudo, o interesse de cultivar esta fruteira neste continente só ganhou importância recentemente, sendo também cultivada actualmente no sul de África, China, Japão e Austrália (Barranco *et al.*, 2008).

#### 1.1.4. Importância económica

Como é do conhecimento geral, a oliveira é uma árvore de grande importância económica devido essencialmente à produção do azeite, mas também de azeitona de mesa. Sendo a zona mediterrânica aquela onde a cultura desta árvore se encontra mais expandida, não é de estranhar que seja também esta a área onde a oliveira tem um maior

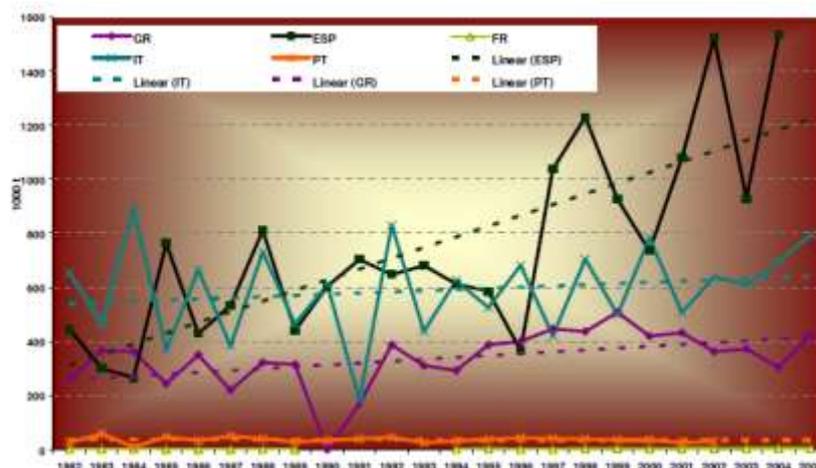
impacto económico. De facto, cerca de 95 % do azeite produzido é originário desta zona e cerca de 73% tem origem na União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia e Portugal). Segundo a CEPAAL (Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo) outros países produtores com impacto em termos globais são a Tunísia (7,7%), a Turquia (4,4%), a Síria (3,8%), Marrocos (2,5%) e a Argélia (1,4%).

A partir de meados da década de 90, e em particular entre 1995 e 2005, verificou-se um aumento considerável quer no consumo (3,5% por ano) quer na produção de (4,6% por ano) de azeite (Fig. 4), em parte devido a um aumento do interesse neste produto por países com economias emergentes, como a China, o Brasil e a Rússia.



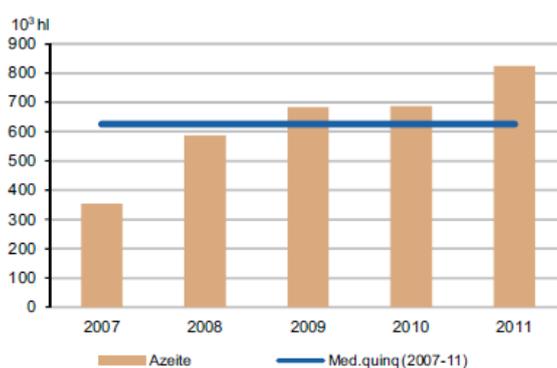
**Figura 4:** Evolução do consumo e produção mundial de azeite entre 1990 e 2007 (Fonte: MADRP 2007).

Dos estados membros da União Europeia aqueles em que se registou um maior aumento de produção foram Portugal, Espanha e França. No entanto, a produção de azeite na Europa tem vindo a aumentar a uma ritmo maior que o aumento do seu consumo, sendo a Espanha a ocupar o primeiro lugar na lista de países que mais contribuem para para a expansão da produção de azeite na União Europeia (Fig. 5; MADRP, 2007).



**Figura 5:** Evolução da produção de azeite nos Estados Membros produtores entre 1882 e 2005 (Fonte: MADRP, 2007).

Em Portugal, o principal destino da azeitona é a produção de azeite, com cerca de 96% da produção, sendo os restantes 4% utilizados para a produção de azeitona de mesa (MADRP 2007). Tal como na União Europeia também em Portugal se tem verificado um aumento da produção de azeite, atingindo-se em 2011 níveis de produção nunca antes alcançados. Isto apesar de ter havido um decréscimo da produção na região interior Norte devido condições climáticas adversas e problemas fitossanitários. Esta quebra foi largamente superada pelo aumento da produção na zona do Alentejo devido ao aumento das áreas de olival, em particular na zona do Alqueva (Fig. 6; INE, 2012).



**Figura 6:** Evolução da produção de azeite em Portugal, entre 2007 e 2011 (Fonte: INE, 2012).

O azeite da Galega vulgar é um dos azeites existentes no mercado mais apreciado pelos consumidores devido ao seu sabor característico, aroma, baixa acidez e grande estabilidade oxidativa (Carvalho, 2006; Santos, 2010). Outras características deste cultivar que o tornam interessante são a sua resistência à salinidade, ao *Verticillium* e a baixa incidência do olho-de-pavão (Santos, 2010). No entanto, é

susceptível a outras doenças, como a mosca (*Batrocera oleae*) (Cardoso, 2006), cochonilha (*Saissetia oleae*), fumagina, broca (Barranco, *et al.*, 2008) e gafa (fungo *Colletotrichum* spp.). Esta última doença causa danos consideráveis no fruto (Carvalho, 2010) sendo a doença mais importante do olival em Portugal (Talhinhas, 2006).

### **1.1.5. Variedades cultivadas em Portugal**

Como já foi referido anteriormente, conhecem-se cerca de 2000 cultivares de oliveira na bacia do Mediterrâneo, embora alguns sejam os mesmos cultivares mas sob uma denominação diferente (Gandul-Rojas, 2006). A designação dos cultivares, muitas vezes designados como variedades, tem sido feita com base em caracteres morfológicos e fisiológicos que podem ser influenciadas pelas condições ambientais ou de cultivo. Assim, é comum que o mesmo cultivar, a crescer em habitats diferentes, possa dar origem a designações regionais diferentes que na realidade são a mesma coisa (Lopes, 2004), com o consequente impacto negativo na economia baseada no cultivo da oliveira.

De acordo com Leitão (1986) são cultivadas em Portugal 22 das principais variedades de oliveira havendo em território vizinho homónimos de alguns destes cultivares (Barranco *et al.*, 2008). De entre os cultivares existentes no nosso país distinguem-se a Cobrançosa, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Galega Grada Normal\*<sup>1</sup>, Galega Grada de Évora\*<sup>2</sup> e Galega Grada de Serpa, estando as principais características indicadas no quadro 1.

**Quadro 1:** Descrição de aspectos botânicos e fisiológicos de alguns cultivares de oliveira (adaptado de: Leitão, *et al.* 1986).

	<b>Árvore e Ramos</b>	<b>Folhas</b>	<b>Inflorescências e flores</b>	<b>Frutos e endocarpos</b>
<b>Cobrançosa</b>	Porte pequeno/médio Arborescência mediana Ramificação média, rugosa/lisa	Pequenas, estreitas e compridas Rebordo plano ou encurvado Consistência média/flácida Ângulo apical e basal fechado	Comprimento médio/curto Nº de flores por inflorescência mediano Botões florais pequenos, sem flores supranumerárias	Fruto médio, elipsoidal Epicarpo avermelhado na viragem, vermelho escuro ou negro na maturação Mesocarpo aderente ao endocarpo grande, alongado ou elipsoidal
<b>Cordovil de Serpa</b>	Porte pequeno/médio Arborescência mediana Ramificação média de rugosidade média	Médias ou pequenas Rebordo encurvado Consistência média Ângulo apical e basal aberto	Comprimento médio Nº de flores por inflorescência mediano ou abundante Botões florais pequenos, sem flores supranumerárias	Fruto médio, obovóide ou elipsoidal Epicarpo avermelhado na viragem, vermelho escuro ou negro na maturação Mesocarpo não aderente ao endocarpo médio, obovóide
<b>Galega</b>	Porte médio/grande Arborescência mediana Ramificação curta, rugosa	Grandes, compridas e largas Consistência média/flácida Ângulo apical médio ou aberto e basal fechado	Comprimento médio Nº de flores por inflorescência mediano ou abundante Botões florais pequenos, com flores supranumerárias	Fruto pequeno, elipsoidal Epicarpo violáceo na viragem, negro na maturação Mesocarpo não aderente ao endocarpo pequeno, elipsoidal
<b>Galega Grada de Serpa</b>	Porte médio/grande Arborescência mediana Ramificação média de rugosidade média	Médias, curtas e largas Consistência flácida Ângulo apical e basal aberto	Comprimento médio/longo Nº de flores por inflorescência reduzido ou mediano Botões florais pequenos, sem flores supranumerárias	Fruto médio, ovóide ou elipsoidal Epicarpo avermelhado na viragem, vermelho escuro ou negro na maturação Mesocarpo não aderente ao endocarpo médio, elipsoidal

\*<sup>1</sup> O nome Galega Grada Normal é normalmente utilizado como sinónimo da Galega vulgar.

\*<sup>2</sup> Galega Grada de Évora surge normalmente com a designação Galega de Évora, mas não foi ainda feita uma descrição sobre os seus caracteres morfológicos e fisiológicos.

## 1.2. Propagação da oliveira

A oliveira produz normalmente sementes viáveis, capazes de gerar uma planta saudável. No entanto, não é de grande interesse obter plantas por reprodução sexuada para uso comercial, uma vez que estas serão distintas da planta-mãe (com genótipo desconhecido) (Fabri, 2004) e têm tendência a apresentar um longo período juvenil (Oliveira, 2007). No entanto, a propagação por semente pode ser utilizada na produção de porta-enxertos utilizados como cavalos de cultivares difíceis de enraizar por estacaria e em programas de melhoramento genético (Dutra, 2004). A manutenção das características das árvores mais interessantes apenas pode ser conseguida por multiplicação vegetativa. Com este propósito podem ser aplicados métodos convencionais, como a estacaria e a enxertia. No entanto, o recurso a técnicas de propagação *in vitro* é cada vez mais comum, uma vez que são mais rápidas e eficazes.

### 1.2.1. Estacaria semi-lenhosa

Inicialmente esta técnica de estacaria era feita utilizando estacas lenhosas com 50 a 60 cm, mas actualmente, usam-se estacas mais pequenas - 25 a 30 cm (Oliveira, 2007). Leitão (2004) defende que as estacas de oliveira enraízam tanto mais facilmente quanto mais velhos são os ramos de onde provêm, estando a Galega vulgar incluída nesse bom enraizamento por estaca lenhosa. No entanto, esta técnica apresenta, entre outras desvantagens, a necessidade de muito material vegetal (Peixe, 2008).

Devido aos fracos resultados obtidos com estacas muito lenhificadas, foi adoptada a propagação por estacaria semi-lenhosa, a qual tem sido adoptada pela maioria dos viveiros comerciais (Sghir, 2005). Neste procedimento, as estacas são tratadas com reguladores de crescimento (auxinas), uma vez que a sua concentração endógena, normalmente, é um factor limitante ao enraizamento (Peixe, 2008). Outros factores que podem pôr em causa o sucesso do procedimento são o tamanho das estacas utilizadas (Fernández Serrano *et al.*, 2002; Oliveira, 2003) e as sucessivas perdas de açúcares durante o enraizamento (Oliveira, 2010).

No que diz respeito à Galega vulgar, Leitão (2004) aponta para baixas taxas médias de enraizamento por esta técnica, por norma entre 20 e 44%. Outros autores (Peixe, 2008) indicam ainda níveis de enraizamento inferiores com apenas 10% de

estacas enraizadas, estando o processo de enraizamento de cultivares recalcitrantes longe de ser resolvido.

### **1.2.2. Enxertia**

Para levar a cabo a técnica da enxertia é necessário ter um porta-enxerto, que contribuindo com o sistema radicular (assegurando a nutrição mineral) vai servir de base ao enxerto, que é retirado da árvore que possui as características de interesse que se pretendem reproduzir. Este processo pode ser feito de várias formas, podendo ser por encosto, por borbulhia, fenda, T-invertido, entre outros (Ribeiro, 2005). Para a tarefa ser levada a cabo com êxito é necessário que haja afinidade entre a árvore que se vai utilizar como porta-enxerto e a que se vai utilizar como enxerto e que os câmbios (tecido meristemático) de ambos (porta-enxerto e enxerto) estejam em contato.

A enxertia é uma técnica bastante utilizada na multiplicação da oliveira e a Galega vulgar é muito utilizada como porta-enxerto, pois possui uma boa afinidade para quase todas as cultivares (Santos, 2010), sendo a alternativa convencional para cultivares com dificuldades no enraizamento ou quando se pretende substituir um clone por outro (Canhoto, 2010). Contudo, estes métodos convencionais de multiplicação vegetativa (estacaria semi-lenhosa e enxertia) são muito demorosos e exigem muita mão-de-obra.

### **1.2.3. Cultura *In Vitro***

A cultura *in vitro* apresenta vantagens em relação às técnicas anteriormente descritas, como permitir o cultivo de sementes, embriões ou fragmentos de tecido vegetal (explante) sob condições assépticas, em meios nutritivos adequados e condições ambientais controladas (Street, 1997). Para escolher o explante a utilizar deve ter-se em conta o nível de diferenciação (quanto mais novo menos diferenciado estará) e a finalidade da propagação (Erig, 2002). A cultura *in vitro* permite uma propagação a grande escala sem colocar em risco a planta mãe, obtendo-se clones desta, que serão isentos de pragas e doenças (Fabbri, 2004).

Devido ao reduzido tamanho do material vegetal utilizado nesta técnica de multiplicação vegetativa ela designa-se por micropropagação. Existem três métodos de levar a cabo assexuada micropropagação, sendo eles: proliferação de rebentos caulinares, indução de organogénese e embriogénese somática. No caso da oliveira, a organogénese tem sido muito pouco utilizada na propagação da oliveira (Rugini, 1988).

### **1.2.3.1. Proliferação de meristemas caulinares**

Este método de micropropagação, o mais utilizado na oliveira, baseia-se na proliferação de meristemas já existente no explante, que pode ser um segmento nodal ou um ápice caulinar. A utilização de apenas meristemas seria o ideal, mas estes encontram-se rodeados pelos primórdios foliares o que torna difícil o seu isolamento. Estes meristemas encontram-se na planta em estado dormente, e quando colocados num meio de cultura adequado e livres da acção inibidora do meristema apical (dominância apical), podem desenvolver-se (Cozza, 1997; Gyves, 2008).

Esta técnica é útil para estudar o funcionamento do meristema, obter uma propagação em larga escala (Rugini, 1995), regenerar plantas isentas de vírus (associada a uma termoterapia) (Erig, 2002), microenxertia permitindo ainda a preservação de germoplasma (Zacchini, 2004).

A multiplicação através deste método ocorre em diferentes fases, como sejam a preparação da planta mãe, seguindo-se o estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento e, por fim, aclimatização (Barbosa, 1986).

É um método com vantagens consideráveis que passam pelo facto de não haver necessidade de induzir novos meristemas, não haver o perigo de se obterem variantes, uma vez que não há a formação de calos, e a multiplicação da planta de interesse ocorrer de forma exponencial, visto que novos meristemas são continuamente produzidos.

Contudo, existem algumas limitações associadas a este método. Uma delas é o elevado custo associado às plantas regeneradas, sendo rentável usar este método preferencialmente em plantas com um elevado valor comercial. Além disso, as lenhosas são especialmente difíceis de multiplicar por este método, verificando-se um aumento

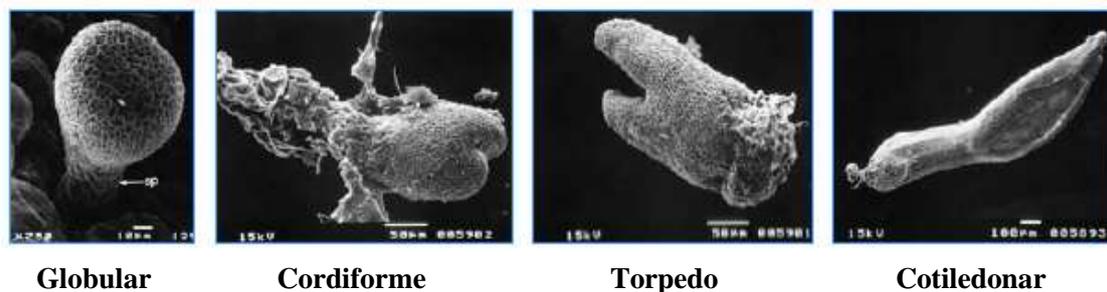
dessa dificuldade se forem utilizados explantes retirados de plantas adultas. Finalmente, o enraizamento de algumas espécies é problemático e surge com frequência o aparecimento de plantas vitrificadas (hiperhidricidade) (Rugini, 1995; Canhoto, 2010).

### 1.2.3.2. Embriogénese somática

A formação de um embrião implica normalmente a fusão de dois gametas, formação do zigoto e desenvolvimento deste numa estrutura com dois pólos – caulinar e radicular. No entanto, as plantas têm a capacidade de formar embriões não zigóticos, quer em condições naturais quer após indução em condições laboratoriais.

Os embriões formados a partir de células do corpo (*soma*) das plantas em condições laboratoriais definidas, são vulgarmente designados embriões somáticos (ES), que tal como os embriões zigóticos são estruturas bipolares e possuem o mesmo genótipo da planta mãe.

