

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**Variabilidade genética de acessos de oliveira (*Olea europaea* L.) do
Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado – RS: baseada
em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares**

Fabiana Fonseca dos Santos

Pelotas, 2016

Fabiana Fonseca dos Santos

**Variabilidade genética de acessos de oliveira (*Olea europaea* L.) do
Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado – RS: baseada
em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Co-orientadores:

Prof. Dra. Juliana de Magalhães Bandeira

Pesq. Dr. Enilton Fick Coutinho

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catálogo na Publicação

S237v Santos, Fabiana Fonseca dos

Variabilidade genética de acessos de oliveira (*olea europaea* L.) do banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado –RS: baseada em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares / Fabiana Fonseca dos Santos ; Dario Munt de Moraes, orientador ; Juliana de Magalhães Bandeira, Enilton Fick Coutinho, coorientadores. — Pelotas, 2016.
126 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação Em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Germinação. 2. Micropropagação. 3. Nutriente. 4. Microssatélites. 5. Fenótipo. I. Moraes, Dario Munt de, orient. II. Bandeira, Juliana de Magalhães, coorient. III. Coutinho, Enilton Fick, coorient. IV. Título.
CDD : 634.63

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Fabiana Fonseca dos Santos

Variabilidade genética de acessos de oliveira (*Olea europaea* L.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado – RS: baseada em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19/05/2016

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Dario Munt de Moraes (Orientador) - UFPel

.....
Prof.Dra. Márcia Wulff Schuch – UFPel

.....
Prof. Dra. Giani Mariza Bärwald Böhm.- IFSul Pelotas

.....
Pesq. Dra. Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado

.....
Dra. Caroline Moraes (Suplente) - UFPel

Dedico

A minha amada família, minha mãe Regina, meu
pai João Maria, minhas irmãs Vani Letícia e
Katiúscia, meu irmão, João Jesus, meu cunhado-
irmão André e as sobrinhas Yasmin e Mel

Ofereço

Ao meu amado marido, André Kieling

Essa conquista é nossa

Agradecimentos

A Deus, por toda força e proteção ao longo dessa trajetória.

À minha amada mãe, por todo o apoio, incentivo, coragem, que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu pai, que sempre estará comigo.

Ao meu marido André que acompanhou todo esse processo, quando as coisas estavam dando certo e também quando não estavam, obrigada pela dedicação incondicional e amor sempre.

Às minhas irmãs Vani Letícia e Katiúscia, irmão João Jesus, ao meu cunhado André e minhas sobrinhas Yasmin e Mel por vocês existirem e tornarem a minha vida melhor. À Luciana Eslabão pela amizade e apoio. Aos amigos Leandro Andrade e Ane Crochemore que mesmo de longe sempre estiveram comigo.

Ao meu querido orientador professor Dr. Dario Munt de Moraes, pela oportunidade de crescimento profissional, por confiar em mim, e me apoiar sempre.

À minha co-orientadora professora Dra. Juliana de Magalhães Bandeira, pelo empenho, carinho, ensinamentos, paciência, amizade.

Ao meu co-orientador pesquisador, Dr. Enilton Fick Coutinho, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade em todos os momentos.

A Embrapa Clima Temperado pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES pela bolsa de estudos durante todo o curso.

À amiga Natália Silveira Correa por toda a força e carinho, tão importantes durante esse período.

Às minhas amigas do laboratório de sementes pela amizade, Andrea Bicca, Fernanda Reolon, Cristina Larré, Caroline Moraes, Patricia Marini. Aos funcionários do laboratório de sementes Luisa Meireles, Rudinei Teixeira, e Ari Carre, pelos chimes e momentos de descontração.

Ao pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Leonardo Dutra, por seu apoio, disponibilidade do seu laboratório, e amizade. Às queridas amigas do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado, pela maravilhosa convivência, apoio, torcida, Daiane Vargas, Raquel Costa, Leticia Vanni Ferreira, Daniele Masiero, Liana Ferreira, Gabriela Gerhardt da Rosa, Kerlley Mayer, Juliana Hey Coradin, Rafaela Formoso e Andressa Passos Trettin, e os funcionários Francisco Carlos “Falcão” e o amigo querido, Antonio Fernando Pacheco Nino.

À todos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, pela ajuda, esclarecimentos de dúvidas, carinho, e feliz reencontro com a amiga Claudete Mistura, e novas amizades, como as queridas Carol Silveira, Raquel Kneib, Roberta Kneib, Liane Bahr Thurow e Natércia Lobato.

Aos funcionários da Embrapa Clima Temperado, Marco Antonio e Jair pela ajuda com os experimentos na casa de vegetação. A professora Dra. Isabel Oliveira pela oportunidade de estágio que permitiu que eu chegasse até a pós-graduação. À amiga de longa data, responsável pela minha inscrição no doutorado, Carina Pereira da Silva.

Ao querido Luis Willian Pacheco Arge, pela preciosa ajuda e paciência com as análises estatísticas, e à querida e sempre disposta Solange Ferreira da Silveira, serei sempre grata.

Aos professores da pós-graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos. A gente chega de um jeito e sai completamente diferente, esse crescimento profissional em grande parte, são vocês os responsáveis.

À todos os queridos colegas do programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela troca de experiências, convivência e amizade. À todas essas pessoas, pois sem elas certamente este trabalho não seria possível, minha eterna gratidão!

***Eu, porém, sou como uma Oliveira que
floresce na casa de Deus; confio no
constante amor de Deus para sempre e
eternamente
(Salmo 52:8)***

Resumo

SANTOS, Fabiana Fonseca dos. **Variabilidade genética de acessos de oliveira (*Olea europaea* L.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado – RS: baseadas em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares.** 2016. 126f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2016

As etapas da ontogenia de oliveiras (*Olea europaea* L.), desde a germinação das sementes, o período de crescimento juvenil e de transição da fase reprodutiva até mesmo o desenvolvimento da inflorescência frutífera, são longas e problemáticas. Desta forma, objetivou-se acelerar o processo germinativo (superando a latência) e de formação de mudas da cultivar Arbequina, além de caracterizar morfológica e molecularmente, acessos de oliveiras do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS) para gerar informações que possam contribuir em futuros programas de melhoramento genético de oliveira do Estado do Rio Grande do Sul. Para os experimentos de germinação utilizou-se sementes da cv. Arbequina com e sem o endocarpo, as quais foram semeadas em casa de vegetação e sem endocarpo e embrião para cultivo *in vitro*. As plantas obtidas da germinação *in vitro* (sementes sem endocarpo), foram transferidas para condição *ex vitro* e submetidas a diferentes tratamentos com nutrientes para acelerar o seu crescimento. Já as análises moleculares foram baseadas na avaliação de 20 *loci* SSR, em 72 acessos. Destes 20 *loci* SSR sete foram utilizados, juntamente com seis caracteres fenotípicos, sendo dois qualitativos e quatro quantitativos, relacionados à folha e à flor, com objetivo de caracterizar a variabilidade genética de 12 importantes cultivares, para verificar seu desenvolvimento. Sumarizou-se três matrizes, de dados morfológicos quantitativos, dados morfológicos qualitativos e uma de dados moleculares, e a partir dessa matriz originou-se o dendrograma. Ainda, foram realizadas análises de parâmetros de variabilidade genética dos dados

moleculares. A 'Arbequina' sem endocarpo semeada *in vivo* obteve baixo potencial germinativo,(8,5% de germinação) já as que foram semeadas em condição *in vitro* de sementes sem endocarpo e embriões isolados com (42,11% e 55,33% de germinação, respectivamente) e reduziram o tempo da germinação em até cinco vezes (de 90 para 15 dias com embriões). As sementes (sem endocarpo) semeadas *in vitro* (63% de germinação) para aclimatação em casa de vegetação não requerem nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio. O dendograma obtido a partir da matriz de similaridade genética UPGMA, calculada pelo índice de Dice, utilizando os dados dos *loci* SSR, não foi capaz de distinguir os acessos agrupados por países. A abordagem Bayesiana revelou alta relação genética no germoplasma de olivas da Embrapa Clima Temperado, possivelmente devido a maioria pertencer ao mesmo centro de origem, indicando a coancestralidade das cultivares estudadas. Foi possível a identificação de dois *pools*, com alta relação com os diferentes grupos que compõem a coleção. O conjunto de marcadores SSR escolhidos apresentaram-se polimórficos, permitindo a caracterização de todos os acessos do Banco ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS). O resultado da sumarização das matrizes originou um dendrograma que separou os acessos por origem, sendo os acessos Galega e Penafiel originários de Portugal, Frank e VB2, do Brasil, Canino e Coratina, da Itália, e os restantes B21, Gordales, Gran Vitale e Nelson, todos do Brasil confirmando a hipótese de que estes acessos de germoplasma de oliveiras da Embrapa tem uma base genética comum. Contudo, estes resultados indicam um nível médio de variabilidade morfológica e molecular, análises estas complementares, forneceram uma mais completa compreensão da diversidade disponível nestes acessos da coleção de oliveiras. Os resultados desse estudo servem para caracterizar os acessos de oliveiras da coleção da Embrapa Clima temperado (Pelotas/RS) e serão utilizados para os programas de melhoramento genético de oliveira no Brasil, o qual encontra-se em estágio inicial.