Os ES passam pelas mesmas fases de desenvolvimento que os embriões zigóticos, fases essa designadas por globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Fig. 7).



**Figura 7:** Fases de desenvolvimento dos embriões zigóticos e somáticos (Fonte: Canhoto, 2010).

A formação destes embriões ocorre normalmente de forma indirecta ocorrendo primeiro a formação de um calo embriogénico e, em condições diferentes, o desenvolvimento dos embriões, sendo muito poucos os casos em se verifica a formação destes sem haver a passagem por uma fase de calo (directa) (Halperin, 1995; Canhoto, 2010). Algumas espécies apresentam ainda uma embriogénese cíclica, que pode manter-se por longos períodos de tempo, uma vez que os embriões formados têm capacidade de iniciar novos ciclos embriogénicos (Canhoto, 2010).

Há várias etapas pelas quais é necessário passar para executar este método: 1) indução, que requer normalmente a presença de uma auxina (sendo a mais usada o 2,4-D) (Halperin, 1995) ou condições de stresse; 2) desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos, normalmente em meio sem auxina; 3) germinação dos embriões somáticos e conversão em plantas, em meio sem hormonas e 4) aclimatização (Canhoto, 2010).

Conhecem-se vários factores que afectam e podem comprometer o sucesso da embriogénese somática. Os factores que mais condicionam o sucesso da embriogénese somática são o tipo de explante (embrião zigótico, cotilédones, hipocótilos, folha, raiz, entre outros), bem como as condições em que se encontra, genótipo da planta dadora, composição do meio de cultura, em particular o tipo de reguladores de crescimento utilizados (PGRs), sendo as auxinas os mais importantes.

No caso da oliveira a luz é um factor importante na embriogénese somática, obtendo-se melhores resultados com culturas mantidas no escuro (Rugini, 1988). Também a idade do explante parece ser importante na indução de embriogénese somática na oliveira. Assim, Rugini (1988) verificou que embriões zigóticos maduros são muito pouco receptivos aos estímulos embriogénicos, ao contrário do que acontece com embriões em fases mais precoces de desenvolvimento. Existem, contudo, relatos de sucesso de indução a partir de material adulto. No entanto, este foi previamente rejuvenescido pela cultura *in vitro* (Mencuccini *et al.*, 1990). Trabalhos mais recentes (Rugini e Caricato, 1995) permitiram desenvolver um método de indução de embriogénese cíclica em tecidos adultos, a partir de material rejuvenescido por micropropagação (Rugini, 1995; Rugini, 2006).

A indução de embriogénese somática é um método que possibilita a clonagem e a propagação de plantas em larga escala, a regeneração de plantas provenientes de ensaios de transformação genética, a obtenção de sementes artificiais (sintéticas), a propagação de híbridos ou de plantas femininas, e a realização de estudos sobre o desenvolvimento embrionário, rejuvenescimento e criopreservação (Canhoto, 2010). Para além disso, em algumas espécies os calos embriogénicos podem ser mantidos por longos períodos de tempo o que permite realizar ensaios de campo para testar o material propagado e verificar se é de interesse a sua propagação (Canhoto, 2010).

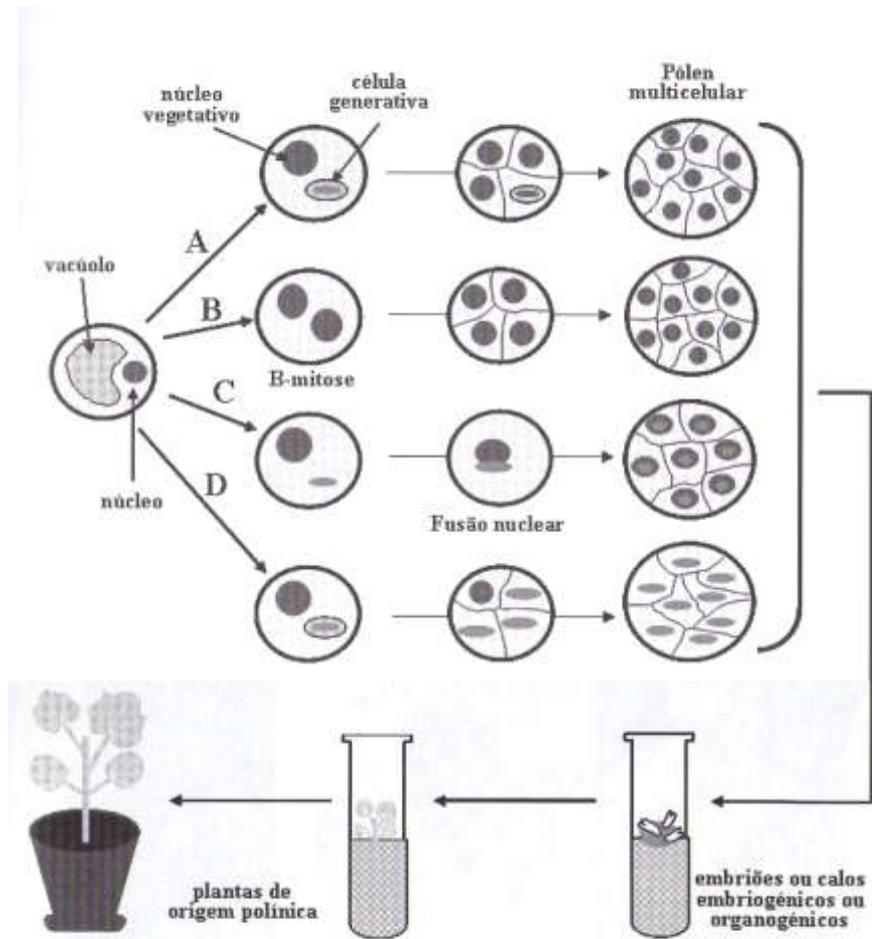
### 1.3. Embriogénese Polínica

Para além das células somáticas, existem outros tipos celulares que podem ser induzidos a formar embriões. É o caso dos micrósporos, que sendo células precursoras dos grãos de pólen e, posteriormente dos gâmetas, são haplóides e geneticamente diferentes da planta mãe (Canhoto, 2010). Deste modo, as plantas obtidas por cultura de micrósporos serão, teoricamente haplóides e geneticamente diferentes entre si e também da planta mãe. Isto significa que esta técnica não pode ser usada como método de clonagem. No entanto, tem outras aplicações muito importantes, como sejam a produção de linhas puras (neste caso designados haplóides duplos – HD) por duplicação dos haplóides (Kasha & Maluszinsky, 2003; Germaná, 2010) ou a obtenção de mutantes no estado homozigótico (Reed, 2005).

Existem outros métodos de obtenção de haplóides, no entanto, a embriogénese polínica (EP), anteriormente mais conhecida como androgénese, é a técnica mais eficaz para a obtenção deste tipo de plantas.

Tendo já sido relatados ensaios de obtenção de haplóides, por embriogénese polínica, em mais de 200 espécies, a maior parte tem-se centrado em espécies das famílias Poaceae, Brassicaceae e Solanaceae. Todavia, os trabalhos em plantas lenhosas são cada vez mais comuns (Canhoto, 2010).

A EP decorre em duas fases: indução e desenvolvimento de embriões polínicos. A obtenção de plantas haplóides pode acontecer por divisões sucessivas dos micrósporos e posterior formação de embriões (directa) ou havendo primeiro a formação de calo que vai depois diferenciar-se em rebentos caulinares ou embriões (Reinert, 2000). Em qualquer uma destas vias, o contributo do grão de pólen para a formação de embriões pode ser diferente: 1) da primeira mitose polínica resulta um núcleo vegetativo e um generativo, sendo do primeiro que são formados os embriões; 2) há a formação de dois núcleos morfológicamente idênticos (B-mitose), podendo um ou ambos formar estruturas multicelulares; 3) diferencia-se da via 1 pelo facto de os núcleos se fundirem e depois participarem na embriogénese; 4) o núcleo generativo dá origem aos embriões polínicos (Fig. 8; Canhoto, 2010).



**Figura 8:** Diferentes vias pelas quais o grão de pólen dá origem a embriões (Fonte: Canhoto, 2010).

Os factores que podem afectar esta técnica estão relacionados com a planta dadora (estado de desenvolvimento do pólen, parede da antera, genótipo e estado fisiológico), a composição do meio e condições da cultura (luz temperatura, pH, estado físico do meio). A constituição do meio pode variar de acordo com a espécie, sendo que para lenhosas a existência de auxinas e citocininas é indispensável. Em algumas espécies altas concentrações da fonte de carbono (normalmente sacarose) podem ser benéficas, sendo que para muitas outras é prejudicial (Ferrie, 1995; Reinert, 2000; Canhoto, 2010).

Submeter os grãos de pólen a condições de stresse, como temperaturas baixas (4°C) ou altas (30 – 23°C) ou em meios empobrecidos (sem sacarose, fosfato ou azoto) são outros factores que podem ajudar no processo de indução (Shivanna, 2003).

Esta técnica apresenta, no entanto, limitações que põem em causa a viabilidade da mesma. Assim, as plantas resultantes podem apresentar níveis elevados de ploidia,

pode ocorrer proliferação dos tecidos somáticos da antera, formam-se com frequência plantas albinas (com maior frequência em gramíneas) e, muitas vezes, a percentagem de indução é reduzida (Canhoto, 2010).

Na oliveira ainda não foram obtidas plantas haplóides (Jacob, 2011), no entanto foram já apresentados protocolos com resultados positivos na obtenção de pró-embriões a partir da cultura de micrósporos (Pintos, 2007). Tendo sido também descritas as condições ideais dos tratamentos de temperatura a que o micrósporo deve ser sujeito antes de colocado em cultura (Pintos, 2007). O estado de desenvolvimento dos micrósporos ideal para a indução foi também determinado (Shivanna, 2003; Pintos, 2007).

### **1.4. Marcadores genéticos**

Os marcadores utilizados até à década de 60 eram baseados em características morfológicas, uma vez que estavam associados a características de identificação visual fácil (a cor, a morfologia da folha, entre outros). Como estão, normalmente, ligados a genes de importância económica, limitam a sua utilização em programas de melhoramento uma vez que estas características fenotípicas dependem da interacção de vários genes. Este tipo de marcadores encontram-se restritos a espécies modelo em estudos genéticos, como o milho, tomate, ervilha, entre outros. A sua viabilidade é dificultada por vários factores, tais como a existência em número reduzido, o baixo nível de polimorfismo, condições ambientais, acção dos genes dominantes, interacção entre genes e idade da planta (Hummer, 2011).

Foi então necessário desenvolver novos marcadores para contornar estes problemas. Surgiram assim os marcadores bioquímicos, como é o caso das isoenzimas, que vieram tornar possível aplicar marcadores a todas as plantas. No entanto, apresenta limitações como o facto de serem influenciados pelas condições ambientais e por mecanismos epigenéticos.

Posteriormente, surgiram os marcadores moleculares que vieram revolucionar a aplicação de marcadores e baseiam-se em DNA nuclear, regiões expressas ou não no genoma herdadas geneticamente. Um marcador molecular pode ser também denominado de marcador genético quando respeita as leis de Mendel. Para ser um bom

marcador tem que ser polimórfico, reprodutível, co-dominante, uniformemente distribuído por todo o genoma, discriminativo, fácil de detectar, barato e não estar sujeito às condições ambientais (Vicente, 2004).

Surgiram também marcadores moleculares baseados em DNA cloroplastidial e mitocondrial (utilizados quando se quer estudar genes herdados pela linha materna). Nem o DNA do cloroplasto (cpDNA), nem mitocondrial DNA (mtDNA) são muito usados pelos biólogos populacionais porque o primeiro é altamente conservado e o último sofre frequentemente mutações estruturais, tornando difícil a identificação de regiões homólogas (Parker *et al.*, 1998).

Os marcadores moleculares são hoje utilizados em áreas muito diversas, desde genética das populações, variação genética intra e inter-populacional, mapeamento, análise de similaridade, com o objectivo de conservar e melhorar os recursos genéticos (Zamani, 2010).

### **1.4.1. Marcadores baseados na amplificação de DNA *in vitro***

A amplificação do DNA *in vitro* permite a síntese de um grande número de cópias de um segmento de DNA específico pela presença da enzima *Taq* DNA *polimerase*. Esta técnica (PCR – Polymerase Chain Reaction) ocorre em três fases: desnaturação (abertura da cadeia em dupla-hélice de DNA com elevação da temperatura para 92°C a 95°C); renaturação (diminuição da temperatura para 35°C a 60°C para os *primers* se ligarem às cadeias simples de DNA – *annealing*); e síntese (alongamento por adição de nucleótidos no sentido 5'-3' pela *Taq* DNA *polymerase* a uma temperatura de 72°C). Este procedimento é repetido várias vezes, sendo que no final de cada ciclo deverá ter-se o dobro do DNA que se tinha no início desse mesmo ciclo.

A reacção de PCR requer vários componentes: DNA molde (o que se pretende amplificar), *primers* complementares a uma ou várias regiões do DNA molde, trifosfatos de deoxinucleótidos (dNTP's), enzima *Taq polymerase* (obtida da bactéria *Thermus aquaticus*), tampão de reacção, magnésio e água ultra pura estéril (Antonini, 2004).

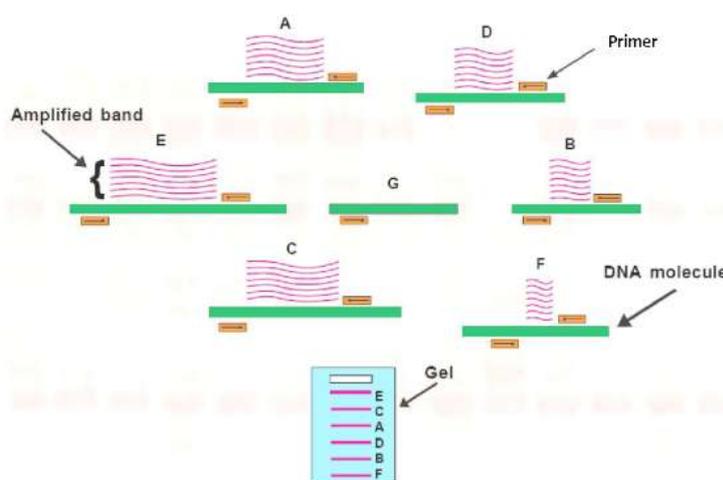
A descoberta desta técnica em meados da década de 80, por Kary Mullis, veio revolucionar a compreensão de processos biológicos na área vegetal e animal e actualmente aplica-se em muitas áreas do conhecimento científico, como a genética forense e biologia molecular, (McPherson, 2006). Para além de ajudar a estudar o DNA, permitiu também o aparecimento de novos marcadores moleculares, os RAPD, AFLP, SSR, ISSR entre outros (McPherson, 2006).

A técnica de PCR tem como vantagens o facto de ser rápida e de fácil execução. No entanto, requer alguns cuidados no que diz respeito a contaminações da mistura de reacção e sensibilidade da *Taq polymerase* (McPherson, 2006; Harvey, 2008).

### **1.4.1.1. Marcadores baseados na técnica de PCR com uso de *primers* arbitrários**

Este grupo de marcadores inclui os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), os DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e AP-PCR (*Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction*) (Castiglioni, 2003).

Os RAPD são marcadores dominantes (não permitem distinção entre homozigóticos e heterozigóticos) que amplificam DNA polimórfico ao acaso (Castiglioni, 2003; Albertini, 2011) utilizando um único par de *primers* de sequência curta (cerca de 10 nucleótidos) e arbitrária, eliminando a necessidade de ter um conhecimento prévio da sequência a ampliar (Bered, 1997). Os *primers* vão ligar-se ao DNA molde em dois sítios diferentes em cadeias com sentidos convergentes em que, se houver a formação de um fragmento com algumas centenas de pares de bases, obtém-se um fragmento detectável num gel de electroforese (Fig. 9) (Castiglioni, 2003).



**Figura 9:** Representação esquemática da tecnologia de análise RAPD (Fonte: Vivente, 2003).

O elevado polimorfismo produzido pela técnica de RAPD (Belaj, 2001) aparece sob a forma de presença ou ausência de bandas num gel, sendo que apenas um par de bases diferente é suficiente para causar a não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento.

Esta técnica tem aplicações muito variadas como a obtenção de *fingerprints* genómicos de indivíduos, variedades e populações, a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma, o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies, a construção de mapas genéticos de alta cobertura genómica e a localização de genes.

A sua reprodutibilidade pode ser afectada por vários factores, passando pela qualidade e concentração do DNA, temperatura de *annealing*, tamanho do *primer*, contaminantes, entre outros (Castiglioni, 2003).

Até alguns anos atrás, o germoplasma de *Olea europaea* era identificado por descrições morfológicas. Desde que surgiram os marcadores bioquímicos e moleculares, o uso de isoenzimas e RAPDs têm sido utilizados principalmente na identificação de cultivares, para estudar a taxonomia dentro do género e as relações entre árvores cultivadas e silvestres, para determinar a origem das cultivares e para mapear e identificar os marcadores ligados a características agronómicas mais importantes (Rugini, 2008; Albertini, 2011).