Palavras-chave: germinação; micropropagação; nutriente; microssatélites; fenótipo

Abstract

SANTOS, Fabiana Fonseca dos. Genetic variability of olive access (*Olea europaea* L.) of the Germplasm Bank of Embrapa Temperate Climate - RS: based physiological, morphological and molecular criteria. 2016. 12f. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Program of Graduate Studies in Plant Physiology. Federal University of Pelotas. Pelotas, 2016

The stages of ontogeny olive (*Olea europaea* L.), from germinating seeds, juvenile period of growth and reproductive phase transition even the development of fruit inflorescence, are long and problematic. Thus, aimed at speeding up the germination process (overcoming latency) and at seedling cultivar Arbequina, besides characterize morphologically and molecularly the access active bank of olive germplasm from Embrapa Temperate Climate (Pelotas / RS) to generate information that may help in future olive breeding programs in Rio Grande do Sul State. For the germination experiments seeds of cv. Arbequina were used with and without the endocarp, which have been sowed in the greenhouse without cored and embryo to *in vitro* cultivation. The plants obtained through *in vitro* germination (seed without the endocarp), were transferred to *ex vitro* conditions and subjected to different treatments with nutrients in order to accelerate their growth. While the molecular analyzes were based on the evaluation of 20 *loci* SSR in 72 acesses. From those 20 *loci* SSR seven *loci* have been used, along with six phenotypic characters, two qualitative and four quantitative, related to leaf and flower, in order to characterize the genetic variability 12 of important cultivars to check their development. Three arrays have been summarized from quantitative and qualitative morphological, also one from molecular data. Due to this matrix dendrogram has been originated. Furthermore, genetic variability analysis were performed of parameters of molecular data. The 'Arbequina' cored seeded *in vivo* obtained low germination potential (8.5% germination) however those seeds sowed *in vitro* condition without cored and isolated embryos

(42.11% and 55.33% germination, respectively) moreover reduced the time of germination up to five times (from 90 to 15 days with embryos). The seeds (without the endocarp) *in vitro* (63% germination) for acclimatization in greenhouse do not require nutrients nitrogen, phosphorus and potassium. The dendrogram obtained from the genetic similarity matrix UPGMA Dice index calculated by using the data of SSR *loci* has not been able to distinguish the access grouped by country. The Bayesian approach has shown high genetic relation to olive germoplasm of Embrapa Temperate Climate, possibly due to the majority belong to the same center of origin, indicating the co-ancestry of cultivars. It has been possible to identify two pools, with high correlation with to the different groups that make up the collection. The set of SSR markers chosen have shown polymorphic, allowing the characterization of all accesses of Active Germplasm Bank of Embrapa Temperate Climate (Pelotas / RS). The result of summarization of the matrices generated a dendrogram that separated the access by origin, being the Galician and Penafiel access originating from Portugal, Frank and VB2 in Brazil, Canine and Coratina in Italy, and the remaining B21, Gordales, Gran Vitale and Nelson, all in Brazil confirming the hypothesis that these germplasm accesses of Embrapa's olive trees have a common genetic basis. Nevertheless, these results indicate an average level of morphological and molecular variability. Complementary analysis provided a more complete understanding of the diversity available in these accesses of the collection of olives. The results of this study serve to characterize the access of olive collection of Embrapa Temperate (Pelotas / RS) and will be used for breeding programs of olive in Brazil, which is at an early stage.

Keywords: germination; micropropagation; nutrient; microsatellites; phenotype;

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO DA LITERATURA	18
ASPECTOS FISIOLÓGICOS	18
Germinação	18
Métodos de Propagação.....	19
Germinação <i>in vitro</i>	20
Aclimação	21
Fertilização.....	22
ASPECTOS MOLECULARES	25
Marcadores Moleculares de DNA.....	25
Marcadores Microsatélites - SSR (Sequência Simples Repetitiva).....	27
SSR e Oliveiras.....	30
ASPECTOS MORFOLÓGICOS-MOLECULARES	33
CAPÍTULO 1.....	36
Germinação, aclimação e fertilização de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) ‘Arbequina’	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
Germinação <i>in vivo</i> (casa de vegetação)	38
Germinação <i>in vitro</i> (sementes x embriões).....	39
Aclimação e fertilização das mudas	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
Germinação <i>in vivo</i> (casa de vegetação)	42
Germinação <i>in vitro</i> (sementes x embriões).....	43
Aclimação e fertilização das mudas	45
CONCLUSÕES	49
CAPÍTULO 2.....	50
Caracterização molecular por marcadores microsatélites da coleção de acessos de oliveiras (<i>Olea europaea</i> L.) da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS)	50
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	53

Material vegetal.....	53
Extração de DNA.....	55
Análise de Dados	60
Variabilidade Genética.....	60
Estrutura de População	61
Distribuição da variabilidade genética	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
Variabilidade genética em grupos	66
Análise de variância molecular	76
CONCLUSÕES	79
CAPÍTULO 3.....	80
Caracterização de acessos de Oliveiras(<i>Olea europaea</i> L.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado –RS baseados em marcadores morfológicos e moleculares ...	80
INTRODUÇÃO.....	80
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
Material Vegetal	82
Caracterização morfológica	83
Caracterização molecular	84
Extração de DNA e Genotipagem com Marcadores Microsatélites.....	84
Variabilidade genética	87
Relação genética entre acessos.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
Considerações Finais.....	116
Apêndices	117

INTRODUÇÃO GERAL

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família *Oleaceae*, sendo cultivada em mais de 40 países distribuídos em quase todos os continentes. No Brasil, azeitonas e azeite de oliva, são produtos disponibilizados por meio de importações, principalmente de países como Portugal e Argentina. No ano de 2013 o gasto foi de US\$ 296.707,00 milhões de dólares com a importação de 458,78 mil toneladas de azeite (INTERNATIONAL TRADE MAP, 2014).

A oliveira chegou ao Brasil há muitos séculos, trazida por imigrantes europeus. Pelo seu simbolismo, era muito comum encontra-las próximas a igrejas e capelas durante o período do Brasil Colônia. Quando o país começou a apresentar uma pequena produção, a família real, com medo de que o produto da colônia concorresse com o da metrópole portuguesa, ordenou o corte das árvores (Teramoto et al., 2010). Este fato impediu que a olivicultura tomasse grande impulso, e mais, os negociantes importadores portugueses, fizeram os brasileiros acreditarem na impossibilidade de ter bons olivais e por muito tempo o país só conhecia azeites e azeitonas que vinham de Portugal. Assim passamos a desprezar a cultura por um longo período (TERAMOTO et al., 2010).

No Rio Grande do Sul, a oliveira foi introduzida oficialmente em 1948, por meio da criação do Serviço Oleícola, órgão especializado da Secretaria da Agricultura, com a finalidade de supervisionar e orientar os trabalhos de pesquisa. Porém, há relatos do plantio de oliveiras em diversas cidades do estado entre 1938 e 1939, como por exemplo, Rio Grande, Pelotas, Santa Rosa, Marau, Taquara e São Lourenço (GOBBATO, 1945). O apoio governamental, estimulando o desenvolvimento da cultura, ainda sem base técnica, inclusive com oferta de prêmios e isenção de imposto territorial, derivou na formação de olivais de baixa qualidade.

A Embrapa Clima Temperado, em 2005, aprovou o projeto de pesquisa denominado: *Introdução e desempenho agrônômico de cultivares de oliveira no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina*, que implantou 25 unidades

experimentais de observação no estado. Atualmente, a Embrapa Clima Temperado concentra-se no projeto: *Desenvolvimento e adequação de tecnologias à cultura da oliveira no Sul do Brasil*, que visa dar suporte técnico aos olivais implantados e futuros empreendimentos, além de melhorar a qualidade dos produtos colhidos.

Dados da Emater (Associação Riograndense Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural, 2014), indicam que existem cerca de 75 produtores cultivando oliveiras no Rio Grande do Sul e a estimativa de colheita já chega a 350 toneladas de azeitona e uma produção de aproximadamente 45 mil litros de azeite de oliva. Em 2005 apenas três produtores investiam na plantação no Estado, totalizando 10 hectares cultivados. Atualmente, o Rio Grande do Sul conta com aproximadamente 1,4 mil hectares implantados com a cultura, tendo a expansão de novas áreas com investimentos de produtores gaúchos e de outros estados. Além disso, há cinco fábricas de azeite, tornando o Estado com maior potencial de crescimento para o cultivo no país (Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Estado Rio Grande do Sul, 2015).

De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, 2010) o volume estimado de azeitonas importadas pelo Brasil seria em torno de 220 mil toneladas, incluindo azeite e azeitonas. Se considerarmos o espaçamento de 5x5 m, com densidade de 400 plantas/ha, e a produção média de 20 kg de azeitonas/planta, seria necessário o cultivo de 28 mil ha com oliveiras, apenas para abastecer o mercado interno, considerando seu consumo atual.

O Brasil é o terceiro maior importador mundial de azeite e o segundo de azeitonas, sendo que na última década a importação brasileira de azeite quase que triplicou enquanto que a de azeitonas de mesa superou o dobro (TERAMOTO et al. 2013). O mercado nacional da olivicultura cresce a cada ano, devido ao aumento do consumo do azeite (BERTONCINI et al., 2010) e, também, ao incentivo que vem sendo dado aos agricultores tanto na forma de linhas de financiamento específicas, como por pesquisas promissoras que vem sendo divulgadas, além de técnicos especializados que estão realizando consultoria para os produtores, com destaque para os estados do Rio Grande

do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013).

De acordo com FAOSTAT, 2014 (*Food Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division*), os principais produtores mundiais de olivas são respectivamente, Espanha, Grécia, Itália, Turquia e Marrocos.

Mais do que qualquer outra árvore frutífera, a oliveira é uma planta funcional do sistema agrícola de muitos países e adquiriu grande importância sócio-econômica ao longo dos séculos, o que desempenhou um papel vital para a sobrevivência da espécie. A origem da oliveira está perdida no tempo, coincidindo e misturando-se com o desenvolvimento das civilizações do Mediterrâneo, que durante séculos governou o destino da humanidade e deixou sua marca na cultura ocidental (Consejo Oleícola Internacional, 2010).

Nos últimos 20 anos, mudanças socioeconômicas importantes em muitos países do Mediterrâneo têm impulsionado significativas melhorias tecnológicas no cultivo da oliveira. Estas alterações estão aumentando o risco de erosão genética do germoplasma de oliveiras tendo em vista que cultivares tradicionais locais estão sendo substituídas por poucas cultivares que são adequadas para as novas colheitas feitas mecanicamente nas plantações. Portanto, a identificação e a conservação de cultivares de oliveiras tradicionais é atualmente uma tarefa prioritária necessária para garantir o uso sustentável dessa cultura (RALLO et al. 2013; TRUJILLO et al., 2014), é atualmente, um dos principais objetivos do Banco Ativo de Germoplasma de oliveira da Embrapa Clima Temperado

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a germinação, aclimação, fertilização da cultivar Arbequina e a variabilidade genética da coleção de acessos de oliveiras *Olea europaea* L., pertencente ao Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS), através de *loci* SSR e caracteres morfológicos.

Assim sendo, o estudo foi conduzido na forma de três capítulos, o primeiro trata da germinação, aclimação e fertilização da 'Arbequina'. O segundo, visa a caracterização, através de análise molecular, com 20 *loci* SSR (Sequência Simples Repetida), os 72 acessos de *O. europaea* L.

pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de oliveiras da Embrapa Clima Temperado. Enquanto que o terceiro trata de análises morfológicas, levando em consideração seis caracteres fenotípicos, sendo dois qualitativos e quatro quantitativos, relacionados à folha e à flor, e sete *loci* SSR, para 12 acessos de oliveiras.

REVISÃO DA LITERATURA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Germinação

As sementes (caroços) de oliveiras são recalcitrantes e apresentam dormência mecânica e/ou fisiológica. Um dos maiores obstáculos para a germinação é o endocarpo rígido, que forma uma barreira tegumentar, além de outros fatores que também influenciam na sua dormência como a imposta pelo endosperma e pelo próprio embrião (LAGARDA et al., 1983a; LAGARDA et al., 1983b; LAGARDA e MARTIN, 1983).