### 1.5. Objectivos

A oliveira tem, cada vez mais, sido alvo de estudos que visam o melhoramento da produção e qualidade desta, devido à notável importância económica do seu cultivo. No entanto, há ainda muitos obstáculos a serem ultrapassados, em estudos laboratoriais, para se proceder ao melhoramento desta espécie e produzi-la em larga escala.

Assim, os objectivos deste trabalho visam o melhoramento dos protocolos existentes para propagar a oliveira, bem como para o seu melhoramento. Dadas as conhecidas desvantagens da obtenção desta espécie através da germinação de sementes, que não permitem fazer frente às exigências do mercado, pretendeu-se desenvolver protocolos mais eficientes e rápidos, nomeadamente para a indução de embriogénese somática e polínica. Por outro lado, pretendeu-se estudar a preferência da oliveira para determinados componentes utilizados nos meios de cultura.

Num estudo complementar, analisou-se também a variabilidade entre algumas variedades cultivadas em Portugal, utilizando marcadores RAPD.

Parte deste trabalho, nomeadamente no que diz respeito à indução de ES, foram, já apresentados no VI Simpósio Nacional de Olivicultura (2012).

## 2. Materiais e métodos

### Material vegetal

O material vegetal para a micropropagação através da proliferação de meristemas axilares foi fornecido pela Escola Superior Agrária de Santarém (Dra. Paula Jacob), pertencente a uma coleção *in vitro* de germoplasma de Galega. Sendo as três linhas: A (20/2051), B (20/1061) e C (20/501).

Frutos para o isolamento dos embriões foram também fornecidos pela mesma instituição. Os frutos foram obtidos a partir de três clones diferentes: 1061, 2052 e 502. Ensaio de ES foram também realizados com embriões de frutos de material colhido em Ponte de Lima e em Coimbra (St.<sup>o</sup> António dos Olivais).

Para a indução de embriogénese polínica, as flores foram obtidas a partir de árvores a crescer em Ponte de Lima e Coimbra.

As análises de RAPDs foram realizadas em material previamente recolhido (folhas jovens) e mantido a -80°C. Foram utilizadas folhas jovens das variedades Cobrançosa, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Galega Grada Normal, Galega Grada de Évora, Galega Grada de Serpa e uma Galega X.

Ao longo do trabalho é utilizada a designação variedade e cultivar, sendo feita com a mesma finalidade.

### 2.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira

O material fornecido pela Escola Superior Agrária de Santarém já se encontrava estabelecido *in vitro* tendo sido mantido por subculturas mensais no laboratório de Biotecnologia do departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Inicialmente as repicagens das três linhas foram feitas no sentido de obter plântulas livres de contaminações. Essas subculturas foram realizadas utilizando sempre o mesmo meio de cultura e ápices caulinares com dois nós bem distintos (cerca de 1 a 1,5 cm). Quando as plântulas apresentavam um tamanho razoável eram utilizados segmentos nodais da mesma plântula, contendo igualmente dois nós. O meio de cultura base utilizado foi o meio OM (Olive Medium, Rugini, 1984), tendo-se apenas modificado o teor da fonte de carbono (manitol), que passou de 30 mg/L para 20 mg/L. Os meios possuíam ainda duas citocininas: 2 mg/l de BA (benziladenina) e 1 mg/l de zeatina. A todos os meios foram adicionados 6 g/l de agar (Cultimed) e o pH ajustado para 5,8 com

HCl e NaOH (ambas de 0,01 - 1,0 M). Depois de adicionados todos os componentes, o meio foi aquecido até dissolver o ágar e distribuído por tubos de ensaio que foram autoclavados a 120°C durante 20 min.

Em alguns ensaios a fonte de carbono utilizada foi a sacarose a 2,5% (w/v), de forma a verificar se existiam diferenças no comportamento dos explantes na presença dos dois tipos de açúcares. Também os reguladores de crescimento foram modificados, sendo utilizado 1 mg/l de BA e 0,1 mg/l de IBA.

Os segmentos mudados para meio fresco eram mantidos a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro e uma intensidade luminosa de 15-20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente activa.

## 2.2. Indução de embriogénese somática

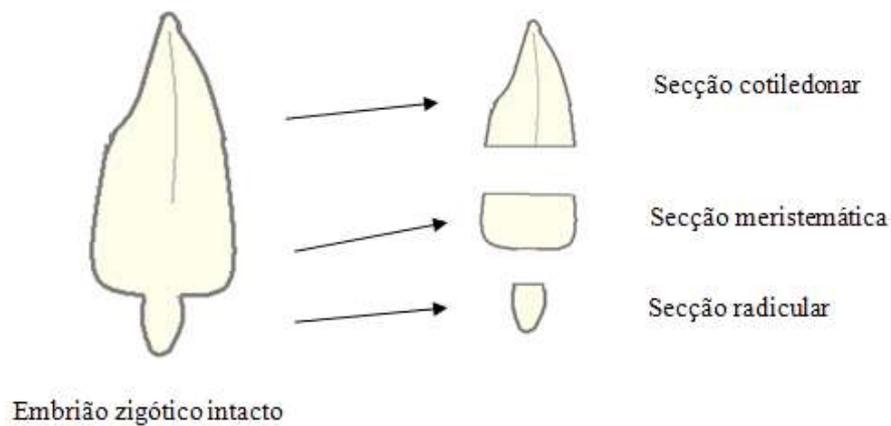
Os ensaios de embriogénese foram iniciados com os frutos maduros dos clones de oliveira 1061, o 2052 e o 502, dos quais foi retirado o embrião zigótico.

Após remoção do mesocarpo, os endocarpos foram desinfectados em hipoclorito de cálcio 7% (w/v) (Sigma), durante 10 minutos, e de seguida, lavados 3 vezes com água destilada esterilizada, com agitação. Com o auxílio de um torno, previamente pulverizado com etanol procedeu-se à abertura dos endocarpos e remoção das sementes. Estas foram também esterilizadas durante 10 minutos com hipoclorito de cálcio 5% (w/v) com agitação, seguida de três lavagens com água destilada esterilizada, numa câmara de fluxo laminar. As sementes foram mantidas *overnight* numa quantidade reduzida de água. No dia seguinte era feita uma terceira esterilização com etanol 70% (v/v) durante um minuto e depois durante 10 minutos com hipoclorito de cálcio 5% (w/v) de acordo com o procedimento já descrito.

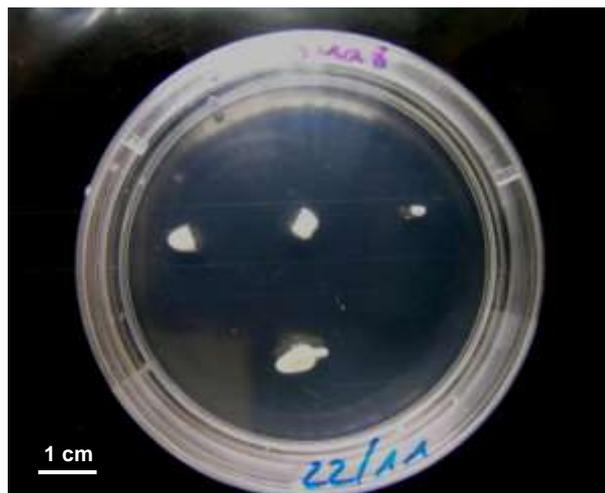


**Figura 10:** Fruto de oliveira mostrando os diferentes componentes do pericarpo e a semente (adaptado de <http://bio.mq.edu.au/dept/centres/pirel/petercuneo.html>)

Após esterilização, e utilizando uma câmara de fluxo laminar, procedeu-se à separação do embrião zigótico (Fig. 10) do endosperma e subsequente cultura em caixas de Petri com 6 cm de diâmetro contendo os meios indicados na tabela 1. Os embriões zigóticos (EZ) foram colocados nas caixas intactos ou seccionados em três partes: radicular, meristemática e cotiledonar (Fig. 11), sendo estas imediatamente colocadas no escuro a 25°C (Fig. 12).



**Figura 11:** Esquema representativo do embrião zigótico intacto e seccionado em três porções (cotiledonar, meristemática e radicular).



**Figura 12:** Aspecto da cultura dos embriões zigóticos em meios de indução de embriogênese somática. O explante localizado na parte inferior é um embrião intacto. Na parte de cima, da esquerda para a direita: parte cotiledonar, parte meristemática e parte radicular.

**Tabela 1:** Constituição dos meios utilizados para indução de ES em EZ maduros.

<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de ES</b> (meio base OM com 2,5% de sacarose)		
	<b>Meio</b>	<b>PGR (mg/l)</b>	
Embrião zigótico maduro	OMa	IBA (2)	
	OMb	IBA (5)	
	OMc	2,4-D (2)	
	OMd	2,4-D (5)	
	OMe	NAA (2)	2IP (0,5)
	OMf	NAA (5)	
	OMi	Picloram (2)	
	OMj	Picloram (5)	
<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de ES</b> (meio base OM com 8% sacarose)		
	<b>Meio</b>	<b>PGR (mg/l)</b>	
Embrião zigótico maduro	OMg	NAA (2)	
	OMh	NAA (5)	2IP (0,5)

Nota: 2IP (dimetil-alil-amino-purina), IBA (ácido indolbutírico), NAA (ácido naftaleno-acético) 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Num ensaio ulterior foram utilizados embriões zigóticos imaturos (estado cotiledonar) estando os meios de cultura indicados na tabela 2.

**Tabela 2:** Constituição dos meios utilizados para indução de ES em EZ imaturos.

<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de ES</b> (meio base OM com 3% de sacarose)	
	<b>Meio</b>	<b>PGR (mg/l)</b>
Embrião zigótico imaturo	OM	- - -
	OMA	2,4-D (1)
	OMB	IBA (1)
	OMC	2,4-D (1)
	OMD	NAA (1)

<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de ES</b> (meio base OM com 4% de sacarose)	
	<b>Meio</b>	<b>PGR</b> (mg/l)
Embrião zigótico imaturo	OMa4	IBA (2)
	OMg4	NAA (2)
	OMh4	NAA (5)
	OMi4	Picloram (2)
	2IP (0,5)	
<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de ES</b> (meio base OM com 8% sacarose)	
	<b>Meio</b>	<b>PGR</b> (mg/l)
Embrião zigótico imaturo	OMa8	IBA (2)
	OMg8	NAA (2)
	OMh8	NAA (5)
	OMi8	Picloram (2)
	2IP (0,5)	

Após um mês, nestes meios procedeu-se à transferência dos calos obtidos para meio fresco com a mesma composição mas, em alguns casos, contendo 50 mg/l de ácido ascórbico. Os embriões formados foram transferidos para meio OM base com 0,5 mg/l de NAA e a mesma concentração de 2IP com 4% de sacarose.

A percentagem de indução de embriogénese somática foi determinada após dois meses e os resultados analisados estatisticamente (secção 2.4).

### 2.3. Ensaio de indução de embriogénese polínica

Para os ensaios de EP, as inflorescências foram colhidas no mês de Maio e Junho, sendo o material normalmente utilizado no próprio dia da colheita ou no dia seguinte. Em algumas situações houve necessidade de manter as inflorescências no frio (4°C) por períodos de cerca de 3, 4, 7 e 9 dias, antes de realizar as culturas.

As flores (Fig. 13) eram escolhidas de acordo com o aspecto morfológico e tamanho, sendo utilizadas flores totalmente fechadas, com as sépalas ainda totalmente verdes e cerca de 2 mm de comprimento, e flores com as sépalas próximas da fase de abertura, com uma cor amarelo-esverdeado e com cerca de 3 mm de comprimento. Esta escolha foi feita com base num estudo de indução de EP na cultivar Arbequina (Pintos, 2007), em que foi verificado que é na fase em que a flor tem 2 mm, que a antera possui

micrósporos no estado uninucleado tardio e/ou grão de pólen no estado binucleado precoce, sendo a fase ideal para a indução de EP.



**Figura 13:** Flores de oliveira em diferentes estados de desenvolvimento.

Antes de iniciar a inoculação do material, foi feita uma análise microscópica dos micrósporos das anteras do tamanho 1 ao 7, referentes a cada uma das flores representadas na figura 13, tendo para isso sido feitos esmagamentos em carmim acético.

As flores foram divididas pelos dois tamanhos referidos anteriormente para posterior esterilização, que foi feita com hipoclorito de cálcio 7% (w/v), durante 20 minutos, seguida de três lavagens em água esterilizada, numa câmara de fluxo laminar. Também aqui, foram isoladas as duas anteras de cada flor, sendo colocadas nas caixas de Petri (6 cm de diâmetro) com o meio previamente preparado (Tabela 3), sendo colocadas seis anteras de cada tamanho em cada caixa conforme se pode observar na figura 14. Foram utilizadas dez caixas para cada meio testado, sempre com o meio OM, mas alterando os reguladores de crescimento e o agente gelificante. As caixas foram colocadas no escuro a 25°C.



**Figura 14:** Aspecto das anteras colocadas em cultura, em meio OM2b. Do lado esquerdo estão as anteras das flores com 2mm e do lado direito as anteras das flores com 3mm.

**Tabela 3:** Composição dos meios para indução de IP.

<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de EP</b> (meio base OM com 9% sacarose)		
	<b>Meio</b>	<b>PGR (mg/l)</b>	
Anteras com 2 ou 3 mm	OM1	2,4-D (1)	
	OM3	2,4-D (1)	BA (0,5)
	OM5	NAA (1)	
	OM6	NAA (2)	
	OM2	2,4-D (2)	
	OM4	2,4-D (2)	BA (1)
	OM7	NAA (1)	
	OM8	NAA (2)	
<b>Explante</b>	<b>Meio de indução de EP</b> (meio base OM com 6% sacarose)		
	<b>Meio</b>	<b>PGR (mg/l)</b>	
Anteras com 2 ou 3 mm	OMa	Cinetina (0,5)	
	OMb	Cinetina (1)	
	OMe	IBA (1)	Zeatina (0,5)
	OMf		Zeatina (1)
	OMi		2IP (0,5)
	OMj	2IP (1)	
	OMc	Cinetina (0,5)	
	OMd	Cinetina (1)	
	OMg	IBA (2)	Zeatina (0,5)
	OMh		Zeatina (1)
	OMk		2IP (0,5)
	OMl	2IP (1)	

Diferentes agentes gelificantes foram testados nos meios OM1 a OM8: 1) agar (6 g/l, Cultimed) nos meios OM1a a OM8a, 2) fitagel (2,5 g/l, Sigma) nos meios OM1b a OM8b, 3) agarose (8 g/l, Sea – Plaque) nos meios OM1c a OM8c. Para além de diferenças no agente gelificante, foram também testados tratamentos pelo frio (Tabela 4).

**Tabela 4:** Diferentes tratamentos pelo frio, duração e meio onde as respectivas anteras foram cultivadas.

Duração do tratamento pelo frio (4°C)	Meios	
3 dias	OM3b	OM1c
	OM4b	OM2c
	OM3c a OM6c	
4 dias	OM5b a OM8b	
7 dias	OM3c a OM6c	OM7c
		OM8c
9 dias	OMa a OMI	OMa a OMI

Com o objectivo de seguir o comportamento do material em cultura foram utilizadas diferentes técnicas para visualizar os núcleos dos micrósporos. Assim, algum do material foi tratado com DAPI ou iodeto de propídeo e observado em microscopia de fluorescência. Noutros ensaios, utilizou-se a coloração com o reagente de Schiff pela técnica de Feulgen (Schifino-Wittmann, 2001), que foi adoptada para corar as anteras não cultivadas e depois as anteras em cultura. As anteras foram hidrolisadas em HCl 1N em banho-maria a 60°C, durante 6 e 10 minutos e transferidas para HCl 1N à temperatura ambiente para depois serem coradas com o reagente de Schiff durante 1-3 h, no escuro. De seguida fez-se o esmagamento do material em ácido acético a 45% (v/v) e a preparação foi observada num microscópio óptico (Nikon Eclipse E400), sendo as imagens captadas com a câmara Nikon Digital Sight DS-U1 e com o software Act-2U. Algumas anteras em cultura, foram também esmagadas em carmim acético e, após, remoção dos restos da parede da antera, os micrósporos observados ao microscópio.

Os calos obtidos, com aspecto de terem origem nos grãos de pólen, foram mantidos em quatro meios diferentes, apresentados na tabela 5.

**Tabela 5:** Constituintes do meio de manutenção dos calos obtidos da cultura de anteras.

Explante	Meio de manutenção (meio base OM com 6% sacarose)		
	Meio	PGR (mg/l)	
Calos da cultura de anteras	OMI	NAA (0,5)	Cinetina (2)
	OMII	NAA (1)	
	OMIII	NAA (0,5)	Cinetina (1)
	OMIV	NAA (1)	

As culturas foram analisadas após um mês a um mês e meio, sendo contabilizadas as anteras onde se observou formação de calo.

#### 2.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos na indução de embriogênese somática e polínica foi realizada através de uma ANOVA (Statistica 7.0).

#### 2.5. Ensaios com marcadores genéticos

##### 2.5.1. Extração de DNA genómico

Na extração de DNA os factores de contaminação têm que ser minimizados (RNA, polissacarídeos, outras enzimas, etc...), de forma a que posteriormente não seja posta em causa a execução da técnica de PCR.

Assim, recorreu-se a um método simples e eficaz de extração de DNA, que minimiza e elimina todos os constituintes intrínsecos da plantas que poderiam interferir de forma negativa nos resultados desejados.

Folhas jovens de cada um dos cultivares foram colocadas num almofariz e maceradas com azoto líquido (-196°C) e, posteriormente, o macerado (100 mg) transferido para um *ependorf*. Para extrair o DNA foi utilizado o kit de extração *DNeasy® Plant Mini Kit* da Qiagen, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Ao material macerado adicionou-se um tampão de lise e uma RNase para hidrolisar as

células e o RNA, respectivamente, numa incubação a 65°C. Posteriormente, procedeu-se à precipitação dos polissacáridos e proteínas, que juntamente com os restos celulares foram removidos através da adição de tampões e filtração na coluna *QIAshredder*. Após passagem por uma nova coluna O DNA foi finalmente eluído num tampão (cerca de 100ml) e sujeito a quantificação (Fig. 15).



**Figura 15:** Esquema de extração de DNA, segundo o protocolo de *DNeasy® Plant Mini Kit* (adaptado de Qiagen).

### 2.5.2. Quantificação de DNA

Numa fase inicial procedeu-se à confirmação da existência de DNA nas amostras através de uma separação electroforética num gel de agarose (Bioron) a 1% com GelRed (5 µl/100 ml; Biotium) incorporado, durante uma hora a 80 volts, numa

tina Biorad Mini-Sub Cell GT. Tendo-se feito a quantificação comparando as bandas obtidas com o marcador de DNA HyperLadder-II (Bioline). No entanto, desta forma apenas se obtém uma estimativa da concentração de DNA existente nas amostras, tendo-se recorrido a espectrofotometria (ND-1000, NanoDrop Technologies), também com o intuito de saber se as amostras tinham um nível de pureza aceitável.

### 2.5.3. Protocolo de RAPDs

Para este trabalho foram utilizados vinte *primers* decâmeros, os que compõem o kit C (Operon Technologies) (Tabela 6), sendo considerados bons marcadores genéticos para fazer distinções entre cultivares (Gemas, 2004).

**Tabela 6:** Sequência no sentido 5'-3' dos 20 *primers* do Kit C.

<b>Primer</b>	<b>Sequencia 5'-3'</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequencia 5'-3'</b>
OPC-1	TTCGAGCCAG	OPC-11	AAAGCTGCGG
OPC-2	GTGAGGCGTC	OPC-12	TGTCATCCCC
OPC-3	GGGGGTCTTT	OPC-13	AAGCCTCGTC
OPC-4	CCGCATCTAC	OPC-14	TGCGTGCTTG
OPC-5	GATGACCGCC	OPC-15	GACGGATCAG
OPC-6	GAACGGACTC	OPC-16	CACACTCCAG
OPC-7	GTCCCGACGA	OPC-17	TTCCCCCAG
OPC-8	TGGACCGGTG	OPC-18	TGAGTGGGTG
OPC-9	CTCACCGTCC	OPC-19	GTTGCCAGCC
OPC-10	TGTCTGGGTG	OPC-20	ACTTCGCCAC

### 2.5.3.1. Polymerase Chain Reaction

A reacção de PCR foi preparada de acordo com a o que está decrito na tabela 7.

**Tabela 7:** Constituintes da mistura para a reacção de PCR (20 µl).

Constituintes da mistura	Solução Stock	Concentração final (20 µl)
Tampão (Bioron)	5X	1X
Magnésio (Bioron)	100 mM	2,5 mM
dNTPs (Bioline)	100 mM	0,2 mM
<i>Primer</i>	100 µM	0,2 µM
<i>Taq Polimerase</i> (Bioron)	5 U	0,5 U
DNA genómico	-	-
Água ultrapura estéril	-	-

### 2.5.3.2. Condições de amplificação

A amplificação de DNA foi feita num Termo Ciclador (BioRad), utilizando as condições descritas na tabela 8, tendo sido realizadas duas réplicas para cada *primer*.

**Tabela 8:** Sequência de procedimentos da reacção de PCR.

Passos	T (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	94	5 minutos
Desnaturação	94	30 segundos
<i>Annealing</i>	35	45 segundos
Extensão	72	90 segundos
Extensão final	72	10 minutos
<i>Terminus</i>	15	<i>Forever</i>

35 ciclos

### 2.5.3.3. Separação e visualização dos produtos de amplificação

Os produtos resultantes da reacção de PCR foram separados por electroforese, num gel de agarose (Bioron) a 1% com GelRed (5 µl/100 ml; Biotium) incorporado, utilizando-se o tampão TBE 1x (Biorad). A electroforese foi corrida a uma voltagem de 90 V durante 10 minutos e depois a 80 V durante 2 horas e 20 minutos, numa tina

Biorad Mini-Sub Cell GT utilizando 10 µl do produto de PCR para cada amostra, igual volume do controlo negativo e positivo e 4 µl de um marcador de referência (HyperLadder II - Bioline).

No final de cada electroforese, o gel foi observado em UV e a imagem foi captada no aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BioRad), com o software Image Lab™.

### 2.5.4. Análise de dados

Quando todas as reacções de amplificação necessárias estavam realizadas e os seus produtos corridos em gel de electroforese, as respectivas imagens foram analisadas. Com base nesta informação construiu-se uma matriz binária com a presença (1) e a ausência (0) de bandas polimórficas, sendo posteriormente feita uma análise multivariada, com o auxílio do programa NTSYSpc. v2.02 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).

Nessa análise multivariada, foram estimados os coeficientes de similaridade, utilizando o coeficiente de Dice (Dice, 1945), em que o número de bandas comuns a ambos os indivíduos é dividido pela soma do mesmo com o número total de bandas presentes num e noutro indivíduo (Andreia, 2002).

Os valores do coeficiente variaram entre 0 e 1 (quanto mais próximos de 1 forem os valores dos índices, maior será a semelhança entre os indivíduos). Com estes valores do coeficiente foi realizada uma análise de conjuntos (“clusters”), utilizando o método de agrupamento UPGMA (*unweight pair-group method using arithmetic averages*), obtendo-se assim um dendrograma. Para testar a confiança dos resultados obtidos no dendrograma, foi realizado o teste de mantel. Posteriormente, realizou-se uma análise de componentes principais (APC) com base na matriz binária de dados das sete variedades a analisar.

### 3. Resultados

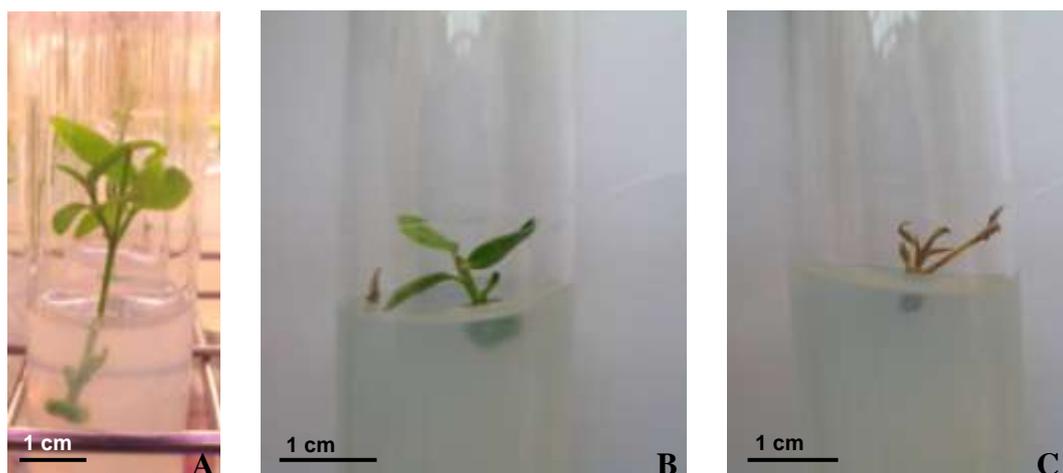
#### 3.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira

Nas culturas dos três clones de plântulas (A, B e C), mantidas em meio base OM com BA e zeatina (Fig. 16A), estava presente uma grande contaminação pelas bactérias endógenas, que condicionava o crescimento dos ápices repicados para meio fresco, sendo que os clones com uma contaminação maior tinham um menor crescimento (Fig. 16B). O clone C foi o que apresentou uma maior contaminação, seguida do A e depois do B.



**Figura 16:** Micropropagação de plantas de oliveira. A – Culturas iniciais. B- Segmento nodal após subcultura.

Com o objectivo de verificar o seu efeito na multiplicação alguns constituintes do meio foram modificados. Assim, utilizaram-se combinações de BA e IBA e sacarose como fonte de carbono. Cinco semanas após estas modificações, as plântulas estavam com um verde ainda viçoso, apesar de terem evidenciado um crescimento menor (Fig. 17A) relativamente a períodos de tempo semelhantes em meio OM com BA e zeatina (Fig. 17B). Na semana que se seguiu, as plântulas demonstraram uma grande perda de vigor, havendo um grande número de indivíduos a secarem repentinamente (Fig. 17C). Foram então colocados em meio fresco, voltando a utilizar-se o meio OM com BA e zeatina.



**Figura 17:** Aspectos da propagação de oliveira. (A) Plântula do clone B em meio com BA, zeatina e manitol. (B) Plântula do clone C em meio com BA, IBA e sacarose. (C) Plântula do clone B, nas mesmas condições que (B).

Curiosamente, o clone C, que inicialmente era o mais contaminado, por isso mais difícil de manter, depois de ter estado em meio diferente foi o que demonstrou um aspecto melhor durante mais tempo, seguindo-se o clone B e depois o A.

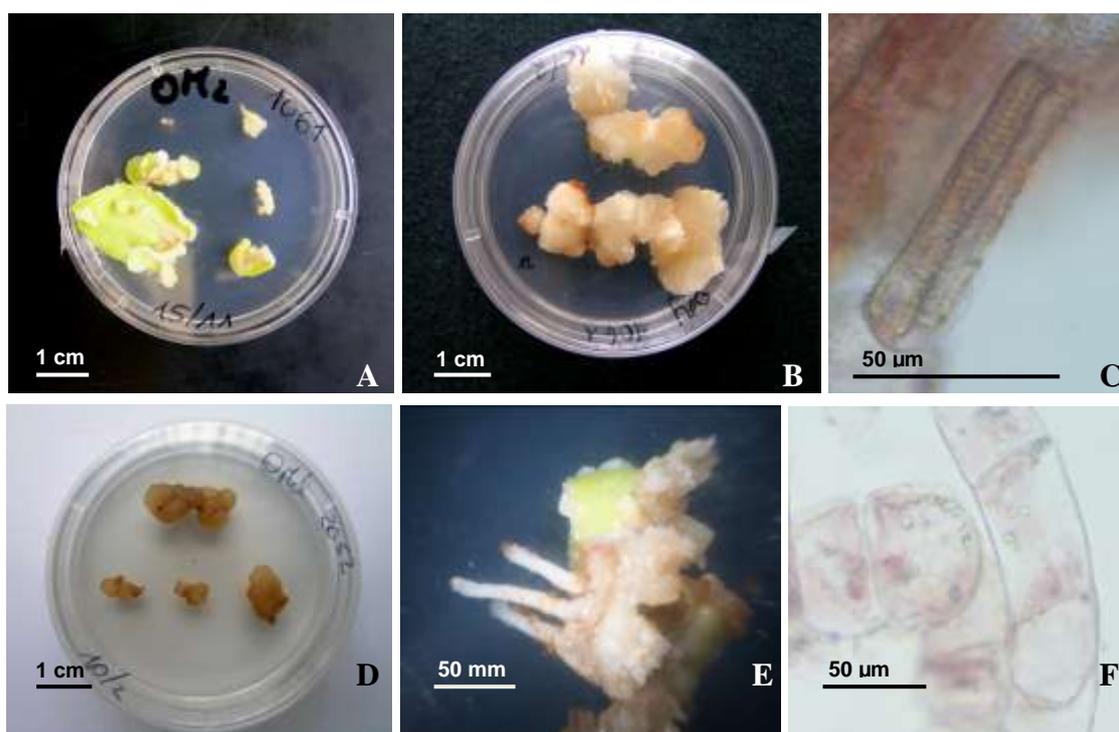
Nos ensaios seguintes foram efectuadas várias subculturas com o objectivo de manter e multiplicar as plantas. No entanto, os ensaios mostraram que ocorria sempre uma intensa contaminação dos explantes após alguns dias de cultura (7-14 dias), tornando assim inviável a realização de ensaios ulteriores com vista à análise do efeito dos reguladores de crescimento e da fonte de carbono na multiplicação.

### 3.2. Indução de embriogénese somática

#### Embriões zigóticos maduros

Nos ensaios de indução de ES em embriões zigóticos maduros, foram utilizados vários meios, com combinações de auxinas e citocininas diferentes, tendo a resposta sido condicionada pela composição em reguladores de crescimento. Após cerca de um mês de cultura registaram-se diferenças notórias no que diz respeito à formação de calo e ao aspecto que as proliferações celulares apresentavam. Assim, alguns explantes permaneciam ainda verdes e mostravam um forte alongamento. Em algumas zonas destes explantes eram visíveis pequenos calos (Fig. 18A). Noutros casos, os calos

apresentavam um crescimento acentuado e uma coloração acastanhada. A análise microscópica dos calos mostrou que havia alguma diferenciação celular, pois alguns deles mostraram a presença de elementos traqueais (Fig. 18C) juntamente com as células vacuolizadas típicas dos calos. Alguns explantes formaram ainda calos com capacidade de crescimento mais reduzido e que oxidavam muito mais rapidamente (Fig. 18D). A formação de raízes adventícias nos calos ocorreu com frequência e a análise citológica destes calos apenas revelou a presença de células muito alongadas e vacuolizadas (Fig. 18E).

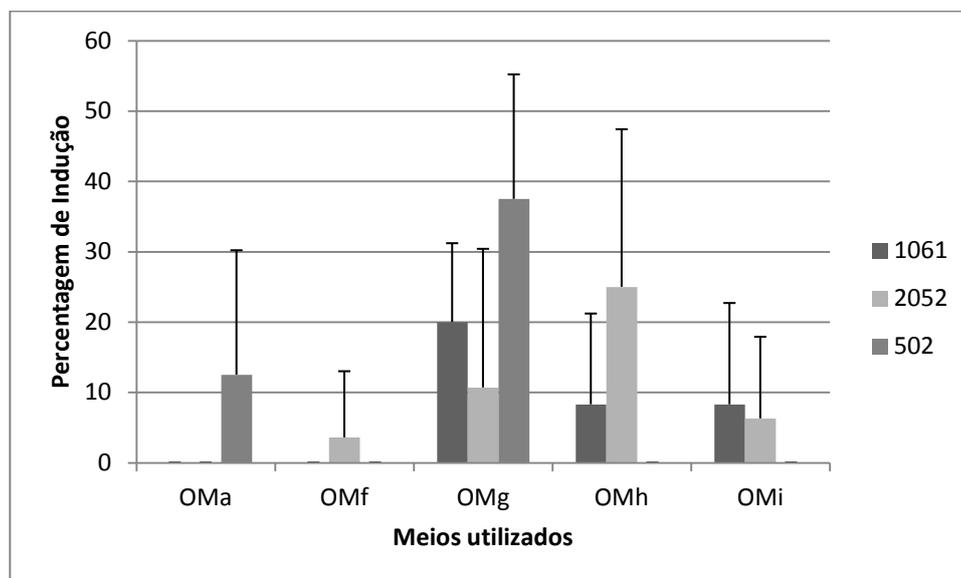


**Figura 18:** Resposta dos explantes às condições de cultura. (A) Cultura de embriões zigóticos do clone 1061 em meio OMe sendo visível o alongamento e a formação de pequenos calos. (B) Calos obtidos pela cultura de embriões zigóticos do clone 1061 em meio OMj. (C) Elementos traqueais presentes num calo do clone 1061 no meio OMf. (D) Resposta dos embriões zigóticos pertencentes ao clone 2052 em meio OMd. (E) Formação de raízes adventícias em embriões do clone 502 cultivados em meio OMh. (F) Células alongadas e vacuolizadas observadas por esmagamento em carmim acético de uma porção de calo obtida em OMg, no clone 2052.

A formação de estruturas embrionárias, embora anómalas, foi observada quando se procedeu à cultura de embriões zigóticos, nos seguintes meios: OMg (2,0 mg/l de NAA, 0,5 mg/l de 2IP e 8% de sacarose) e OMh (5,0 mg/l de NAA, 0,5 mg/l de 2IP e

8% de sacarose), após cerca de dois meses de cultura. A maior percentagem de indução foi conseguida no meio OMg com o clone 502 (Fig. 19).

O número de estruturas embrionárias por explante induzido era, em geral baixo, sendo o mais comum a formação de 1-2 embriões por explante. Em casos excepcionais foram detectados seis ou sete embriões por explante.