Segundo Riach, (2007), existem diversos tratamentos que aumentam e aceleram a germinação das sementes de oliva, tais como: estratificação, pré-tratamentos térmicos, escarificação mecânica e química, lixiviação, e ainda, os tratamentos hormonais.

As sementes (caroços) de oliveira como já citado anteriormente, necessitam de tratamentos para superação da dormência mecânica e/ou fisiológica (ABU-QAOUD, 2005). Estudos relatam que tanto o endocarpo como endosperma atuam como barreiras da germinação da semente. O endocarpo não impede a embebição (uma vez que a absorção de água ocorre na semente através do mesmo). Além disso, não contém inibidores solúveis em água, que impedem a germinação. Pelo contrário, parece inibir a germinação através da resistência mecânica. Altas porcentagens de germinação só podem ocorrer quando a estrutura do endocarpo é alterada, reduzindo a sua resistência à expansão do embrião (CRISOSTO e SUTTER, 1985). Acreditava-se que havia inibidores da germinação no endocarpo, mas Crisosto e Sutter (1985) descartaram esta possibilidade quando comprovaram que sementes de 'Manzanillo' estratificadas com extrato de endocarpo germinam igualmente as estratificadas em água, (RIACH, 2007).

A estratificação remove a dormência fisiológica a qual é referida como sendo causada por ácido abscísico no revestimento interno da semente, (CRISOSTO e SUTTER, 1985). A influência de um inibidor no endosperma para o embrião pode ser superada pelo tratamento com frio, o que é provavelmente necessário para a interrupção ou inativação do inibidor. Pois mesmo com a remoção do endocarpo a germinação é lenta e irregular, devido a latência do embrião, (RIACH, 2007). Os resultados dos estudos obtidos por D'Angeli et al. (2013) relatam a capacidade de resposta ao frio no revestimento das sementes e de tolerância no embrião, propondo um papel para o tegumento na manutenção da tolerância ao frio do embrião, pelo aumento da cutinização do endosperma através de FAD2 e atividades da osmotina.

A germinação de sementes de oliveiras, ainda continua a ser um grande problema, pois é lenta, e em algumas sementes-populações podem continuar de forma irregular por até mais de três anos (SOTOMAYOR LÉON e CABALLERO, 1990). Voyiatzis, (1995) observou que sementes de oliveira exibem um estado de dormência proporcionado por fatores que residem parcialmente no endosperma e, em parte, dentro do embrião.

Métodos de Propagação

A oliveira, em nível comercial, é propagada vegetativamente por enxertia e estaquia. A propagação por sementes não é aconselhável em função da variabilidade genética e longo período juvenil, além da baixa germinação em condições de campo, inviabilizando a propagação comercial. Entretanto, pode ser utilizada na produção de porta-enxertos de cultivares difíceis de enraizar por estacas e em programas de melhoramento genético (CAÑAS et al., 1992).

Para a cultura da oliveira, a propagação por enxertia pode ser realizada. Entretanto, não há estudos sobre as melhores combinações de enxerto e porta-enxerto. Em estudos recentes de relações recíprocas entre enxerto e porta-enxerto, Caballero e Río (1997) verificaram que existe uma

forte interação, que determina as características agronômicas e pomológicas da combinação utilizada.

Segundo Bandino et al. (1999) problemas relacionados à dormência e a baixa germinação das sementes de porta-enxerto de oliveira são um dos obstáculos para propagação por enxerto de algumas cultivares, assim como para a utilização de mudas em programas de melhoramento.

Germinação *in vitro*

A cultura de tecidos pode ser uma prática viável para a propagação da oliveira. Entre as técnicas, a cultura de embriões *in vitro*, além de reduzir o tempo para obtenção de um novo indivíduo, permite boa uniformidade, e garante alto percentual de germinação. Embora não seja uma opção adequada para a propagação comercial, por causa da segregação genética, o cultivo de embriões é de grande importância para várias áreas de estudo, com destaque para as do melhoramento genético, da fisiologia e da bioquímica vegetal (SOUZA et al., 2012). A capacidade de embriões de oliveiras isolados para germinar foi relatado por Istambouli e Neville (1977). Além disso a padronização das condições de cultura foi descrito por Rugini (1986, 1990). A germinação *in vitro* de embriões serve para acelerar o desenvolvimento de plântulas em programas de melhoramento de oliveira (ACEBEDO et al., 1997).

Os objetivos da atual pesquisa de oliveiras na cultura *in vitro* visa principalmente o melhoramento genético (CAÑAS et al., 1987; CAÑAS e BENBADIS, 1988), obtenção de plantas livres de patógenos (RUGINI, 1986), e criopreservação de germoplasma. No entanto, para aplicar novas biotecnologias, nos procedimentos em desenvolvimento *in vitro* o material vegetal selecionado é essencial. O estabelecimento *in vitro* de oliveira ainda permanece bastante difícil para muitas cultivares, (RUGINI e FEDELI, 1990).

O potencial fisiológico das sementes e embriões é estabelecido pelo potencial genético de cada espécie ou variedade, (DELOUCHE, 1976). As sementes e embriões de oliveiras apresentam certas características, germinam tanto na luz como no escuro (fotoblásticas indiferentes). Seu meio

de cultivo deve proporcionar troca de gases com o embrião, o substrato deve ser livre de patógenos. E os hormônios usados para aumentar o crescimento são, citocininas, ácido giberélico e etileno (RIACH, 2007).

A germinação ocorre em duas semanas para embriões, e de 85 a 95 dias para sementes inteiras, embora se indique que as plantas que germinam a partir de embriões são menos vigorosas que as plantas cultivadas a partir de sementes, atribuindo essa diferença para o efeito nutricional do endosperma (ACEBEDO et al., 1997).

Aclimação

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando à aclimatização e rustificação em condições *ex vitro* constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade, uma vez que esse material passa de uma condição heterotrófica para autotrófica sofrendo, naturalmente, estresses fisiológicos (BANDEIRA, 2004).

A condição *in vitro* possui atmosfera saturada, os níveis de luz são menores, temperatura alta e constante, reduzidas trocas gasosas entre os recipientes e a atmosfera externa, ainda, elevadas concentrações de carboidratos e reguladores de crescimento no meio de cultura (DONNELLY e TISDALL, 1993).

A aclimatização das plantas *ex vitro* e a melhoria do metabolismo fotoautotrófico e decréscimo da taxa transpiratória diretamente relacionado com a umidade relativa do ar contribui para maiores taxas de fotossíntese líquida no início da aclimatização, sendo importantes para o melhor crescimento e porcentagem de sobrevivência das plantas (KIRDMANEE et al., 1996). Segundo Rugini (1984), experimentos realizados com três cultivares de oliveiras, Frantoio, Dolce Agogia e Moraiolo obtiveram taxa de sobrevivência após a aclimação acima de 70%, corroborando com os resultados de Jacob et. al. (2013) com a cultivar Galega vulgar com até 89,6% e de Mangal et al. (2014), com o cultivar Frantoio obtidas *in vitro* que apresentaram taxa de aclimatização de 78%.

Fertilização

A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes para o crescimento e produção da planta. Fertilizantes minerais, especialmente o nitrogênio, são elementos importantes para a nutrição das plantas (HARTMAN, 1988).

De acordo com Mesquita et al. (2006), o nitrogênio (N), além de fazer parte da proteína, está relacionado com vários mecanismos fisiológicos e metabólicos e seu efeito depende fundamentalmente da disponibilidade de água no solo. Na maioria das vezes, o N determina o padrão de desenvolvimento vegetativo da planta, estimulando principalmente o crescimento da parte aérea. É o elemento requerido em maior quantidade pela planta, constituindo-se, portanto, o principal elemento na fertilização de um olival.

Já o fósforo (P), é imprescindível na vida da planta. Atua na fotossíntese, na respiração, no armazenamento e na transferência de energia, na divisão celular, no desenvolvimento dos tecidos meristemáticos e em vários outros processos fisiológicos da planta. Além de promover a forma e o crescimento prematuro das raízes, o P aumenta a resistência da planta aos rigores do inverno, melhora a eficiência no uso da água, aumenta a resistência às doenças e a qualidade dos frutos. O P é um elemento que possui baixa mobilidade no solo, sendo, portanto, necessária sua incorporação nas camadas mais profundas, para que melhore sua eficiência de absorção, (MESQUITA et al., 2006). Segundo Raij (1991), o fósforo é um dos três macronutrientes, exigido em menor quantidade pelas plantas.

O potássio (K) é um elemento importante na formação e qualidade de frutos, na ativação de enzimas, síntese protéica e aumenta a resistência das plantas às doenças. As plantas absorvem o potássio da solução do solo e a diminuição desta concentração resulta em um gradiente químico em direção a rizosfera, criando um ambiente favorável a liberação de potássio não trocável (GOMMERS et al., 2005).

A oliveira é uma planta rústica que pode ser encontrada em terrenos de pouca fertilidade e em climas extremamente áridos. O desenvolvimento da

planta é variável segundo a cultivar e o meio onde ela se encontra (GUERRERO, 2003).

De acordo com El Sonbaty et al. (2012), o equilíbrio entre fertilizantes NPK é útil no ciclo de crescimento anual de oliveiras, enquanto que, nitrogênio aumenta os níveis de clorofila nas folhas e fotossíntese, portanto, promovem o crescimento de brotos e floração, fornecer as oliveiras, doses adicionais de nitrogênio antes da floração e frutificação revelou-se benéfico. Isso também aumenta a capacidade da oliveira para utilizar outros nutrientes (STAN e DAVID, 2007).

A oliveira necessita de fósforo para promover o crescimento das raízes e formação de botão de flor, (STAN e DAVID, 2007). O potássio (K) também foi classificado como um nutriente importante para as oliveiras. Em pomares cultivados em solos com deficiência de K, árvores fertilizadas apresentaram aumento no crescimento e produtividade, em comparação com árvores não fertilizadas. A fertirrigação com potássio em oliveiras aumentou significativamente o rendimento, (EL-SHAZLY e NASSER, 2001 e HUSSEIN, 2008). A importância do boro (B) na nutrição de olivas também foi enfatizada nos primeiros estudos. A deficiência de boro foi considerada um distúrbio nutricional em todo o mundo cujos sintomas podem ser ajustados por meio de aplicação de boro como um fertilizante. No que diz respeito ao fósforo (P), ao que parece não houve casos de deficiência, com árvores respondendo a aplicações de P, relatados de oliveiras cultivadas no campo (HARTMANN et al., 1966). Estudos de Malek e Mustapha, (2013), relatam que os teores de N, P e K tendem a diminuir do início da brotação dos ramos até a entrada em repouso das folhas do ano, as exportações de N são mais importantes nas folhas (1,8%) no estágio de maturidade do que em frutos (0,7%). Na verdade, a oliveira reconstitui suas reservas em fontes de órgãos (folhas velhas, galhos), para fazer seu estoque de nitrogênio que mobiliza para o próximo ano. Exportações em fósforo são mais elevadas no caule (0,21%) do que nas folhas (0,15), então nota-se uma incidência fraca, da transferência do fósforo, no sentido dos frutos para seu conteúdo em folhas. No entanto, as exportações de potássio são mais altas em frutos (1,9%) do que nas folhas (1,0%) e caule (0,5%), sendo o elemento extraído em maior quantidade, 4,5 g

kg⁻¹ de azeitona. Isso indica uma melhor translocação do potássio para o fruto da oliveira, pois esse elemento é o nutriente mais exportado pelas oliveiras. Árvores com teores de K equilibrados toleram melhores condições de estiagem fechando os estômatos no momento de alta radiação solar (INTERNATIONAL OLIVE CONCIL, 2007).