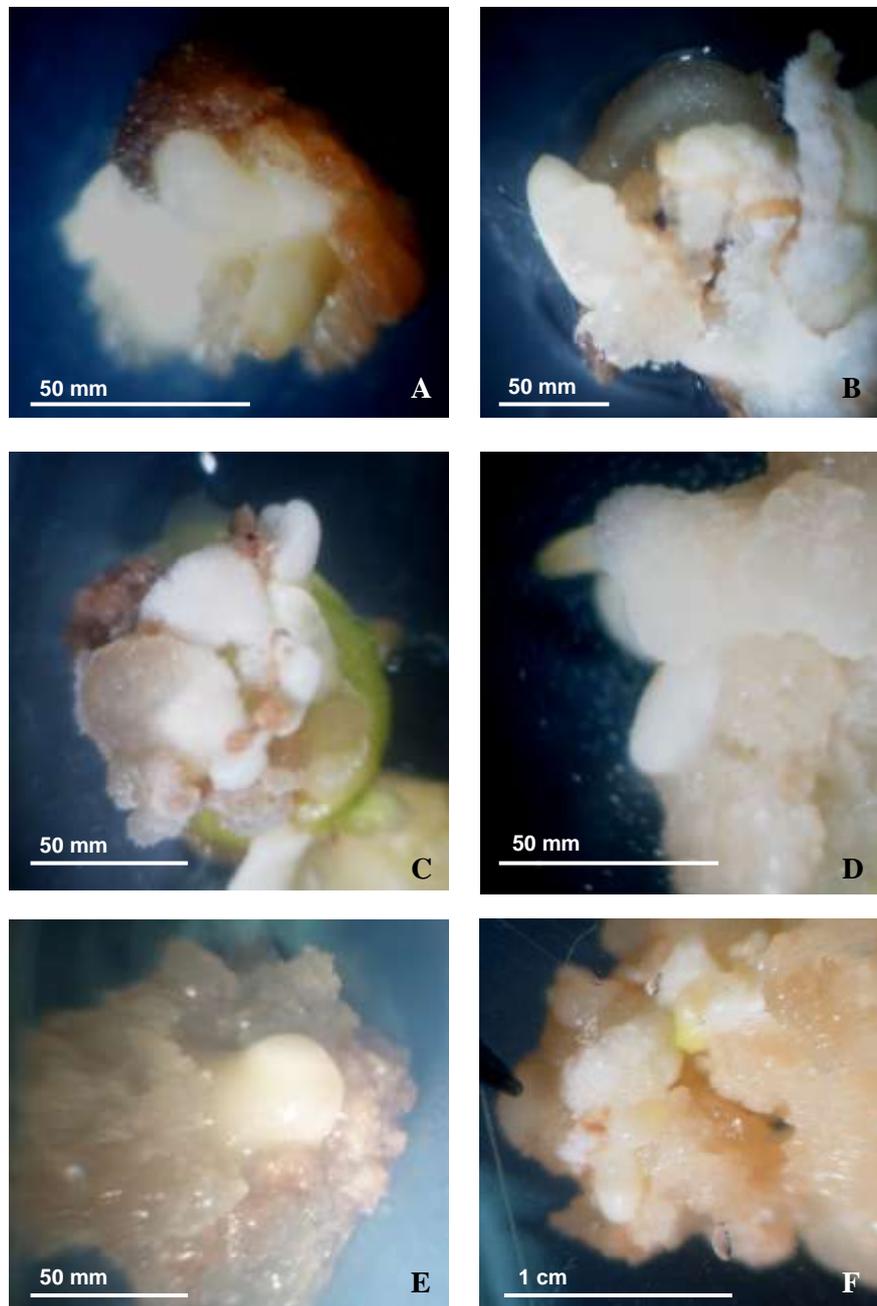


**Figura 19:** Efeito de diferentes meios de cultura na indução de embriogénese somática em oliveira. Resultados obtidos após cerca de dois meses de cultura. Cada valor é a média em percentagem, e o respectivo desvio padrão, para um número variável de réplicas. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito à forma como se procedeu à cultura dos explantes, os resultados indicaram que os melhores resultados foram obtidos com embriões zigóticos do clone 502, independentemente dos explantes serem cultivados intactos ou seccionados. Ainda neste clone, os explantes intactos ou as secções cotiledonar e meristemática (apical caulinar) foram aquelas onde se obtiveram as maiores frequências de indução (meio OMg com 100% de indução nos explantes intactos). Em todos os meios testados, a secção radicular foi aquela onde a indução foi mais reduzida.

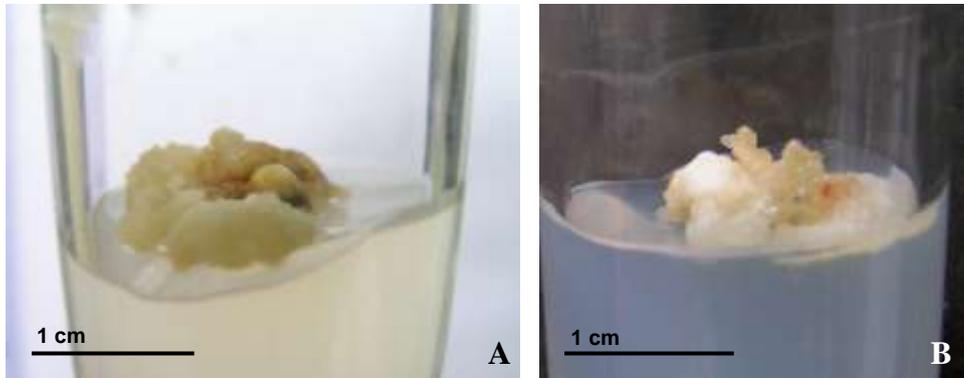
Como já foi referido, as estruturas embrionárias formadas tinham um aspecto anómalo, normalmente sem a diferenciação dos cotilédones (Fig. 20). Este aspecto,

verificou-se em todos os ES formados, independentemente do meio de cultura em que se encontravam e do clone a que pertencia o explante.



**Figura 20:** Aspecto das estruturas embrionárias formadas em diferentes meios de cultura e a partir de diferentes clones: (A) Secção radicular do clone 502 no meio OMa. (B) EZ intacto do clone 1061 no meio OMg. (C) Secção cotiledonar do clone 2052 no meio OMg. (D) Secção cotiledonar do clone 2052 no meio OMh. (E) Secção cotiledonar do clone 2052 no meio OMi. (F) EZ intacto do clone 502 no meio OMg.

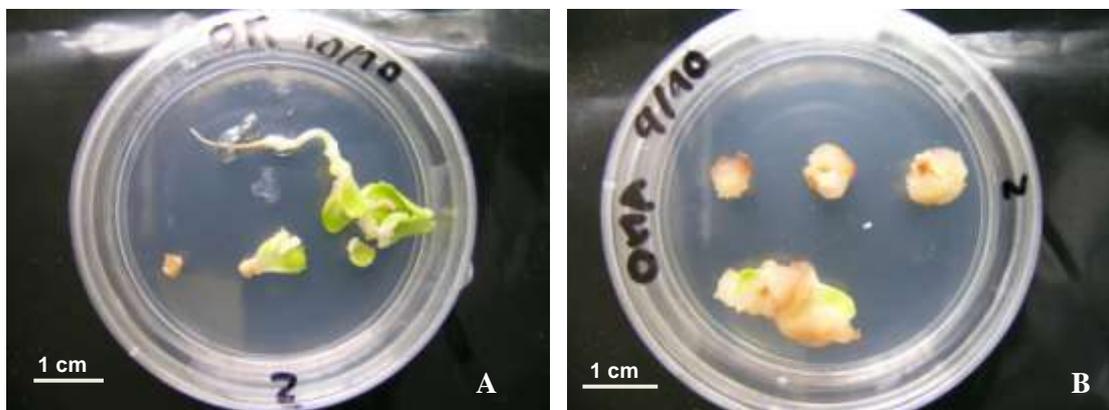
Os embriões somáticos que se formaram, foram transferidos para o meio OM base com 0,5 mg/l de NAA e a mesma concentração de 2IP com 4% de sacarose, não se tendo verificado a proliferação das estruturas embrionárias tendo ocorrido, pelo contrário, a desdiferenciação dos embriões e consequente formação de calo (Fig. 21).



**Figura 21:** Comportamento dos embriões somáticos após transferência para meio OM com 0,5 mg/l de NAA e 2IP. (A) Embrião somático inicialmente formado na secção meristemática do clone 502 em meio OMg. (B) Embrião somático formado num EZ intacto do clone 1061 em meio OMh.

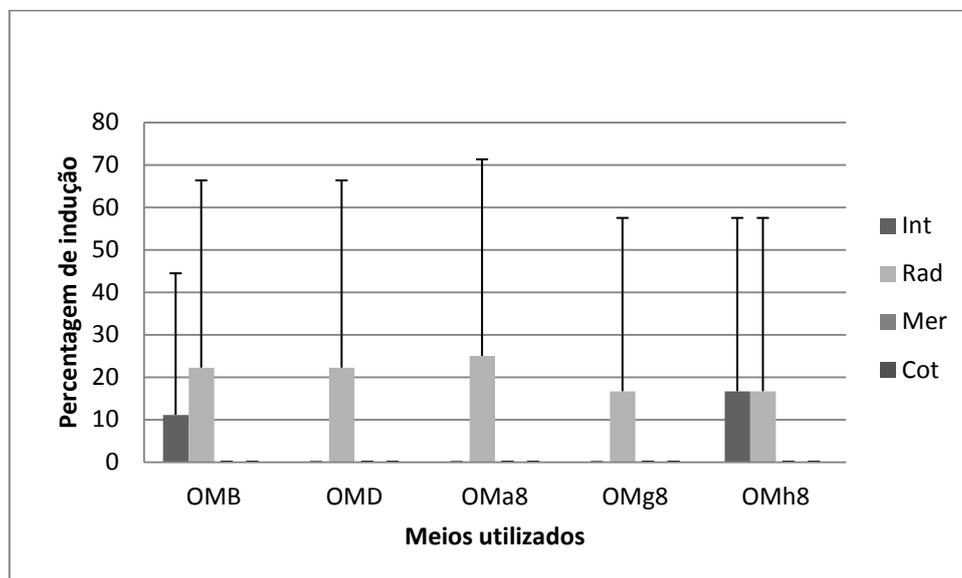
#### Embriões zigóticos imaturos

Nos ensaios de indução de ES em embriões imaturos não se observou uma discrepância tao acentuada no aspecto do calo desenvolvido em função dos diferentes tratamentos. No meio OM, sem reguladores de crescimento, praticamente não ocorreu formação de calo (Fig. 22A) enquanto nos outros meios os calos apresentaram uma reduzida capacidade de proliferação e tendência para oxidar (Fig. 22B).



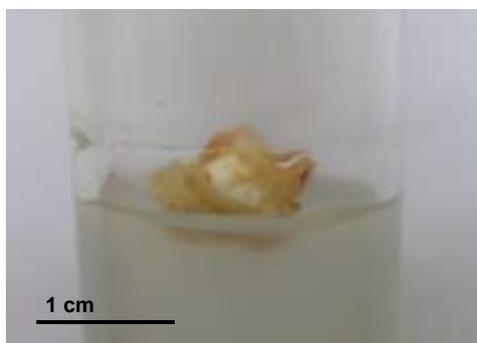
**Figura 22:** Aspecto dos EZ em cultura no meio OM (A), e OMA (B) após um mês em cultura.

Cerca de dois meses depois do início das culturas, estas foram analisadas para ser determinada a percentagem de indução de embriogénese somática. Esta foi muito reduzida (Fig. 23), havendo poucos explantes a formarem embriões somáticos e, naqueles em que este tipo de resposta se verificou, o número nunca foi superior a um.



**Figura 23:** Indução de embriogénese somática em embriões zigóticos imaturos cultivados em diferentes meios. Cada valor é a média em percentagem, e o respectivo desvio padrão, para um número variável de réplicas. Não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os embriões somáticos formados tinham um aspecto idêntico aos obtidos a partir dos EZ maduros e, tal como se verificou nesses ensaios, na transferência para meio OM com NAA e 2IP não se originaram novos embriões, apenas calo (Fig. 24).

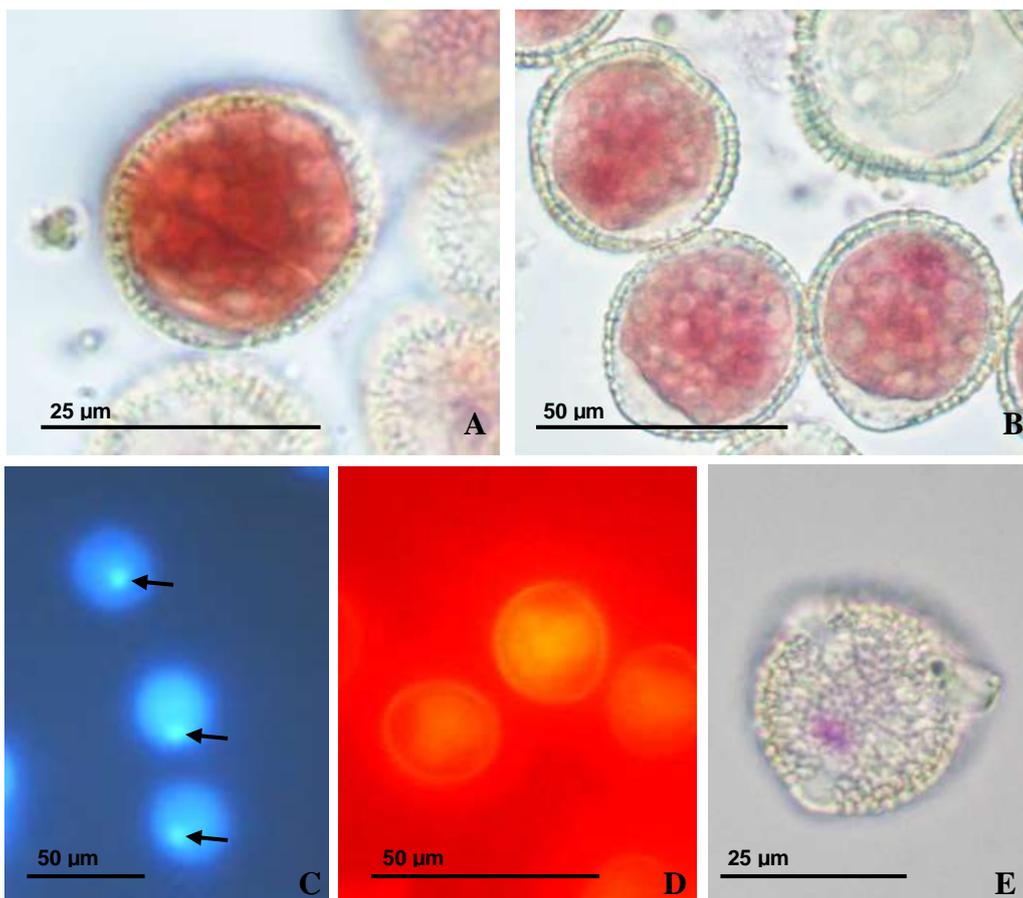


**Figura 24:** Embrião somático após duas semanas em meio OM com 0,5 mg/l de NAA e 2IP e 4% de sacarose.

### 3.3. Ensaios de indução de embriogênese polínica

Na análise microscópica dos diferentes tamanhos (Fig. 25), quando utilizado o carmim acético, o DAPI e o iodeto de propídeo não foi possível ver com clareza o núcleo, para assim ter a noção do estado de desenvolvimento do micrósporo.

Análises citológicas realizadas com carmim acético com o objectivo de determinar o estado de desenvolvimento do pólen mostraram que este corante permitia visualizar o núcelo do micrósporo (Fig. 25A), embora por vezes de forma não muito nítida (Fig. 25B). Observações com DAPI permitiram também observar por vezes o núcleo do micrósporo (Fig. 25C) enquanto com iodeto de propídeo tal não se verificou (Fig. 25D), pois todo o grão era corado, aparecendo tudo azul ou vermelho, respectivamente, havendo apenas um número muito ínfimo com o núcleo distinguível corado com DAPI.

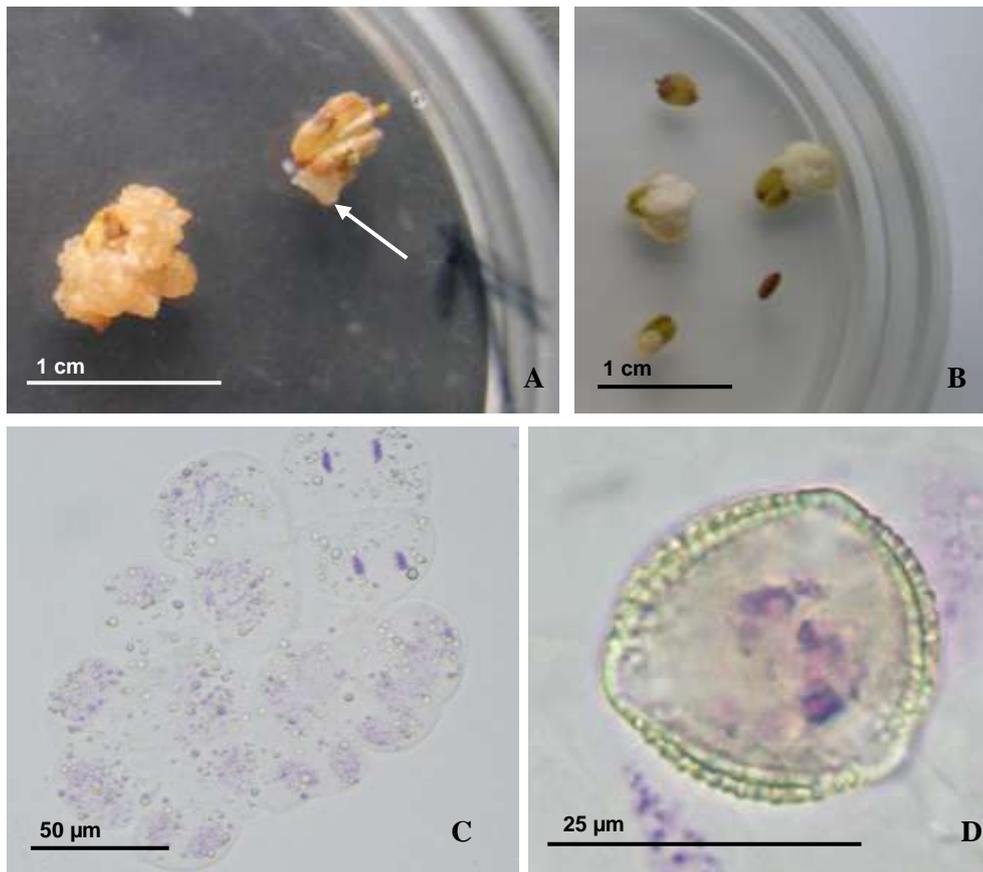


**Figura 25:** Grãos de pólen corados utilizando diferentes técnicas. (A e B) Micrósporos corados com carmim acético. Notar na figura A, a formação de duas células semelhantes. (C) Micrósporos corados com DAPI, indicados pelas setas. (D) Micrósporos corados com iodeto de propídeo. (E) Micrósporo corado com reagente de Schiff.

Tendo em conta a dificuldade em observar de forma nítida os núcleos dos micrósporos, procedeu-se também a uma coloração com reagente de Schiff. Neste caso, foi possível visualizar bem os núcleos (Fig. 25E), não sendo corado o resto do micrósporo como acontecia com os outros corantes.

Nos ensaios de cultura de anteras não se observou a formação de embriões polínicos. No entanto, em muitas anteras, verificou-se a formação de calo e, em algumas delas, os calos pareciam surgir do interior das anteras, sugerindo um possível envolvimento dos micrósporos/pólen na sua formação (Fig. 26A). Após cerca de um mês de cultura, das 2100 anteras inoculadas no tamanho 3 (2 mm), 288 apresentaram formação de calo, sendo que apenas 12 poderiam ter origem nos grãos de pólen (Fig. 26A). O mesmo número de anteras inoculadas no tamanho 6 (3 mm), mostrou que 186 formaram calo e, destes, 21 pareciam ter origem no grão de pólen, sendo que os restantes teriam origem em tecidos da antera ou do filete (Fig. 26B). Os calos apresentavam uma cor amarelada, e as suas células um aspecto arredondado (Fig. 26C) Isto dá-nos uma percentagem de indução reduzida, 13,7% para o tamanho mais pequeno (3) e 8,9% para o tamanho maior (6). Não houve formação de calo nos meios de OM5c a OM8c, e nos meios de OMa a OMg e de OMi a OMI.

Apesar de apenas se ter obtido calo, squashes de material em cultura, corados com o reagente de Schiff, mostraram que em alguns casos havia presença de grãos de pólen multinucleados, como se verificou em anteras do tamanho mais pequeno, nos meios OM4a (Fig. 26D) e OM5b.



**Figura 27:** Anteras em cultura. (A) Calo (seta) formado numa antera do tamanho 6 no meio OM2b, com possível origem grãos de pólen, após três semanas em cultura. (B) Calo formado a partir de tecidos da antera e filete. (C) Aspecto arredondado das células do calo após coloração pelo reagente de Schiff. (D) Grão de pólen multinucleado corado pelo reagente de Schiff (meio OM4a após cerca de mês e meio de cultura).

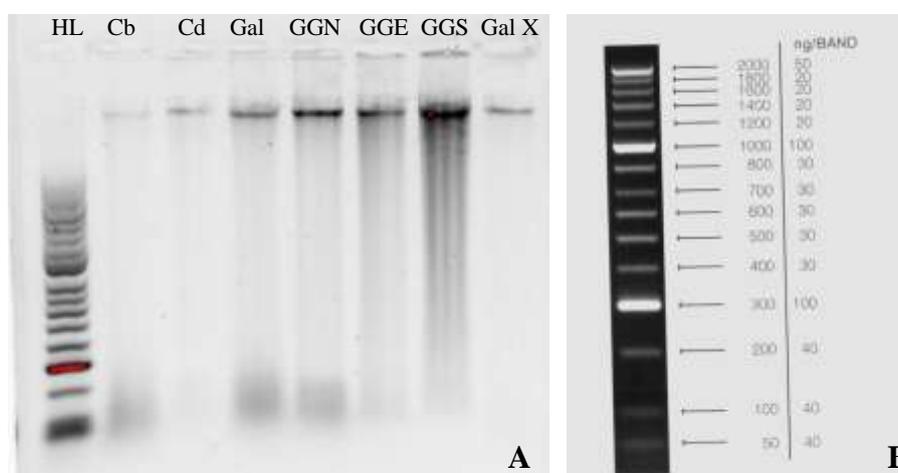
A manutenção das anteras a baixas temperaturas mostrou que quanto maior o número de dias de tratamento menor foi a formação de calo. Nos meios com anteras submetidas a 4°C durante 9 dias, apenas se verificou a formação de calos em anteras do tamanho 3 cultivadas em meio OMh.

As anteras que supostamente apresentavam formação de calos com origem polínica foram transferidas para meios de manutenção oxidando rapidamente após cerca de 3 semanas.

### 3.5. Ensaios com marcadores genéticos

#### 3.5.1. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose (Fig. 27A), por comparação com um marcador de concentração conhecida (HyperLadder™ II) (Fig. 27B) do qual foi adicionado 4 µl no primeiro poço e a mesma quantidade de cada a amostra nos seguintes (da esquerda para a direita: Cobrançosa – Cb, Cordovil de Serpa – Cd, Galega vulgar – Gal, Galega Grada Normal – GGN, Galega Grada de Évora – GGE, Galega Grada de Serpa – GGS e uma Galega X – Gal X).



**Figura 27:** (A) Gel de agarose (1%) onde se pode visualizar o DNA das diferentes amostras, (imagem invertida). (B) *Ladder* com a quantidade de DNA em ng/Banda.

As mesmas amostras foram quantificadas no NanoDrop, tendo-se confirmado a existência de DNA suficiente para realizar as reacções de PCR, sendo que a variedade Cb era a que apresentava um nível de pureza menos aceitável (Tabela 9), tendo sido necessário proceder a novas extracções de DNA até obter um valor próximo do ideal (1,82).

**Tabela 9:** Quantificação do DNA no NanoDrop.

Amostra	Nucleótidos (ng/µl)	Grau de pureza (260 ng/280µl)
Cb	15,5	-0,71
Cd	34,1	1,61
Gal	120,1	1,95
GGN	95	1,83
GGE	72,4	1,71
GGS	50,6	1,81
Gal D	30,6	1,61

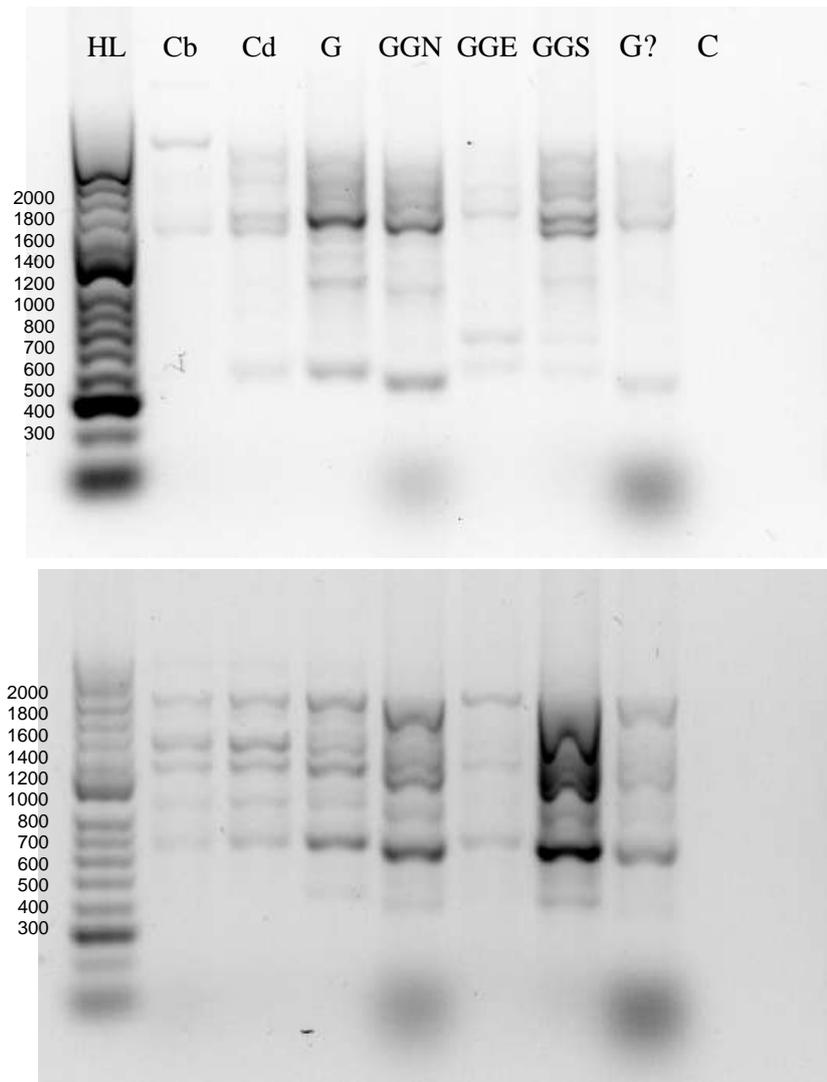
### 3.5.2. Separação e visualização dos produtos de amplificação

Para todos os *primers* utilizados, o número total de bandas formado foi de 140, sendo que dessas, 133 eram polimórficas. De todos os *primers* em estudo, nenhum deles apresentou exclusivamente bandas monomórficas. Assim a percentagem de polimorfismo foi muito elevada.

**Tabela 9: Relação do número de bandas (polimórficas e monomórficas)/*primer*.**

<i>Primer</i>	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	Total de bandas	% polimorfismo
OPC1	2	7	9	77,7
OPC2	0	11	11	100
OPC3	0	0	0	0
OPC4	3	3	6	50
OPC5	0	7	7	100
OPC6	1	12	13	92,3
OPC7	0	10	10	100
OPC8	0	3	3	100
OPC9	0	0	0	0
OPC10	1	11	12	91,7
OPC11	0	3	3	100
OPC12	0	7	7	100
OPC13	0	6	6	100
OPC14	0	11	11	100
OPC15	0	6	6	100
OPC16	0	6	6	100
OPC17	0	0	0	0
OPC18	0	9	9	100
OPC19	0	7	7	100
OPC20	0	14	14	100
	7	133	140	0,95

Existe um elevado número de *primers* que apresentaram 100% de polimorfismo - OPC14 (Fig. 28A), OPC-2, OPC-5, OPC-7, OPC-8, OPC-11 a OPC-16 e OPC-18 a OPC-20. No entanto verifica-se também a existência de *primers* cuja taxa de polimorfismo é mais reduzida, nomeadamente o OPC4 com 50% bandas polimórficas (Fig. 28B). Houve no entanto *primers* em que não se verificou qualquer amplificação de DNA, sendo eles o OPC3, OPC9 e OPC17.



**Figura 28:** Imagem invertida do gel de electroforese. (A) Produto de amplificação do *primer* OPC14. (B) Produto de amplificação do *primer* OPC4.

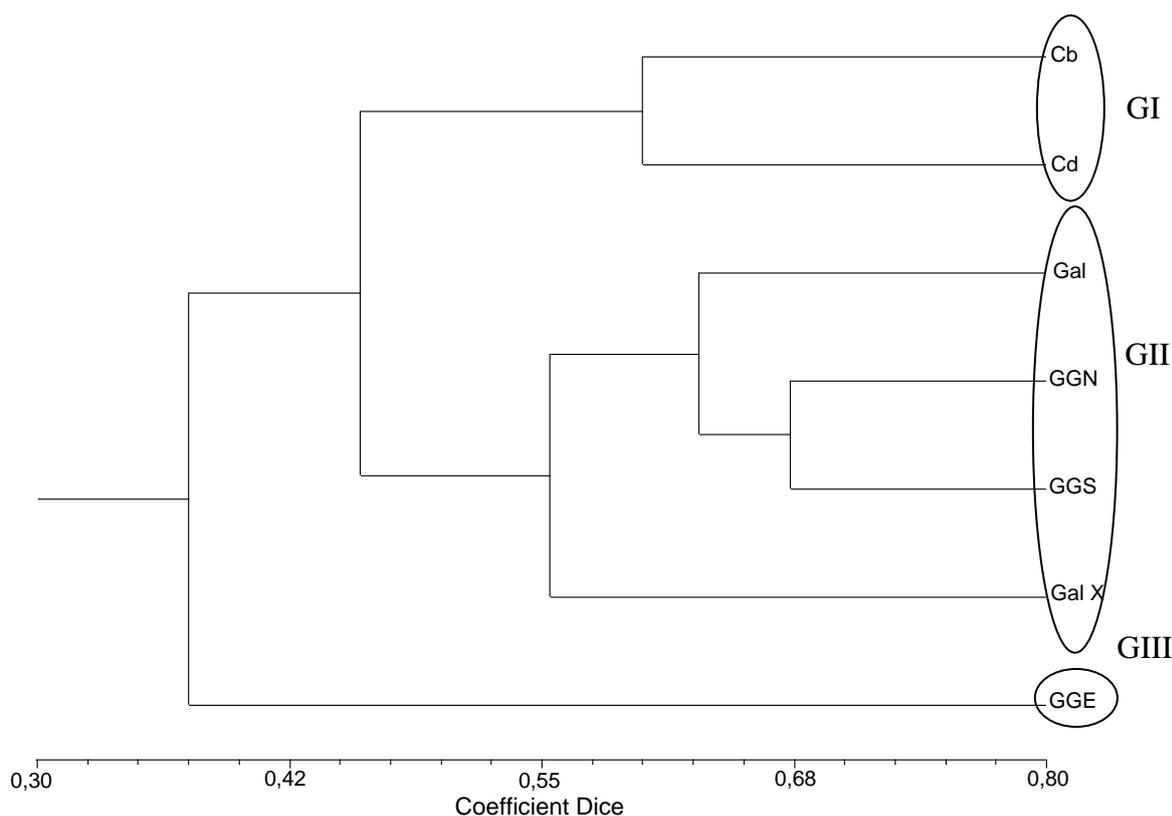
### 3.6. Análise de dados

Tendo por base a análise de todas as bandas (polimórficas e monomórficas), foi elaborada uma matriz binária (1,0) compatível com o software NTSYs pc no qual foi introduzida e analisada. A análise da similaridade genética, foi feita através do algoritmo de Dice<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Coeficiente Dice =  $\frac{2a}{2a + b + c}$

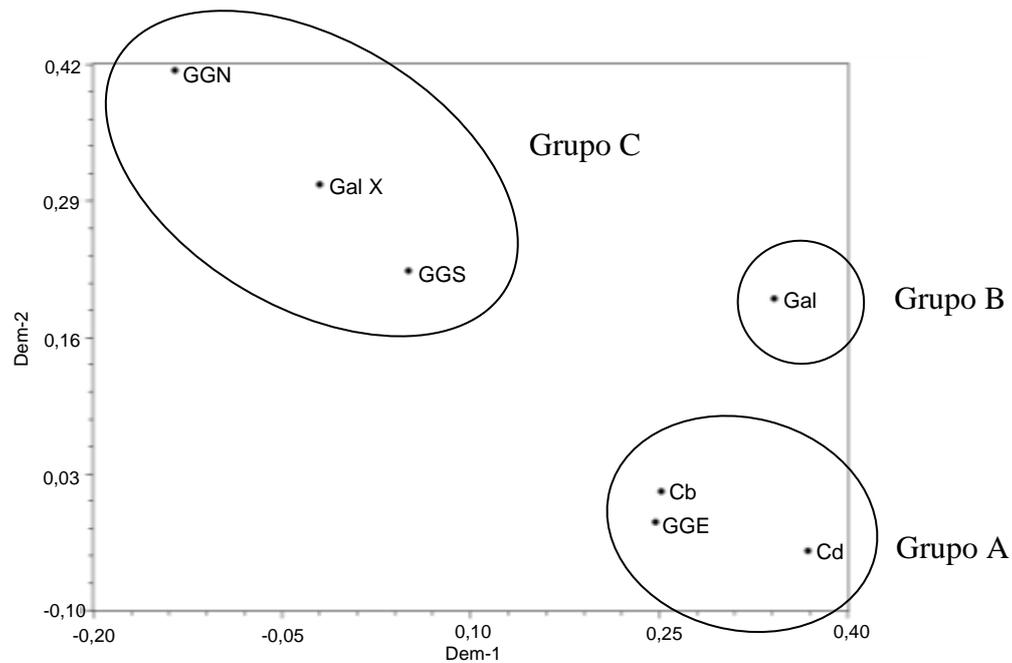
Foi então possível agrupar as amostras em três grupos distintos. No grupo I foram incluídos os cultivares Cobrançosa e a Cordovil com um índice de similaridade de 60% (Grupo I); 2) no grupo II Galega vulgar, Galega Grada Normal, Galega Grada de Serpa e Galega X com um índice de similaridade de 46%; e num último grupo foi colocada a Galega Grada de Évora (Fig. 29).