A avaliação das exportações foi feita para a variedade Arbequina. De acordo com Malek e Mustapha (2013), já foram propostas doses para programas de fertirrigação. As percentagens de fertilizantes foram estabelecidos para cada elemento para cobrir o máximo de necessidades de oliveira para os elementos essenciais NPK, que deduziu as quantidades de fertilizantes dadas de acordo com o estágio de desenvolvimento da fenologia da oliveira. A percentagem de fertilizante de nitrogênio é alta, especialmente durante o início da floração (30%), porque as oliveiras irão desenvolver caules, folhas, flores e desenvolvimento dos frutos através da mobilização das reservas dos órgãos de origem, que exigem um alto nível de nitrogênio durante este período. A dose administrada na fase de frutificação (20%), e no desenvolvimento do fruto e fase de endurecimento (20%) e na ruptura da cor da fruta (20%). O adubo de fósforo é aplicado especialmente com o início da atividade de raiz, (30%), floração (30%) e o desenvolvimento do fruto (15%). O fertilizante de potássio é dividido durante o período de desenvolvimento do fruto de frutificação para a fase de troca de cor do fruto.

Em ensaios de longa duração, por um período de 13 anos, FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al. (2009), não encontraram efeito significativo sobre a produção e crescimento de oliveiras com aplicações de N foliar e doses via solo e o controle não fertilizado. Os mesmos autores relatam que não houve redução de rendimento ou de crescimento quando a concentração de N foliar foi inferior ao limiar estabelecido, sob condições naturais representados por terrenos não fertilizados, ganhos e perdas foram equivalentes, por isso as concentrações foliares de N mantiveram-se acima dos níveis de deficiência durante muitos anos, e também a falta de resposta no azeite à adubação nitrogenada observada em estudos anteriores.

Segundo Rodrigues et al. (2012), levantamentos iniciais salientaram que a oliva marcadamente respondeu a fertilizante nitrogênio (N) em solos de

baixa fertilidade. Oliveiras cultivadas em solos mais férteis mostraram muito menos resposta à adubação nitrogenada.

Entre os diversos macro e micro nutrientes, destacam-se o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, enxofre e boro, que irão influenciar no crescimento, florescimento e na produção da qualidade do azeite de oliva. Poderão também refletir nos compostos presentes no azeite, e na estabilidade do produto final (ESCOBAR, 1994). A formação dos ramos e folhas é condicionada pela presença dos nutrientes (Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio e Boro), visto que teores elevados levam a um crescimento vegetativo acentuado, (PAULUS, 2011). Atualmente, tem sido indicada a técnica de fertirrigação para oliveiras, (MALEK e MUSTAPHA, 2013).

ASPECTOS MOLECULARES

Marcadores Moleculares de DNA

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofílica, cor de pétala ou morfologia foliar. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Já os marcadores moleculares se baseiam na variação natural da sequência de bases do DNA, não sendo influenciados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo. Os marcadores moleculares são utilizados para propósitos de impressão digital de DNA, para seleção genética e mapeamento cromossômico, (BRACCI et al., 2011).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares os quais se diferenciam de acordo com a abundância genômica, nível de polimorfismo

detectado e informação genética, especificidade dos *loci*, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro. Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco, e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003).

O avanço da biologia molecular e da informática nos últimos anos têm modificado o modo de abordar os trabalhos sobre material vegetal e melhoramento genético em plantas cultivadas. O uso de marcadores moleculares em oliveiras, iniciaram-se tardiamente, no meio dos anos oitenta (RALLO et al., 2005), sendo amplamente empregados na atualidade (BRACCI et al., 2011).

Segundo Bracci et al. (2011), em oliveiras os marcadores baseados em DNA são amplamente utilizados em pesquisas, tais como a caracterização do enorme germoplasma de olivas, em programas de melhoramento genético e nas cultivares para a rastreabilidade do azeite. Os principais marcadores utilizados em estudos de oliveiras são: RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), SCAR (Região Amplificada de Sequência Caracterizada), ISSR (Sequência Simples Inter Repetitiva), variação da sequência do DNA ribossomal e citoplasmático, RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição), Polimorfismo de DNA ribossomal, Polimorfismo de DNA citoplasmático, Polimorfismos em cloroplasto (cpDNA) e mitocondrial DNA (mtDNA). E os SSRs (Sequências Simples Repetitivas), também conhecidos como microssatélites, que são regiões de DNA, consistindo de repetição em tandem de mono-, di-, tri-, tetra-, ou penta-nucleotídeos de unidades, as quais estão dispostas ao longo do genoma da maioria das espécies eucarióticas (POWELL et al., 1996) sendo que o número de repetições destas unidades nucleotídicas gera polimorfismo entre os genótipos. Sequências nucleotídicas de olivas foram identificadas primeiramente nos anos 90, identificação de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) de sequência genômica do cloroplasto (BRACCI et al., 2011). Hoje em dia, os microssatélites são os marcadores preferidos para estudos genéticos em

oliveiras por causa de seu elevado polimorfismo e reprodutibilidade, os quais já foram utilizados para diferentes aplicações, tais como discriminação de cultivares (SARRI et al., 2006; FENDRI et al., 2010), estudo das relações entre oliveira selvagem e cultivada (BELAJ et al., 2007), construção de mapas de associação (DE LA ROSA et al., 2003), análise de paternidade (MOOKERJEE et al., 2005), identificação de composição de azeite varietal (ALBA et al., 2009; AYED et al., 2009) e se mostrou eficiente para transferabilidade para outras espécies dentro do gênero *Oleaceae*, (De LA ROSA et al., 2002). Além dessas aplicações, recentemente, algumas tentativas para melhorar a aplicação da técnica de SSRs foram feitas, a fim de comparar resultados das análises moleculares entre diferentes laboratórios, Bracci et al. (2011).

Segundo La Mantia et al. (2006), o enorme patrimônio genético e o grande número de sinônimos e homônimos em oliveira exigem métodos precisos de discriminação na identificação de cultivares e sua correta classificação. Diferentes técnicas empregadas para avaliar a diversidade de oliveiras, baseadas na caracterização morfológica, bioquímica ou agrônômica adaptadas para a avaliação da variabilidade entre as cultivares (BARONE et al., 1994; BARRANCO et al., 2000; OUAZZANI et al., 1993; TRUJILLO et al., 1995), por isso, a aplicação de marcadores de DNA na classificação de cultivares melhoraram o sistema de discriminação, por ser independentemente das condições ambientais, além de fornecer maior polimorfismo. A utilização de marcadores de DNA fornecem um bom sistema de discriminação, independentemente das condições ambientais.

Olea europaea subsp. *europaea* é uma espécie diplóide ($2n = 46$), encontrada de duas formas: selvagem (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) e cultivada (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). O cruzamento com outras subespécies e com as plantas selvagens é possível e pode produzir descendentes férteis, proporcionando acesso a um enorme *pool* de variabilidade genética, (MULEO et al., 2012).

Marcadores Microssatélites - SSR (Sequência Simples Repetitiva)

O DNA satélite foi descoberto em 1960. Cientistas descobriram que, quando centrifugavam o DNA sob certas condições, este se apresentava em duas ou mais camadas: uma banda principal, contendo genes, e bandas secundárias, que foram chamadas bandas satélites. As bandas satélites mostravam-se como sendo constituídas de sequências de DNA repetidas e muito longas (CAMPOS, 2003). *Loci* satélites podem ser constituídos de repetições com tamanho de dois a vários milhares de pares de bases (pb). Estão localizados na heterocromatina, principalmente no centrômero (TAUTZ, 1989).

SSRs consistem em 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, e são classificadas pelo motivo repetido, podendo ser mononucleotídeo, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Os *loci* microssatélite são multi-alélicos codominantes, e têm sido classificados de acordo com a natureza das repetições, podendo ser: perfeito (sem interrupções), imperfeito (com uma ou mais interrupções) e compostos (repetições adjacentes de uma sequência diferente), (WEBER, 1990).

Os marcadores microssatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos atualmente. Este polimorfismo é gerado pela perda ou mais provável pelo ganho de sequências repetidas. Este fenômeno não é ainda completamente entendido, porém acredita-se que esta expansão ocorra durante a replicação. Os SSRs são inerentemente instáveis e os modelos que têm sido propostos para explicar a geração de microssatélites e instabilidade são o deslizamento da DNA polimerase (*slippage*), através da atividade exonucleásica de proofreading 3'→5'da DNA polimerase, durante este processo, são formados *hairpins* fazendo com que a enzima replique a mesma região duas vezes, causando a recombinação desigual entre cromossomos homólogos, as quais estão sendo cada vez mais desvendados, de maneira a propor taxas de mutação na ordem de 10^{-3} a 10^{-6} (HOELZEL, 1998).

Devido à sua alta mutabilidade, microssatélites são conhecidos por ter um papel significativo na evolução do genoma pela criação e manutenção de variação genética quantitativa (TAUTZ; TRICK; DOVER, 1986; KASHI; KING;

SOLLER, 1997). Apesar dos microssatélites serem revelados como promotores das taxas evolutivas, são conservativos em suas regiões flanqueadoras e podem persistir por um longo período sem modificações (ZARDOYA; AROUHEIF; MEYER, 1996). Os elementos repetitivos são uma característica importante dos genomas eucarióticos e, na verdade, representam uma grande proporção da variação no tamanho do genoma. No genoma humano, 44% dos nucleotídeos são fornecidos por elementos repetitivos, muitos desses são derivados de elementos transponíveis ativos e são frequentemente julgados como DNA sem função (STEIN, 2001).