**Figura 29:** Dendrograma obtido através do coeficiente Dice, utilizando o método de agrupamento UPGMA, para as sete amostras.

A representatividade da análise dos *grupos* foi determinada calculando os valores cofenéticos. Deste modo, comparou-se a matriz dos dados cofenéticos do coeficiente de Dice com a respectiva matriz de similaridade genética tendo-se obtido um grau de relação entre as duas matrizes, ou seja, uma correlação cofenética ou correlação do teste de Mantel ( $r$ ). O grau de confiança da análise foi determinado aplicando o teste de *bootstrap* (1000 repetições). O valor de  $r$  usa-se como medida de qualidade na correlação da análise de *grupos* efectuada, ou seja, permite verificar se o dendrograma representa de forma correcta a matriz de similaridade original. Para o caso em que a análise foi feita com base no coeficiente de Dice, o valor de  $r$  foi de 0.81132 (isto é para um nível de confiança de 81%).

Foi também efectuada a análise das componentes principais (PCA), a partir da matriz binária para as sete variedades analisadas. Nesta representação (Fig. 31), os grupos I e III obtido no dendograma encontram-se associados (Grupo A), já o grupo II dividiu-se, ficando a Galega vulgar isolada (Grupo B) e num grupo C as GGN, GGS e Gal X.



**Figura 31:** Representação bidimensional da análise das componentes principais, para as sete variedades analisadas.

## 4. Discussão

### 4.1. Proliferação de meristemas caulinares na oliveira

A proliferação de meristemas caulinares, como técnica de micropopagação, começou a ser utilizada na oliveira, nos anos 80, por Rugini (1984), sendo formulada a composição do meio OM, o qual se tem revelado como o mais adequado e o que melhores resultados tem permitido obter (Zacchini, 2004). Esta técnica já foi utilizada em muitas variedades de oliveira, inclusive na Galega vulgar (Peixe, 2007).

Os PGRs utilizados, para executar a técnica na oliveira, com melhores resultados são a zeatina e BA, em conjunto (Ali, 2009), havendo no entanto referência que esta última não é muito eficaz (Therios, 2009). No entanto têm sido feitos estudos com o intuito de substituir a zeatina, pois esta é muito dispendiosa, apesar de ser a que tem demonstrado melhores resultados em trabalhos de micropopagação (Peixe, 2007).

Nos meios utilizados para a cultura *in vitro* da oliveira, normalmente o OM, é utilizado manitol como fonte de carbono, uma vez que este é o açúcar com maior eficácia nesta espécie (Connor, 2005). Para muitas espécies o manitol é considerado uma fonte de carbono não metabolizável (Dunwell, 2010). No entanto, na oliveira, tem-se revelado como mais eficiente que outros, como a sacarose (Therios, 2009). Isto, apesar de haver cultivares em que é utilizada a sacarose com bons resultados (Farahabi, 2008; Villa, 2010).

No trabalho agora realizado com a Galega vulgar, a combinação da BA e IBA e a utilização da sacarose não permitiu obter resultados satisfatórios, podendo esta situação ser explicada pela substituição brusca nas culturas do manitol pela sacarose (Jacob, 2011). Esta situação poderá ser devida a uma utilização mais eficaz do manitol ou, a um efeito osmótico, visto que a degradação da sacarose por autoclavagem pode originar glucose e frutose, baixando assim o potencial hídrico dos meios. A razão pela qual o manitol se tem mostrado tão eficaz na micropopagação da oliveira não está determinada e estudos mais detalhados necessitam de ser realizados para esclarecer este aspecto.

Outro factor que condicionou a multiplicação dos explantes, foi o aparecimento de consecutivas contaminações, uma vez que tal como muitas lenhosas a oliveira coexiste com muitas bactérias endógenas (Rugini, 2006), que não são afectadas pela

desinfecção superficial. Este tipo de contaminações são muito difíceis de combater. No entanto, seria também interessante verificar em ensaios futuros que tipos de bactérias estão presentes e qual o seu possível efeito no desenvolvimento da oliveira.

É portanto, necessário proceder a uma optimização dos protocolos de desinfecção inicial dos segmentos nodais aquando do seu estabelecimento, de forma a diminuir a taxa de contaminação em fases posteriores de multiplicação. Por outro lado, é essencial proceder-se a novos ensaios no âmbito da compreensão da resposta da oliveira à sacarose e perceber as vias que estão implicadas na utilização dos açúcares pela oliveira.

#### **4.2. Indução de embriogénese somática**

Os embriões somáticos passam pelas mesmas fases de desenvolvimento que os embriões zigóticos (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) e, tal como estes, são estruturas bipolares e possuem o mesmo genótipo da planta mãe. A formação destes embriões ocorre normalmente por via indirecta, havendo a passagem pela fase de calo (Canhoto, 2010), tendo-se verificado este tipo de embriogénese no presente trabalho, independentemente dos meios testados.

Na oliveira, não há ainda um controlo na indução de embriogénese somática, uma vez que não são ainda conhecidas as condições técnicas que devem ser aplicadas nas diferentes etapas efectuadas *in vitro* e na fase da aclimatização das plantas obtidas. No entanto, têm vindo a ser feitos alguns trabalhos com o intuito de estabelecer protocolos eficazes na aplicação deste método de micropopagação nesta espécie (Jacob, 2011).

A indução de embriogénese somática é influenciada por vários factores, como o tipo de explante (embrião zigótico, cotilédones, folha, raiz, entre outros), as condições de cultura, o genótipo da planta dadora e a composição do meio de cultura. No caso da oliveira a luz foi considerado por Rugini (1988) um factor importante na embriogénese somática, obtendo-se melhores resultados em culturas mantidas no escuro.

Também a idade do explante tem sido também indicada como factor importante em vários estudos de indução de embriogénese somática na oliveira. Assim, Rugini

(1988) verificou que embriões zigóticos maduros são muito pouco receptivos aos estímulos embriogénicos, ao contrário do que acontece com embriões em fases mais precoces de desenvolvimento. Existem, no entanto, relatos de sucesso de indução a partir de material adulto. Apesar de este ter sido previamente rejuvenescido pela cultura *in vitro* (Mencuccini *et al.*, 1990). Trabalhos mais recentes (Rugini e Caricato, 1995) permitiram desenvolver um método de indução de embriogénese cíclica em tecidos adultos, a partir de material rejuvenescido por micropropagação (Rugini, 1995; Rugini, 2006). Mais recentemente, foi descrito por Capelo (2010) a indução de embriogénese somática a partir de material adulto, utilizando pecíolos e folhas, sem necessitar de proceder ao seu rejuvenescimento.

Nos ensaios realizados neste trabalho foram utilizados embriões maduros e imaturos para a indução de embriogénese somática, sendo que os primeiros deram origem a uma maior formação de embriões somáticos comparando com o material imaturo. No caso dos embriões maduros foram testadas, NAA e 2IP e duas concentrações de sacarose (2,5% e 8%) tendo-se verificada uma maior percentagem de indução para a concentração mais elevada de sacarose, mesmo comparando com os outros meios com hormonas diferentes e 2,5% de sacarose. Já para os ensaios com explantes de embriões imaturos, ocorreu indução de embriogénese apenas nas concentrações de 3 e 8% de sacarose, com um número de embriões formados similar ao que se observou com embriões mais desenvolvidos. Seria interessante testar novos níveis de osmolaridade em material imaturo, para verificar se este factor é condicionador na indução de embriogénese somática.

A variação da capacidade de indução de embriogénese somática de acordo com a idade do explante não é igual para todas as lenhosas, havendo diferentes respostas de acordo com a espécie. Na oliveira há variedades onde os melhores resultados foram obtidos utilizando como explantes embriões zigóticos imaturos (Rugini, 1988), enquanto noutras foi na utilização de embriões zigóticos maduros (Trabelsi, 2003).

Para as combinações de hormonas utilizadas, os melhores resultados obtidos foram nos meios com utilização de NAA e 2IP (OMg) para os embriões zigóticos maduros e para os imaturos foram a utilização de IBA (OMB), IBA com 2IP (OMa8) e NAA com 2IP (OMh8). De notar que tanto para os embriões maduros como para os imaturos só houve formação de embriões somáticos em meios com as auxinas IBA e

NAA, tendo ocorrido também uma resposta reduzida com a auxina Picloram em explantes maduros. A auxina NAA já foi assinalada como eficaz na indução de embriogénese somática na oliveira (Rugini, 1988). Já o IBA foi indicado como inibidor da indução de embriogénese somática para concentrações superiores a 0,5 mg/l utilizando como explantes os cotilédones (Trabelsi, 2003). Neste trabalho a concentração de IBA utilizado foi de 1, 2 e 5 mg/l, mas só nas concentrações mais baixas se obteve a formação de embriões somáticos. Em ensaios futuros seria importante testar concentrações mais reduzidas. Nos meios contendo 2,4-D não foi observada a resposta pretendida, situação idêntica á que tem sido referida por outros autores (Rugini, 1988).

Diferentes genótipos (1061, 2052 e 502) foram também utilizados nos ensaios de embriogénese somática. Apesar de diferenças na resposta, estas não se revelaram significativas. Esta situação pode, em parte, ser explicada pela grande variabilidade observada nos resultados e ao reduzido número de explantes de algumas culturas, devido à ocorrência frequente de contaminações.

Os embriões somáticos obtidos apresentavam aspecto anómalo, situação já verificada noutros estudos (Trabelsi, 2003). Estas anomalias, muito comuns na embriogénese somática, podem estar relacionadas com a composição do meio de cultura, devendo ser feitos novos ensaios com manipulação dos meios de forma a obter embriões somáticos viáveis e em maior número. Os meios de indução devem também ser otimizados para que seja possível um aumento das taxas de indução, quer no que diz respeito aos explantes induzidos quer em relação ao número de embriões por explante.

Em alguns meios foi observada a formação de raízes adventícias, normalmente em meios contendo IBA ou NAA, PGRs que são vulgarmente utilizadas na indução de enraizamento na oliveira (Ali, 2009). Pode-se verificar, no entanto, que a formação destas estruturas não interfere na capacidade do explante desenvolver embriões somáticos, uma vez foi precisamente em meios onde uma destas hormonas estava presente que se obteve maior resposta.

Como é sabido, a formação de embriões somáticos a partir de explantes embrionários não assegura a manutenção das características das árvores que formaram os embriões. Nessa perspectiva, a obtenção de plantas por embriogénese somática, seria

uma extensão da propagação sexuada, pois o que se está a clonar é o embrião e não a planta. No entanto, este tipo de ensaios com material embrionário são muito interessantes para testar as condições que podem levar à indução de embriogénese, embora elas possam variar de forma acentuada quando de utiliza outro tipo de material, por exemplo folhas. Dadas as dificuldades em induzir embriogénese a partir de tecidos das árvores adultas e o interesse reduzido da indução a partir de explantes embrionários, uma alternativa interessante poderá passar pela indução a partir de material adulto estabelecido *in vitro* com ulterior indução de embriogénese em segmentos foliares nas folhas ou nouro tipo de explante. Protocolos deste tipo foram aplicados na indução de embriogénese somática de tamarilho (Correia, 2011) e de medronheiro (Gomes, 2009).

### **4.3. Ensaios de indução embriogénese polínica**

A embriogénese polínica permite a obtenção de haplóides a partir da cultura de anteras ou micrósporos (Canhoto, 2010). Esta técnica tem aplicações muito importantes, como sejam a produção de linhas puras (neste caso designados haplóides duplos – HD) por duplicação dos haplóides (Kasha & Maluszinsky, 2003; Germaná, 2010) ou a obtenção de mutantes no estado homozigótico (Reed, 2005), muito úteis para programas de melhoramento. À semelhança do que foi referido para a embriogénese somática, são também vários os factores que podem afectar a resposta das anteras ou do pólen à cultura, tais como o estado fisiológico da planta dadora, o estado de desenvolvimento do pólen na altura da inoculação a parede da antera, o genótipo, a composição do meio e as condições da cultura (Ferrie, 1995; Reinert, 2000; Canhoto, 2010).

Na oliveira ainda não foram ainda obtidas plantas haplóides (Jacob, 2011), no entanto foram já apresentados protocolos com resultados positivos na obtenção de pró-embriões a partir da cultura de micrósporos (Pintos, 2007).

Como foi já relatado para outras espécies (Shivanna, 2003) e também para a oliveira (Pintos, 2007), existe uma correlação entre o estado de desenvolvimento do micrósporo e a morfologia floral. Neste trabalho foram cultivadas anteras de acordo com essa informação, sendo inoculados dois tamanhos diferentes de anteras (2 e 3 mm). No entanto, não houve a formação de embriões polínicos, apenas o desenvolvimento de calo. Assim sendo, para o tamanho de 2 mm, 288 das 2100 anteras cultivadas

apresentaram formação de calo, com apenas 12 a poderem eventualmente ter origem nos grãos de pólen. Uma situação semelhante verificou-se para o tamanho 3mm. A realização de estudos histológicos ou a cultura de pólen isolado com vista à determinação da origem dos calos é fundamental em ensaios futuros.

Por esmagamento das anteras e coloração com o reagente de Schiff, foram observados grãos de pólen aparentemente multinucleados, nomeadamente em meios com BA conjugado com NAA, utilizando o agar como agente gelificante, ou 2,4-D, utilizando o fitagel. Todavia, é necessário proceder a novos ensaios, com vista à optimização das condições de cultura, no que toca à concentração das hormonas, agente gelificante e fonte de carbono, que podem ser factores condicionantes (Shivanna, 2003). Tem sido observado que altas concentrações de sacarose podem ser benéficas ou não no processo de indução, dependendo da espécie. No entanto, concentrações muito elevadas podem levar à sua degradação por autoclavagem e consequente libertação de compostos inibitórios no meio de cultura (Ferrie, 1995; Reinert, 2000; Canhoto, 2010). Uma possível resolução deste problema seria a utilização de carvão activo (Thomas, 2008).

A inexistência da formação de embriões polínicos pode ser devido à inadequada composição do meio ou, também pode ser devida a um efeito negativo de substâncias libertadas para o meio de cultura resultantes da degeneração dos tecidos da antera, principalmente na fase de desenvolvimento de embriões polínicos. Os calos que se desenvolvem a partir dos tecidos das anteras podem também competir com os calos formados a partir do pólen (Shivanna, 2003). De forma a evitar estes obstáculos seria importante efectuar novos ensaios de indução de embriogénese polínica utilizando a cultura directa dos micrósporos.

#### **4.4. Ensaios com marcadores genéticos**

Os marcadores moleculares, nomeadamente os RAPDs, têm vindo a ser cada vez mais utilizados na oliveira, principalmente no sentido de promover uma melhor caracterização das diferentes cultivares existentes, uma vez que esta espécie é um bom exemplo das limitações impostas pela identificação com base em marcadores morfológicos, havendo muitos cultivares que embora sejam os mesmos cultivares estão sob uma denominação diferente (Gandul-Rojas, 2006).

Também neste trabalho se tentou clarificar a variabilidade de algumas das muitas cultivares de oliveira - Cobrançosa, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Galega Grada Normal, Galega Grada de Évora, Galega Grada de Serpa e uma Galega X.

Após serem obtidos os perfis, em gel de agarose, dos diferentes cultivares com os *primers* do kit C foi analisada a presença/ausência de polimorfismo e obteve-se uma taxa de 95% de polimorfismo. Esta elevada taxa coincide com outros trabalhos em que este valor está sempre acima do 80% (Belaj, 2004; Martins-Lopes, 2006; Cordeiro, 2008; Sesli, 2009; Sesli, 2010). Esta percentagem pode indicar que as cultivares analisadas neste trabalho não são tão próximas umas das outras como se especula tendo em conta os nomes que lhes foram aplicados.

De acordo com os resultados obtidos para a análise de similaridade, com o coeficiente Dice, as cultivares foram distribuídas por três grupos: Grupo I – Cobrançosa e Cordovil de Serpa, Grupo II - Galega vulgar, Galega Grada Normal, Galega Grada de Serpa e a Galega desconhecida, e Grupo III - Galega Grada de Évora.

O grupo I não está de acordo com resultados obtidos anteriormente, onde a Cobrançosa e a Cordovil são colocados em grupos diferentes (Belaj, 2001; Martins-Lopes, 2006) e vem fortalecer a hipótese de que a Cobrançosa e Cordovil são muito próximas uma da outra. O grupo II contraria um pouco a ideia que existe relativamente à GGS, sendo que neste estudo está muito próxima da Gal e GGN, apesar de noutros estudos esta se separar do grupo das Galegas (Martins-Lopes, 2006; Figueiredo, 2007). Já a Galega Grada de Évora que nestes mesmos trabalhos aparece junto da Gal e da GGN, aqui aparece mais distante, apresentando uma menor similaridade com as outras Galegas, podendo ser indicativo de que a sua classificação possa estar errada. Estes resultados são suportados por um estudo em que a GGE se separa das outras Galegas muito antes da GGS (Lopes, 2004).