Os microssatélites ocorrem em todos os genomas eucarióticos e, parcialmente, também em procariotos e eubactérias (TAUTZ, 1989). São encontrados com maior frequência em genomas de eucariotos, sendo CA e TG os elementos repetidos mais frequentes em mamíferos e AT em plantas, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Os microssatélites podem ser encontrados em qualquer parte do genoma, tanto em regiões codificadoras quanto em não-codificadoras. Segundo You-Chun Li et al. (2002) os microssatélites são mais abundantes em regiões não-codificadoras. Esse argumento pode ser justificado, pois em regiões promotoras, o comprimento de SSRs pode influenciar a atividade da transcrição (KASHI; KING; SOLLER, 1997).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), os SSRs são frequentemente distribuídos ao acaso. Entretanto, estudos atuais demonstram que existem padrões específicos de distribuição dos diferentes motivos repetidos nos diferentes tipos de sequências: codantes, não codantes, introns e regiões intergênicas.

As enzimas e outras proteínas envolvidas em vários aspectos do processamento de DNA (replicação e reparação) e remodelagem da cromatina podem ser responsáveis pela especificidade nos taxa e abundância de microssatélites. Deve-se ressaltar que não somente a repetição do genoma difere, mas também o tipo mais frequente de microssatélites são muito diferentes (HANCOCK, 1996).

O desenvolvimento de marcadores de microssatélites é uma técnica muito trabalhosa. Zane, Bargelloni e Patarnello (2002) descrevem três passos

para obtenção de *primers* microssatélites: a primeira é através da identificação das sequências simples repetidas em biblioteca de DNA genômico por meio da técnica de hibridização de colônias (RASSMANN; SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1991); o segundo passo envolve o mecanismo de extensão do *primer* utilizando-se o DNA genômico do *fago M13 helper* para a clonagem de fragmentos de DNA para espécie de interesse (PAETKAU, 1999; OSTRANDER et al., 1992); e a última etapa consta da construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para determinadas repetições (HAMILTON et al., 1999).

SSR e Oliveiras

O conteúdo total de microssatélites no genoma correlaciona-se com o tamanho do genoma dos organismos, (HANCOCK, 1996). O genoma de oliva é em grande parte descaracterizado, apesar da crescente importância desta espécie como oleaginosa. No que diz respeito ao genoma inteiro de oliveiras, cerca de 50% parece ser formado de sequências altamente repetidas. Destes, cerca de 2/3 são repetições em *tandem* pertencentes a cinco famílias principais e outras famílias menores (MULEO et al., 2012). No seu conjunto, os resultados das análises mostram a paisagem peculiar do genoma de oliva, relacionada com o aumento maciço de repetições em *tandem*, mais do que a relatada para qualquer outro genoma sequenciado de planta (BARGHINI et al., 2014).

Os marcadores SSR são escolhidos para estudos de identificação de variedades em oliveiras, pois são transferíveis, hipervariáveis, altamente polimórficos, por reação em cadeia da polimerase, multialélicos, baseados em codominância, relativamente simples de interpretar e mostram elevado conteúdo de informação, Alba et al. (2009b). Ainda, a diversidade genética das olivas com base na análise SSR revela ser um eficiente, rápido, e adequado marcador genético para a identificação de cultivares de oliva (GOMES et al., 2009).

Apesar da importância econômica, cultural e ecológica das oliveiras na área do Mediterrâneo, estendendo-se agora a outras regiões, as espécies de

oliveiras têm sido mal caracterizadas a nível genético e genômico em relação a outras culturas de espécies frutíferas. Portanto, ainda permanece desconhecida a herança da maioria dos genes que controlam o desempenho agronômico e características de qualidade, apesar de nos últimos 30 anos uma ampla pesquisa molecular esteja sendo realizada sobre o germoplasma de oliveiras (RUGINI et al., 2011). Na bacia do Mediterrâneo, de fato, é conservado um grande número de cultivares de oliveira (BARTOLINI et al., 1994; MULEO et al., 2012).

Novas informações a respeito das sequências do genoma de oliveiras serão muito utilizadas para identificação de genes envolvidos em características agronômicas que poderão ser usados para melhoramento das características de produtividade e nutricionais desta cultura (BRACCI et al., 2011). Díaz et al. (2007) relata que marcadores microssatélites poderão ser muito úteis para confirmar os resultados futuros sobre o controle genético do sistema de compatibilidade que ocorre em oliveiras, que ainda é desconhecido.

Os marcadores de microssatélites possuem capacidade de identificar um grande número de polimorfismos, possibilitando caracterizar diferentes genótipos permitindo a distinção confiável entre cultivares muito próximas. A impressão digital baseada em SSR de cultivares de oliveiras pode ajudar a gerar bancos de dados moleculares que facilitarão a gestão de coleções de cultivares, controle comercial de material vegetal, e seleção de genótipos de programas de melhoramento (BELAJ et al., 2004).

A oliveira foi propagada vegetativamente, para manter as características agronômicas e morfológicas de genótipos selecionados, por milênios (ZOHARY e HOPF, 2000); no entanto, em muitos casos, a propagação por mudas foram utilizadas devido a uma série de razões, entre elas a falta de disponibilidade de grandes quantidades de material propagativo, tentativas voluntárias de obtenção de novas cutivares, recuperação ocasional de oliveiras silvestres de sementes dispersadas por animais ou outras causas. Estes eventos foram comuns em novas áreas de plantio de oliveiras, acredita-se que em áreas tradicionais de plantio, na bacia

do Mediterrâneo, este tipo de eventos foi, provavelmente, corriqueiro no início da domesticação de oliva (SOLERIET et al., 2010; BEGHÈ et al., 2015).

Até o momento, a grande diversidade genética das oliveiras cultivadas, a confusão sobre os nomes dados para cada genótipo, a distribuição de mais variedades, além do grande número de coleções estabelecido em cada país, representam fatores importantes que não permitem o desenvolvimento de um confiável banco de dados de perfis de SSRs para a caracterização das cultivares (BALDONI et al., 2009).

Essa riqueza do germoplasma de oliveira cultivada representa um caso incomum entre culturas hortícolas, como consequência da longevidade da espécie e falta de renovação para melhoramento de genótipos. Mais de 1.200 variedades cultivadas, 79 coleções nacionais e internacionais localizadas em 24 países armazenam cerca de 4.200 genótipos e mais de 5.300 nomes de cultivares são reconhecidas (BARTOLINI et al., 2005; BELAJ et al., 2012).

Por causa dessa confusão em torno da origem da maioria das cultivares de oliveira, a sua identificação molecular e averiguação de origem é extremamente útil para a gestão de germoplasma, bem como para programas de melhoramento (SARRI et al., 2006).

SSR foram desenvolvidos e utilizados com sucesso na discriminação de cultivares de oliveira (RALLO et al., 2000; SEFC et al., 2000; CARRIERO et al., 2002; CIPRIANI et al., 2002). De acordo com Baldoni et al. (2009), em oliva, similar a outras espécies vegetais, todos os SSRs identificados possuem repetições di-nucleotídicas, devido à sua alta frequência em genomas (CARRIERO et al., 2002; CIPRIANI et al., 2002; DE LA ROSA et al., 2002; DÍAZ et al., 2006; RALLO et al., 2000; SABINO GIL et al., 2006; SEFC et al., 2000). A principal sequência repetida é a de AG / CT, mais comum em plantas (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). A padronização de um conjunto comum de marcadores microssatélites e de protocolos rigorosos para a tipagem de DNA do azeite ou para, estudos genéticos de populações de oliveiras (BRETON et al., 2008) ou discriminação de cultivares (BALDONI et al., 2006; BELAJ et al., 2004b) seria um ótimo avanço tecnológico a nível mundial. Desta forma, a seleção dos marcadores SSRs com elevada capacidade discriminatória, bem como a padronização de uma estratégia

comum para comparação de dados será capaz de permitir a convergência de dados, uma condição preliminar para identificação do genótipo e certificação, bem como para troca e gestão de dados, tornando-se útil para a criação de uma base universal de dados moleculares de recursos genéticos de oliveiras (BALDONI et al., 2009).

ASPECTOS MORFOLÓGICOS-MOLECULARES

Marcadores morfológicos e moleculares

De acordo com Chiappetta e Muzzalupo (2012), o setor oleícola nos dias atuais está se expandindo cada vez mais para áreas da Austrália, América do Sul (Argentina, Chile) do Norte (Estados Unidos), África do Sul e até mesmo em lugares exóticos, como o Havaí. Dada a sua ampla gama de distribuição, está se tornando cada vez mais urgente para identificar plantas em diferentes intervalos de distribuição no mundo a fim de evitar casos de homonímia, sinonímia e assim erros de identificação, uma classificação de confiança de todas as variedades pode ser alcançada sem confusão desnecessária. Neste contexto, juntamente com as características morfológicas a aquisição de informações adicionais sobre marcadores moleculares é essencial. Este aspecto representa um passo fundamental e indispensável para preservar as principais variedades de olivas e também para preservar genótipos com menor incidência, a fim de evitar uma perda de diversidade genética. Uma pesquisa destacou o uso de marcadores morfológicos associados com moleculares para caracterizar e identificar variedades de oliveira (Ercisli et al., 2009; Muzzalupo et al., 2009).

Em Rallo et al. (2000), foi relatado o desenvolvimento dos primeiros marcadores microssatélites para oliveiras, aonde foi confirmada a utilidade deste tipo de marcador como uma poderosa ferramenta para a identificação de cultivares. Seu caráter codominante foi confirmado, considerado um sistema ideal para análise de paternidade e mapeamento de ligação.

Rotondi et al. (2003), destaca a importância da caracterização morfológica para avaliar a diversidade genética existente das espécies de culturas, principalmente para aquelas, como é o caso das oliveiras, com um bem preservado e grande patrimônio de cultivares, apesar da alteração dos ambientes onde são cultivadas. Esta questão é de particular importância em áreas onde um número de variedades mostram adaptação com as condições ambientais locais difíceis. Dentro das espécies de oliveira, mais de 2000 cultivares já foram descritas para a área do Mediterrâneo como um todo (Bartolini et al., 1998). A origem e a distribuição geográfica de tão alta variabilidade de oliveiras cultivadas ainda está sob investigação. A maioria dos estudos concordam que depois de um ancestral ocorreu a propagação de algumas variedades de oliveiras ao longo da bacia do Mediterrâneo, a maioria das cultivares modernas foram derivadas a partir do cruzamento destas cultivares antigas entre si ou pela sua reprodução com plantas selvagens, seguido por seleções locais. (Angiolillo et al., 1999; Besnard e Berville, 2000; Besnard et al., 2001). As abordagens clássicas para a identificação de cultivares de oliveira são baseadas em morfologia (Barranco e Rallo, 1984; Cimato et al., 1993; Leitão, 1988; Prevost et al., 1993; Tous e Romero, 1993). Embora estes marcadores sejam uma ferramenta muito útil para a identificação, eles têm limitações por causa das influências ambientais, e a necessidade de extensas observações de plantas maduras (Belaj et al., 2001). Ainda que, a utilização da caracterização morfológica seja questionável porque a expressão das características morfo-biológicas é fortemente afetada pelas condições ambientais, a idade das árvores, e o estágio fenológico das plantas, a abordagem morfológica continua a ser o principal passo inicial para a descrição e classificação do germoplasma de oliveiras (Rotondi e Magli, 1999). O método tradicional para caracterização de plantas agro-morfológica é o passo comum em melhoramento de plantas para a seleção de progenitores e também representa a primeira escolha usada para descrever e classificar o germoplasma, (Belaj et al., 2001).

Segundo Cipriani et al. (2002), caracteres morfológicos e biométricos têm sido amplamente utilizados para descrever o germoplasma de oliveiras. Marcadores bioquímicos e moleculares foram adicionados às ferramentas, tal

como isoenzimas (Ouazzani et al., 1993; Trujillo e Rallo, 1995), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), (Fabbri et al., 1995; Vergari et al., 1998; Hess et al., 2000), AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), (Angiolillo et al., 1999), e ISSR (Sequência Simples InterRepetitiva), (Hess et al., 2000), que foram utilizados para caracterizar cultivares. Mais recentemente, SSRs (Sequências Simples Repetitivas), vários microsátélites têm sido isolados a partir de oliveiras (Rallo et al., 2000; Sefc et al., 2000). A caracterização morfológica é baseada nos descritores desenvolvidos pelo Conselho Oleícola Internacional, 2000. A discriminação de cultivares de oliveira baseados em descritores morfológicos, juntamente com marcadores moleculares, particularmente SSR, são hoje amplamente usados como análises complementares e identificação não ambígua de acessos mantidos em coleções, (CARUSO et al., 2014). D'Imperio, et al. (2011), relata que as análises moleculares e morfológicas são ferramentas complementares para caracterização de oliveiras e são válidos para distinguir novas adesões. Separadamente, as duas técnicas são incompletas porque os dados moleculares são inúteis para a identificação de cultivares por agricultores. Em contraste, os dados morfológicos são inúteis sem uma atribuição de base molecular devido à variabilidade das pressões ambientais.

CAPÍTULO 1

Germinação, aclimação e fertilização de oliveira (*Olea europaea* L.) ‘Arbequina’

INTRODUÇÃO

No Brasil, e especialmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais a olivicultura está se expandindo, devido à adaptação em diferentes condições edafoclimáticas e importância socioeconômica, (PAULUS, 2011). Embora as oliveiras sejam propagadas comercialmente por métodos de propagação vegetativa, a germinação de sementes é o único método que permite a geração controlada de híbridos e, portanto, a possibilidade de obtenção de novas variedades em programas de melhoramento (BRHADDA et al., 2000).

Numerosos tratamentos tem sido aplicados para superar a dormência e melhorar a germinação das sementes, entre eles a escarificação mecânica e química (SOTOMAYOR LÉON e CABALLERO, 1990), manipulação de temperaturas de pré-germinação, entre outros. A cultura de tecidos pode ser uma prática viável para a propagação da oliveira. Entre as técnicas, a cultura de embriões *in vitro*, além de reduzir o tempo para obtenção de um novo indivíduo, garante alto percentual de germinação.

Quando se obtém mudas e estas são transferidas para uma condição externa, as plantas devem passar por um período de aclimatização, em que a redução da umidade relativa e a exposição à alta irradiância são efetuadas de maneira gradativa, no sentido de aumentar as chances de sobrevivência das plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Dentre as cultivares plantadas no Brasil destaca-se a 'Arbequina', com 50% da área plantada (OLIVEIRA et al., 2012), sendo uma das mais importantes cultivares espanholas devido as suas características de vigor vegetativo, precocidade, alto rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças (OLIVEIRA et al., 2003).

O cultivo da oliveira tem tido uma importante intensificação nos últimos anos. Mas este progresso não foi acompanhado em termos de irrigação e fertilização. A fim de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade do azeite, cuidados, tais como poda, irrigação, adubação, demoram um certo tempo para proteger o cultivo. O conhecimento do comportamento da variedade como Arbequina conduzida sob sistema de plantio de alta densidade e da avaliação do seu estado nutricional em condições agrícolas irrigadas para a elaboração de programas de fertilização se torna uma necessidade para melhor administrar suas potencialidades para uma melhor produção neste setor (MALEK e MUSTAPHA, 2013). Estudos de Rufat et al. (2014), verificaram o comportamento da 'Arbequina' super-intensiva e foi demonstrado ser afetado pela disponibilidade de nitrogênio e potássio. A adubação nitrogenada teve um efeito direto no aumento da produtividade, mas o potássio foi apenas útil se reservas do solo e da árvore tinham sido esgotadas. Muitos são os solos em que a oliveira pode ser cultivada, entretanto, a quantidade e tipo de nutrientes neles existentes influenciam

diretamente no seu desenvolvimento. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial germinativo das sementes da cultivar Arbequina com e sem endocarpo, bem como, após a aclimação das mudas analisar a resposta ao uso de fertilizantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Fisiologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, Cultura de Tecidos de Plantas e nos Campos Experimentais da Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS). Foram utilizadas sementes de oliveiras da cultivar Arbequina, as quais foram semeadas *in vivo* e *in vitro*, para serem usadas como porta-enxertos.

Germinação *in vivo* (casa de vegetação) de sementes íntegras e sementes sem endocarpo de (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina

Sementes de *Olea europaea* L., cv. Arbequina com e sem endocarpo, foram submetidas às condições de casa de vegetação para verificar a germinação. Antes do teste de germinação as sementes foram armazenadas em câmara fria, a temperatura constante de 5⁰C. Este período de refrigeração é necessário, pois a influência de um inibidor presente no endosperma poderia ser superada pelo tratamento com frio. Foram usadas 200 sementes com endocarpo e 200 sementes sem endocarpo, foram rompidas com auxílio de torno, para retirada do endocarpo, distribuídas em vasos com substrato comercial plantmax®. Foi realizada rega quatro vezes por semana, e avaliação semanal da germinação. Após o período de quatro meses foram realizadas as avaliações de sobrevivência e crescimento (número de folhas, altura e diâmetro de colo). Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas germinadas, (tabela 1).

Germinação *in vitro* (sementes x embriões)

Para a inoculação *in vitro* o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, de cinco explantes em cada frasco, totalizando 25 sementes e 25 embriões, sendo os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As sementes foram rompidas com auxílio de torno, para retirada do endocarpo e desinfestadas com álcool etílico (70%), durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo) por 15 minutos, twenn 80 e lavagem tríplice com água (destilada e autoclavada). Logo em seguida, as sementes foram embebidas em água estéril por 24 h. A metade dessas sementes foram rompidas com auxílio de estilete para extração do embrião. Tanto as sementes como os embriões foram inoculados em frascos contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de ácido giberélico ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e 1 mg L^{-1} do antioxidante PPM (Plant Preservative Mixture), com pH ajustado para 6,2. Os frascos com as sementes e embriões foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $32 \text{ } \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias foram avaliadas a germinação das sementes sem o endocarpo e dos embriões. Aos 115 dias, avaliaram-se o comprimento da parte aérea e o número de folhas, diâmetro de colo e ramos secundários por plântula.

Aclimação e fertilização das mudas

Foram coletados frutos da cultivar Arbequina, do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado. Para a inoculação *in vitro* as sementes foram rompidas com auxílio de torno, para retirada do endocarpo e desinfestadas em imersão em álcool etílico (70%), durante 1 min, hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo) e monooleato de sorbitan (TweenTM 80) por 15 min, e por fim feita a lavagem tríplice com água (destilada e autoclavada). Em seguida, as sementes foram inoculadas em frascos contendo meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico e 1 mg.L^{-1} do antioxidante PPM (Plant Preservative Mixture), com pH ajustado para 6,2 antes da adição do ágar na concentração de 6 g.L^{-1} e,

posteriormente, autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (150x20 mm) com 10 mL de meio de cultura. Os frascos com as sementes foram mantidos em sala de crescimento a 25±1°C, intensidade luminosa de 32 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Aos 90 dias de incubação, avaliou-se o percentual de germinação e contaminação bacteriana. Os frascos que apresentaram contaminação foram eliminados após registro. Aos 115 dias de idade, as plantas obtidas da germinação *in vitro* (sementes íntegras), foram transferidas para condição *ex vitro*, em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado, com umidade relativa do ar em torno de 80% e temperatura de 27°C, em recipientes com substrato comercial Plantmax®. Foram estabelecidos quatro tratamentos diferentes, com 50 plantas em cada um, sendo: T₁ Testemunha (água destilada), T₂ Produto Supra Starter (2,0g / muda = embalagem) – aplicação no substrato, atuando sobre o sistema radicular das plantas jovens, estimulando vigoroso enraizamento e desenvolvimento equilibrado da parte aérea. Com a formulação N:P:K 13-13-21 + 1,8% de Boro (SUPRA FERTILIZANTES, 2016). T₃ Produto Suprafol (1,0 mL para 200mL de água) aplicação nas plantas que é um fertilizante organo-mineral líquido totalmente solúvel para aplicações foliares contendo macro-elementos. Quando aplicado regularmente favorece um equilibrado desenvolvimento vegetativo e produtivo das plantas. Formulação de N:P:K 08-02-03 + 15% de Carbono Orgânico (SUPRA FERTILIZANTES, 2016) e o T₄ que une os tratamentos 2 e 3 Produto Supra Starter (2,0g / muda = embalagem) – aplicação no substrato, e Produto Suprafol (1,0 mL para 200mL de água)- aplicação nas plantas. As aplicações nos tratamentos (T₂, T₃ e T₄), primeira com 20 dias após o transplante, segunda 20 dias após a primeira e terceira 20 dias após a segunda. As variáveis analisadas: n° de folhas por planta, altura das plantas, diâmetro do colo (medido 4,0 cm acima do solo), n° de ramos secundários formados. Eram realizadas regas quatro vezes por semana nas mudas. As variáveis foram mensuradas da seguinte forma: primeira (caracterização do material): no dia da repicagem, segunda: 20 dias após a primeira avaliação, terceira: 20 dias após a segunda avaliação, quarta, 20 dias após a terceira avaliação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de dez plantas por tratamento, totalizando duzentas plantas,

sendo os dados submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As avaliações de crescimento foram realizadas levando em consideração à sobrevivência das mudas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação *in vivo* (casa de vegetação) de sementes íntegras e sementes sem endocarpo de (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina

A germinação *in vivo* de sementes da 'Arbequina' com endocarpo não ocorreu e sem o endocarpo uma porcentagem muito baixa germinou, apenas 8,5% (Tabela 1), aos 120 dias. Essa baixa germinação também foi observada por Canãs et al. (1987), (8% do total testado), e foi mais baixa do que para embriões isolados. Ainda conforme estes autores, naqueles raros casos em que uma semente germinou, ela não atingiu a fase de crescimento. Em nosso trabalho as poucas amostras das sementes que germinaram formaram mudas (Tabela 1). Já as sementes com cobertura consistentes não conseguiram germinar. Portanto, a germinação de embriões de oliveira é impedida pela presença de inibidores na semente. O exato mecanismo pelo qual os inibidores atuam e como eles são inativados permanecem desconhecidos (Canãs et al., 1987) até hoje.