O teste para medir a qualidade na correlação da análise de *cluster* originou um  $r$  de 0.81132, dando-nos um nível de confiança de 81%. Este valor remete para uma *boa* interpretação dos resultados, assim considerada para valores de  $r$  entre 0,5 e 0,9.

Relativamente à análise das componentes principais (PCA), a GGE mostrou-se associada ao grupo da Cb e Cd, podendo mesmo estar mais próxima destas

comparativamente com as outras Galegas. Já a Gal apareceu isolada das restantes Galegas, podendo pôr-se em causa se a GGN, GGS e a Gal X serão mesmo Galegas.

Os *primers* utilizados mostraram-se bastante discriminativos, apresentando polimorfismos acima dos 50%, à exceção dos *primers* OPC3, OPC9 e OPC17, onde não se verificou ampliação de DNA.

De futuro, é necessário realizar novos ensaios com a introdução de mais exemplares por cultivares, de forma a obter-se uma análise mais completa. A utilização de um maior número de *primers* e de outras técnicas de análise molecular poderão também ser interessantes para complementar os dados obtidos.

### 5. Conclusões e perspectivas futuras

A optimização de protocolos para a micropopagação e melhoramento da oliveira é urgente, sendo este trabalho um contributo para tal. Assim sendo, no que se refere à micropopagação pela proliferação de meristemas axilares, os ensaios efectuados vieram confirmar o facto de que a substituição do manitol, nomeadamente pela sacarose, não é tecnicamente possível nesta variedade de oliveira, tendo este procedimento levado à necrose dos segmentos nodais. Da mesma forma concluiu-se que a substituição da zeatina pelo IBA não é benéfica para este tipo de micropopagação.

Nesta espécie, não há ainda muitas certezas sobre qual a idade do explante ideal para uma eficaz indução de embriogénese somática, havendo autores que defendem ser o material em fases mais jovens de desenvolvimento a apresentar melhores resultados, enquanto outros defendem terem tido sucesso utilizando material em fases mais avançadas de desenvolvimento sem a necessidade de proceder ao seu prévio rejuvenescimento. Nos ensaios efectuados, os resultados obtidos corroboram o facto de ser possível obter embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros, embora se tenha verificado a presença de um aspecto anómalo, ainda muito comum na aplicação desta técnica a esta espécie. Relativamente aos PGRs utilizados, pode afirmar-se que o 2,4-D não promove a formação de embriões zigóticos, ao contrário do IBA e NAA. Estas últimas auxinas podem vir a ser o ponto de partida para novos estudos, sendo portanto, necessários novos ensaios para estabelecer quais as concentrações ideais a serem utilizadas, de forma a maximizar o seu potencial contributo para o sucesso da aplicação da embriogénese somática na oliveira.

Relativamente ao contributo para o melhoramento da oliveira, através da obtenção de haplóides pela indução de embriogénese polínica, apesar de não se terem formado embriões polínicos, foram visualizados grãos de pólen presumivelmente multinucleados em culturas de anteras com 2 mm, podendo este resultado ser levado em conta na escolha do tamanho das anteras em futuros estudos com a mesma finalidade.

Para a análise molecular efectuada nos sete cultivares foi observada uma elevada taxa de polimorfismo tendo também sido possível estabelecer três grupos de acordo com o seu índice de similaridade: Grupo I – Cobrançosa e Cordovil de Serpa, Grupo II - Galega vulgar, Galega Grada Normal, Galega Grada de Serpa e a Galega X e Grupo III - Galega Grada de Évora. De acordo com a representação bi-dimensional da PCA, foi

## Conclusões e perspectivas futuras

possível isolar a Gal das restantes Galegas e associar a GGE ao grupo da Cb e Cd, podendo apontar-se que as cultivares GGN, GGS e a Gal X poderem não ser mesmo Galegas e que a GGE seja mais próxima da Cb e Cd do que das restantes Galegas. De futuro, serão necessários mais estudos com outros *primers* de RAPDs, mais discriminativos, e também novas técnicas de análise molecular, bem como proceder-se a uma nova seleção de novo material vegetal, de forma a despistar classificações morfológicas erradas, muito comuns nesta espécie.

**Bibliografia**

Albertini E, Torricelli R, Bitocchi E, Raggi L, Marconi G, Pollastri L, Di Minco G, Battistini A, Papa R, Veronesi R (2011) Structure of genetic diversity in *Olea europaea* L. cultivars from central Italy. *Mol Breeding* 27:533–547

Ali A, Ahmad T, Abrasi NA, Hafiz IA (2009) Effect of different media and growth regulators on in vitro shoot proliferation of olive cultivar “Moriolo”. *Pak. J. Bot.*, 41: 783-795, 2009

Alves MLV (2007) Caracterização e Estrutura Genéticas da Cultivar de Oliveira ‘Cobrançosa’ e sua Relação com o Zambujeiro. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Departamento de Biologia Vegetal. Universidade de Lisboa.

Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 98:4122-421

Antonini SRC, Meneghin SP, Urashima AS (2004) Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Agrárias - Campos de Araras

Barbosa W, Orto F, Ojima M, Campos S, Tombolato A (1986) Propagação vegetativa *in vitro* de cultivares de macieira. *Bragantia*, 45: 143-154

Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (2008) El Cultivo del Olivo. Sevilla, Junta da Anadaluzia. Consejería de Agriculture y Pesca. Grupo Mundi-Prensa

Belaj A, Satovic Z, Rallo L, Trujillo I (2004) Optimal use of RAPD markers for identifying varieties in olive (*Olea europaea* L.) germplam collections. *J. Amer. Soc. Hort. Scr.* 129:266-270

Belaj A, Satovic Z, Trujillo I, Rallo L (2004) Genetic relationships of Spanish olive cultivars using RAPD markers. *HortScience*. 39:948-951

Belaj A, Trujillo I, Rosa R, Rallo L, Giménes MJ (2001) Polymorphism and Discrimination Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm Bank. *J. Amer. Soc. Hort. SCI.* 126:64–71

Bered F, Neto JFB, Carvalho FIF (1997) Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 27:513-520

Blanco RA, Oliveira - a árvore sagrada (*Olea europaea*). Jardim de Flores, <http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A48oliveira.htm> (Acedido a 05/11/2011)

Canhoto JM (2010) *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra

Capelo AM, Silva S, Brito G, Santos C (2010) Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 103:237–242

Cardoso C, Bento A, Torres L (2006) Evolução do ataque da mosca-da-azeitona, *Bactocera oleae* (Gmelin), nas cultivares ‘Cobrançosa’, ‘Madural’ e ‘Verdeal Transmontana’. *Melhoramento*, 41:124-130

Carvalho MT, Lopes PS, Silva MJM, Pires S, Gonçalves MJ (2006) Avaliação da qualidade em azeites monovarietais das cvs, Galega vulgar e Picual face a diferentes níveis de infecção de “gafa”. *Melhoramento*, 41:325-330

Carvalho MTBM (2010) *Vida Rural*. Setembro pp. 40

Castiglioni L, Bicudo HEMC (2003) A Técnica de RAPD (*Random AMplified Polymorphic DNA*) e suas aplicações para estudos em genética molecular. *Revista UNORP*, 3:63-77

Castro Caldas E (1998) *A agricultura na história de Portugal*. E. P. N. – empresa de publicações públicas, Lisboa. pp. 65, 66

Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo, <http://www.azeitesdoalentejo.com/layout.asp?m1=1&m2=4&m3=2> (Acedido a 17/12/2012)

Connor DJ (2005) The Physiology of Adaptation and Yield Expression in Olive. *Horticultural Reviews*, 31:155-219

Cordeiro AI, Sevilla JFS, Tinaut MCA, Jimenez MCG (2008) Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum* 52: 642-647

Correia S, Lopes ML, Canhoto CM (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees*, 25:1009–1020

Cozza R, Turco D, Bati C, Bitonti M (1997) Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 215–223

Dice LR (1945) Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 26:297-302

Donini LP, Schuch MW, Ribeiro MF, Souza JA, Soares GC (2008) Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. Arbequina” para início da micropropagação. *Ciência Rural* 38:1769-1772

Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* 8:377-424

Dutra LF, Oliveira AF, Fráguas CB, Pasqual M (2004) Multiplicação *in vitro* de Oliveira (*Olea europaea* L.). *Ciênc. agrotec.*, 28: 220-223

Erig A, Fortes GRL (2002) Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. *Ciência Rural* 32:577-582

Fabbri AG, Maurizio B, Stanley S, Kailis G (2004) Olive propagation manual. CSIRO publishing. National Library of Australia Cataloguing-in-Publication entry

Farahani F, Peyvandi M, Hosseini-Mazinani M (2008) Effect os sucrose and manitol on *in vitro* regeneration of Iranian olive cv. “Rowghani”. *ISHS Acta Horticulturea* 791:203-208

Fernández Serrano JM, Serrano M, Amaral E (2002) Effect of different hormone treatments on rooting of *Olea europaea* cv. Galega vulgar cuttings. *Acta Horticulturae*. 586:875-877

Ferrie AMR, Palmer CE, Keller WA (1995) Haploid embryogenesis. In: Thorpe, T *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. pp 309-344

Figueiredo EMP (2007) Avaliação e discriminação de cultivares de *Olea europaea* L. através de marcadores RAPD. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal. Departamento de Botânica. Universidade de Coimbra.

Gabinete de Planeamento e Políticas (2007) Olivicultura. MADRP.

Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera MI (2006) Olive Processing. In: Hui YH (Ed.) Handbook of Fruits and Fruit Processing. Blackwell Publishing pp.491-517

Gemas VJV, Almadanim MC, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P (2004) Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 51: 501–511.

Germaná MA (2010) Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104:283-300

Gomes F, Lopes ML, Santos T, Canhoto JM (2009) Micropropagation of Selected Trees of *Arbutus unedo* L. through Axillary Shoot Proliferation and Somatic Embryogenesis. In Vitro Cellular & Development Biology Plant, 45:72-82

Green PS (2002) A revision of *Olea* L. (Oleaceae). Kew Bulletin, 57:91-140

Gyves EM, Mira FR, Ruiu F, Rugini E (2008) Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 92:233-238

Halperin W (1995) *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe, T *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. pp 1-16

Harvey BM, Soundy P (2008) Southern Blotting as a diagnostic method. In: Walker, JM, Rapley R (Eds) Molecular Biomethods Handbook, 2nd edition. Humana press, Totowa, NJ. pp. 55-64

Hummer KE, Bassil N, Njuguna W (2011) *Fragaria*. In: Kole C Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 17-44

Jacob APO (2011) Propagação clonal na oliveira – variedade Galega vulgar e contribuições para o estudo da embriogénese polínica. Projecto de Tese do Programa Doutoral em Biociências. Departamento de Ciências da Vida. Universidade de Coimbra

Infopédia, [http://www.infopedia.pt/\\$oliveira,2](http://www.infopedia.pt/$oliveira,2) (Acedido a 20/12/2012)

Instituto Nacional de Estatística (2012) Estatísticas agrícolas 2011

Kaniewski D, Campo EV, Boiy T, Jean-Frédéric T, Khadari B, Besnard G (2012) Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society 87:885-899

Kasha KJ, Maluszinsky M 2003 Production of doubled haploids in crop plants. In: Maluszinsky M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer Academic Publisher. pp. 1-4

Leitão F (2004) Síntese sobre os conhecimentos obtidos ao longo de anos relacionados com a obtenção de jovens plantas de *Olea europaea* L., da cv. ‘Galega vulgar’. *Revista Melhoramento* 39:153-171.

Leitão F, Potes MF, Calado ML, Almeida FJ (1986) Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Lisboa

Lopes M, Mendonça D, Sefe KM, Gil FS, Machado AC (2004) Genetic Evidence of Intra-cultivar Variability within Iberian Olive Cultivars. *HortScience* 39: 1562-1565

Lusa Trilogia, <http://lusatrilogia.com/azeitona-galega/> (Acedido a 09/01/2013)

Macquarie University, <http://bio.mq.edu.au/dept/centres/pirel/petercuneo.html> (Azeitona 17/01/2013)

Martins-Lopes P, Lima-Brito J, Gomes S, Meirinhos J, Santos L, Guedes-Pinto H (2006) RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54:117–128

McPherson MJ, Møller S (2006) PCR. Taylor & Francis Group

Mencuccini M, Corona C (1990) Plant regeneration and first attempt of *in vitro* genetic improvement of olive (cv moraiolo) *Acta Horticult*. 300:261-264.

Meyer AS (2002) Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. Mestrado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura “Luís de Queirós”. Universidade de São Paulo

Moriondo M, Stefanini FM, Bindi M (2008) Reproduction of olive tree habitat suitability for global change impact assessment. *Ecological Modelling*, 218:95-109

Oliveira AF, Chalfun NNJ, Alvarenga AA, Neto JV, Pio D, Oliveira DL (2007) Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluído em NaOH e álcool. *Ciênc. agrotec.*, 33:,79-85

Oliveira AF, Pasqual M, Chalfun NNJ, Regina MA, Rincón CDR (2003) Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. *Ciênc. agrotec.*, 27:32-38

Oliveira MC, Neto JV, Oliveira RS, Pio R, Oliveira CN, Ramos JD (2010) Enraizamento de estacas de duas cultivares de oliveira submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes. *Bragantia*, Campinas, 69:99-103

Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79:361-382

Peixe A, Raposo A, Lourenco R, Cardoso H, Macedo E (2007) Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Sci. Hortic*. 113:1–7

Peixe A, Serras S, Campos C, Zavattieri MA, Dias MAS (2008) Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista Ciências Agrárias* 30: 476-482

Pintos B, Martin A, Bueno MA (2007) Micropropagation protocol for microspore embryogenesis in *Olea Europaea* L. In: Jain SM e Haggman Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. H. pp. 361-371

QUIAGEN, <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasyplantsystem/dneasyplantminikit.aspx#Tabs=t1> (Acedido a 23/01/2013)

Rapoport HF (2008) Botánica y morfología in Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (2008) El Cultivo del Olivo. Sevilla, Junta da Anadaluzia. Consejería de Agriculture y Pescas. Grupo Mundi-Prensa

Reed SM (2005) Haploid cultures. In: Trigiano RN, Gray DJ (Eds) Plant development and biotechnology. CRC Press LLC. pp. 225 – 235

Reinert J, Bajaj YPS, Zbell B (2000) Aspects of organization – organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In: Street HE Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publications. California. pp. 389-426

Ribeiro GD, Costa JNM, Vieira AH, Santos MRA (2005) Enxertia em fruteiras. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Rondônia

Rotondi A, Magli M, Ricciolini C, Baldoni L (2003) Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. Kluwer Academic Publishers. *Euphytica* 132: 129–137

Rugini E (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci. Hort.* 24:123-134

Rugini E (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 207-214

Rugini E (1995) Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (Eds.) Somatic embryogenesis in Woody Plants: Angiosperms, Vol. 2. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 170-186

Rugini E, Caricato G (1995) Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) Canino and Moraiolo. *Plant Cell Rep.* 14:257-260

Rugini E, Gutiérrez-Pesce P, Muleo R (2008) Olive. In: Kole C, Hall TC Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Temperate Fruits and Nuts. Blackwell Publishing Ltd. ISBN pp. 233-250

Rugini E, Pesce PG (2006) Genetic improvement of olive. *Pomologia Croatica* 12:43-74

Santos MLC (2010) *Revista de olivicultura*. Julho/Agosto/Setembro, pp. 13 a 15.

Schifino-Wittmann MT (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 31:897-902

Sesli M, Yegenoglu ED (2009) Genetic analysis on wild olives by using RAPD markers. *African Journal of Agricultural Research*.4:707-712

Sesli M, Yegenoglu ED (2010) RAPD assay of wild-type olives in Turkey. *Genetics and Molecular Research*. 9:966-972

Sghir S, Chatelet P, Ouazzani N, Dosba F, Belkoura I (2005) Micropropagation of Eight Moroccan and French Olive Cultivars. *HortScience* 40: 193-196

Shivanna KR (2003) *Pollen Biology and Biotechnology*. Enfield: Science Publishers, Inc.

Street HE (1977) Introduction. In: Street HE *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Scientific Publications. pp. 11-30

Talhinhas P, Martins S, Ramos P, Sreenivasaprasad S, Martins JN, Oliveira E (2006) Aspectos epidemiológicos da antracnose da oliveira (gafa da azeitona) e

diversidade genética dos agentes causais (*Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*), Melhoramento, 41:171-179

Therios IN (2009) Olives. Crop production science in horticulture. Cabi

Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26, 618-631

Trabelsi B, Bouzid S, Bouzid M, ElIoumi N, Belfeleh Z, Benabdallah A, Ghezal R (2003) In Vitro Regeneration of Olive Tree by Somatic Embryogenesis. Journal of Plant Biology. 46:173-180

Vicent MC, Fulton T (2004) Using of molecular markers technology in studies on plant genetic diversity. Vol.1, IPGRI

Villa F, Pasqual M, Freitas GF (2010) Otimização de um protocolo para micropropagação da oliveira Ascolano 315. Rev. Ceres. 57:530-534

Zacchini M, Agazio M (2004) Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum 48: 589-592

Zamani Z, Zarei A, Fatahi R (2010) Characterization of progenies derived from pollination of pomegranate cv. Malase-Tourshe-Saveh using fruit traits and RAPD molecular marker. Scientia Horticulturae. 124:67-73