Tabela 1 - Germinação de sementes de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina, com e sem endocarpo e desenvolvimento inicial das plantas em casa de vegetação.

Germinação %		
Sementes com endocarpo	Sementes sem endocarpo	
0%	8,50%	
Variáveis de desenvolvimento das plantas*		
Nº de folhas	Altura	Diâmetro de colo
6,71±2,62	5,28±0,2	1,53±0,1

*Média±desvio padrão de 17 plantas aos 120 dias após instalação do experimento

Dessa forma, as sementes (caroços) de oliveiras apresentam dormência mecânica e/ou fisiológica. O endocarpo rígido, forma uma barreira tegumentar, além de outros fatores que também influenciam na sua dormência como a imposta pelo endosperma e pelo próprio embrião (LAGARDA et al., 1983a; LAGARDA et al., 1983b; LAGARDA e MARTIN, 1983). Contudo, o potencial fisiológico das sementes é estabelecido pelo potencial genético de cada cultivar, (DELOUCHE, 1976).

Germinação *in vitro* (sementes x embriões)

Os embriões de 'Arbequina' germinaram em aproximadamente 15 dias, depois de colocados no meio de cultura, enquanto que a germinação de sementes foi de 60-90 dias, com médias de germinação aos 90 dias sementes de 42,11% e embriões de 55,33% (Figura 1). De acordo com Acebedo et al., 1997, em que os embriões de todas as cultivares germinadas uniformemente dentro de 10-14 dias em meio de cultura, enquanto que o tempo de germinação de sementes foi 55-95 dias, dependendo da cultivar. A 'Arbequina' diferiu estatisticamente na sua porcentagem de germinação quando comparadas as datas de sementes sem endocarpo e o embrião. Segundo Santos et al. (2015), é importante ressaltar que a germinação de embriões é mais rápida comparada às sementes íntegras reduzindo o tempo para obtenção de um novo indivíduo, resultados estes de grande relevância tendo em vista a dificuldade de estabelecer e uniformizar a germinação de sementes de oliveiras. No trabalho de Acebedo et al. (1997), a germinação de embriões foi de 3-15 vezes mais elevada do que aquele das sementes de acordo com a cultivar. Conforme Souza et al. (2011), embriões de 'Santa Catalina' tiveram 100% de germinação em meio MS *in vitro*. Esta alta taxa de germinação e a rapidez nos processos observados devem-se, segundo os autores, à qualidade fisiológica dos embriões e à alta disponibilidade de macro e micronutrientes, vitaminas e aminoácidos no meio básico MS, além de condições controladas de ambiente. Em nossos estudos, também foi mais rápida e elevada a porcentagem de germinação de embriões do que de sementes para cv. Arbequina (Figura 1).

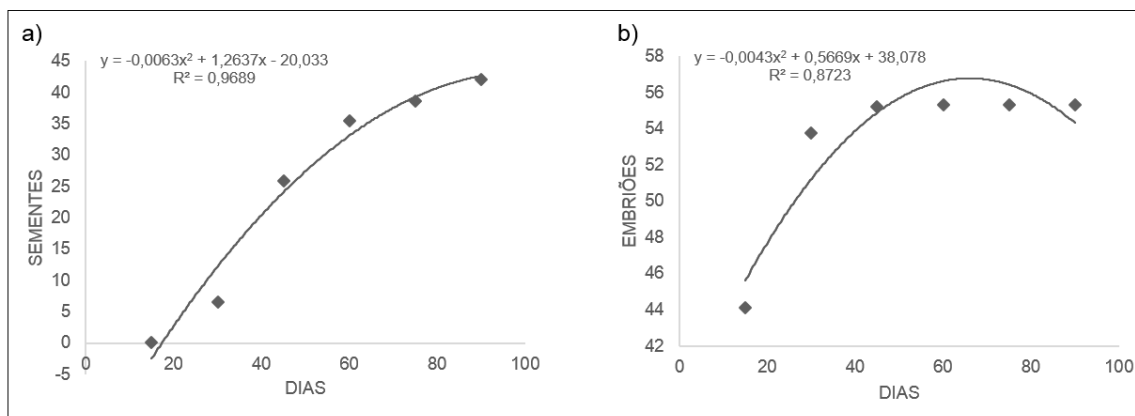


Figura 1: Representação gráfica da germinação de sementes e embriões de oliveiras 'Arbequina' *in vitro* aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a inoculação.

As porcentagens de germinação inferiores em nossos testes podem ter sido devido a contaminação de sementes, chegando a (10%) e embrião (20%) em 'Arbequina'. As medidas de crescimento foram realizadas, e as variáveis número de folhas e diâmetro não diferiram significativamente, apenas para a variável altura houve diferença significativa, sendo as plântulas derivadas de sementes sem endocarpo mais vigorosas (tabela 2). Anatomicamente a capacidade de desenvolvimento de embriões de oliveira para germinar *in vitro* parece estar relacionada com um maior conteúdo metabólico e integridade citoplasmática. A formação de estruturas anatômicas, como tecidos provascular, ápice de brotos e ápice da raiz ocorrem nas datas examinadas e não parecem limitar a capacidade germinativa (LINÑAN et al., 1999). Os embriões apresentaram maior porcentagem de germinação, mas sua taxa de crescimento é mais lenta, devido à falta de reservas de sementes (ACEBEDO et al., 1997). De acordo com Cançado et al. (2013), indicam que os embriões de oliveira não são exigentes quanto à composição do meio de cultura, podendo tanto ser germinados em meio MS básico, como suplementados com água-de-coco. No entanto, na medida que a plântula originada a partir do embrião muda seu metabolismo autotrófico para o metabolismo heterotrófico, mais importante e fundamental se torna o papel do meio de cultura para a manutenção do desenvolvimento. A germinação alta dos embriões da cv. Arbequina pode indicar uma melhor capacidade de adaptação desta cultivar à seca ou condições de estresse hídrico (ACEBEDO et al., 1997).

Tabela 2 - Comprimento da parte aérea, número de folhas e diâmetro de colo de plantas originadas de sementes e embriões de *Olea europaea* L. cv. Arbequina cultivada *in vitro*, aos 115 dias após inoculação.

	nºfolhas	altura (cm)	diâmetro colo (mm)
Embriões	6,71 ±3,54a	2,9 ±1,53a	0,96 ±0,33 ^a
Sementes	7,47 ±3,84a	5,4 ±2,81b	1,15 ±0,29 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem a nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey

Aclimação e fertilização das mudas

Quando comparados os tratamentos nas datas (zero) e (20) dias, não havia diferença significativa entre as variáveis, somente para diâmetro de colo na data (20), mas as diferenças começaram a partir da data (40) dias, quando se avaliou os efeitos dos tratamentos, pois a data (zero) só se caracterizou o material e na data (20) se fez a primeira aplicação, e nas datas (40) e (60) dias que apresentaram as diferenças significativas, com valores muito inferiores, devido a morte de parte das amostras (figura 1). Os tratamentos Testemunha e T₃ apresentaram os melhores valores de crescimento das variáveis, sem diferir estatisticamente, e T₂ e T₄ com valores inferiores, mas também sem diferença significativa entre as variáveis (tabela 3).

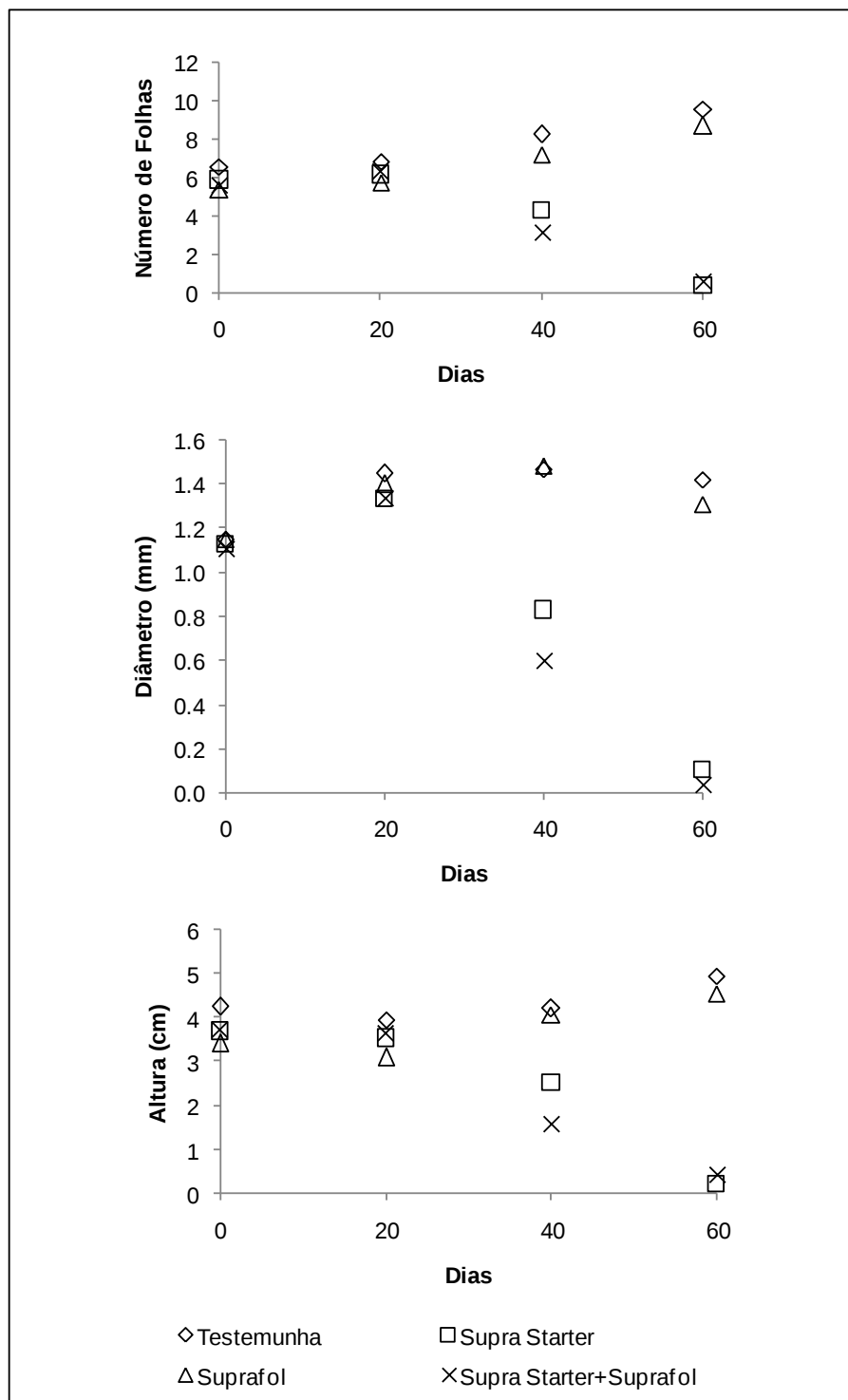


Figura 2. Representação gráfica de número de folhas, diâmetro e altura, submetidas a 4 diferentes tratamentos de fertilização

Tabela 3 - Crescimento de mudas produzidas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação, sob 4 diferentes tratamentos de fertilização* e avaliadas em diferentes dias após o transplantes (DAT)**

Tratamentos	Número de folhas				
	Dias				Média
	0	20	40	60	
T1	6.58	6.86	8.26	9.58	7.82 a
T2	5.90	6.18	4.32	0.42	4.21 b
T3	5.42	5.78	7.24	8.7	6.79 a
T4	5.58	6.36	3.14	0.56	3.91 b
CV	21,90				

Tratamentos	Diâmetro (mm)				
	Dias				Média
	0	20	40	60	
T1	1.15	1.45	1.47	1.42	1.37 a
T2	1.13	1.33	0.83	0.1	0.85 b
T3	1.15	1.4	1.48	1.31	1.34 a
T4	1.1	1.33	0.59	0.03	0.76 b
CV	13,89				

Tratamentos	Altura (cm)				
	Dias				Média
	0	20	40	60	
T1	4.24	3.95	4.2	4.93	4.33 a
T2	3.69	3.53	2.5	0.21	2.48 b
T3	3.41	3.09	4.06	4.53	3.77 a
T4	3.73	3.63	1.56	0.44	2.34 b
CV	31,75				

* Tratamentos: T1_Testemunha ; T2_N:P:K_substrato (fórmula 13-13-21 + 1,8% Boro, dose 2,0 g.muda- em aplicação no substrato, produto comercial Supra Starter,); T3_N:P:K_foliar (formula N:P:K 08-02-03 + 15% Carbono Orgânico Total, dose 1,0 mL para 200mL de água, produto comercial Suprafol); T4_N:P:K_substrato + N:P:K_foliar (tratamentos T2 + T3).

**dia "0": caracterização das plantas e transplante em substrato Plantmax® (29/08/2013); 20 dias após transplante (DAT) (18/09/2013); 40 DAT (08/10/2013) e 60 DAT (28/10/2013).

A variável ramos secundários teve somente uma amostra de planta do T₁ e três plantas do T₃, não sendo possível analisá-la, pois foi uma amostragem não representativa do experimento.

Os resultados do T₂ evidenciaram que, a aplicação de 2 g no substrato parece ter sido prejudicial as mudas, (vasos de 15x10), pois a adubação nitrogenada em excesso pode causar efeitos negativos nas plantas, que podem apresentar maior sensibilidade a geadas, a ataque de pragas e a doenças e desordens fisiológicas que afetam a produção e a qualidade dos frutos, como também causar um acúmulo de NO₃ no perfil do solo o que representa um alto risco de lixiviação, FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al. (2009).

Em relação ao T₃ Produto Suprafol (1,0 mL para 200mL de água) aplicação nas plantas, sua formulação com teores mais baixos de NPK mais a sua composição mineral juntamente com carbono orgânico que é um dos principais componentes da matéria orgânica do solo e seu estoque é influenciado pelo sistema de manejo adotado (STEINER et al., 2011) e sua aplicação via foliar parece ser mais adequado para as mudas, que juntamente com o T₁ Testemunha (água destilada), foram os tratamentos com os resultados mais positivos para as plantas aclimatadas de oliveiras. Em experimentos de Toscano et al. (2002), os dois primeiros anos, as árvores adubadas com pulverizações foliares mostraram um aumento nos parâmetros vegetativos e rendimento. A partir do terceiro ano, as aplicações de apenas fertilizantes foliares deram resultados piores do que a fertilização do solo, o que demonstra a necessidade de aplicação de fertilizantes para raízes. A aplicação foliar de macro-elementos aumentou a produtividade de plantas, tanto quanto uma adição à adubação para o solo e, em menor extensão, como alternativa a ele. Isto sugere que a adubação foliar, pode ser utilizada como uma alternativa barata e viável para a produção de oliveiras. Porém o T₄ que une os tratamentos 2 e 3 Produto Supra Starter (2,0g / muda = embalagem) – aplicação no substrato, e Produto Suprafol (1,0 mL para 200mL de água) aplicação nas plantas, ao que tudo indica foram doses muito elevadas, que resultaram em morte das mudas antes do término do experimento.

Conforme Hagag et al. (2011), parâmetros de crescimento que não foram afetados pelos tratamentos com fertilizantes pode ser atribuídos à baixa demanda nutricional de oliveiras jovens como mencionado por Xiloyannis et al. (2000), que indicou que, a demanda de oliveiras da cultivar Coratina para P e K é mínima durante os primeiros quatro anos após o plantio e pode ser naturalmente fornecida pelo solo. Baixas doses de N devem ser aplicadas através de fertilização localizada durante o ano. A aplicação excessiva de fertilizantes afeta negativamente a qualidade do óleo e da flor (FERNANDEZ-ESCOBAR et al., 2008). O trabalho de Morales-Sillero et al. (2008), a composição de NPK em níveis mais baixos, N:P:K 4-1-3, aplicados via fertirrigação, não houve diferenças significativas entre os tratamentos no comprimento da parte aérea e produtividade. Em Bouhafa et al. (2014), a aplicação de nitrogênio em 'Arbequina' não teve efeito sobre o rendimento de oliva e afetou negativamente o óleo. Sendo muito importante segundo Larcher (2000) os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta estarem disponíveis desde os estágios iniciais de crescimento, a fim de promover o desenvolvimento máximo, evitando assim que ocorram desequilíbrios entre o conteúdo mineral e o incremento de matéria seca. Além da função essencial no crescimento vegetativo da espécie e no desenvolvimento das suas partes reprodutivas, o balanço nutricional favorece a emissão de inflorescências, o desenvolvimento e a qualidade do fruto (CHOULIARAS et al., 2009).

CONCLUSÕES

As sementes íntegras testadas de 'Arbequina' *in vivo* apresentaram baixo potencial germinativo. Já no cultivo *in vitro* das sementes sem endocarpo e dos embriões isolados resultaram uma maior porcentagem de germinação.

A aclimação em casa de vegetação de mudas provenientes de sementes sem endocarpo cultivadas *in vitro* não requer nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio).

CAPÍTULO 2

Caracterização molecular por marcadores microssatélites da coleção de acessos de oliveiras (*Olea europaea* L.) da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS)

INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é a mais antiga cultura frutífera do Mediterrâneo, (BELAJ et al., 2001). A consideração atual de azeite como fonte saudável de gorduras levou à sua incorporação na dieta em muitos países fora da região do Mediterrâneo (HERNÁNDEZ et al., 2001). Na atualidade, é cultivada no mundo inteiro, Argentina, Peru, Uruguai, Chile, Marrocos, África do Sul, China, Índia, Nova Zelândia, Austrália, etc (ALBA et al., 2013).

A capacidade de realizar polinização cruzada e sua história secular contribuem para a determinação de ampla variabilidade genética da espécie com um grande número de cultivares, presentes, principalmente, nos países produtores de azeite. Esta grande biodiversidade, muitas vezes, determinou

alguns inconvenientes na gestão e identificação do material vegetal, a distinção entre cultivares se torna imprópria, principalmente pela frequência de homônimos e sinônimos (DE LA ROSA et al., 2002; ALBA et al., 2009b). Esta grande variabilidade genética é o resultado de uma seleção empírica e coleta de espécimes de diferentes regiões sem a devida identificação de árvores excepcionais desde quando as oliveiras começaram a ser domesticadas, cerca de 6.000 anos atrás no Oriente Leste (ZOHARY e SPIEGEL-ROY, 1975; TRUJILLO et al., 2014). Além destes fatores, Linos et al. (2014) destacam que a grande diversidade genética das oliveiras também está atrelada a fatores específicos que além de ser uma espécie alógama, algumas cultivares apresentam incompatibilidade reprodutiva, o que pode aumentar a heterozigosidade e polimorfismo do DNA.

Entre os principais atributos genéticos da oliveira incluem o seu genoma pequeno (2,200 Mb), e serem diplóide ($2n = 46$) (BELAJ et al., 2012). O conhecimento da diversidade genética entre oliveiras cultivadas é essencial para o sucesso a longo prazo de programas de melhoramento e maximiza o aproveitamento dos recursos do germoplasma (BELAJ et al., 2002). Tradicionalmente, a variabilidade de *O. europaea* é avaliada por métodos morfológicos (BARRANCO et al. 2000). Para a determinação complementar e refinar a tradicional descrição morfológica de genótipos que apresenta limitações por ser influenciada pelo ambiente, marcadores moleculares têm sido aplicados para a caracterização do germoplasma da oliveira, bem como para a rastreabilidade do azeite de oliva, e análises de paternidade e construção de mapas de ligação (BRACCI et al., 2011).

Os marcadores moleculares foram inicialmente empregados para a identificação de cultivares e estudos de diversidade genética (RALLO et al., 2005), utilizando as técnicas de isoenzimas (LOUKAS e KRIMBAS, 1983; QUAZZANI et al., 1993; TRUJILLO et al., 1995), marcadores RAPD (FABBRI et al., 1995; MEKURIA et al., 1999; BESNARD e BERVILLE, 2000; BELAJ et al., 2001; BESNARD et al., 2001; SANZ-CORTÉS et al., 2001), AFLP (ANGIOLILLO et al., 1999) e marcadores de DNA de cloroplasto (AMANE et al., 1999, 2000; LUMARET et al., 2000). Recentemente SSRs estão se tornando os marcadores de escolha para estudos de variabilidade em

oliveiras (RALLO et al., 2000; CIPRIANI et al., 2002; BELAJ et al., 2002), e estudos de identificação varietal, pois esta classe de marcadores é caracterizada como: transferíveis, hipervariáveis, altamente polimórficos, multialélicos, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), codominantes, relativamente simples de interpretar e mostram elevado conteúdo de informação, (GANINO et al., 2006; ALBA et al., 2009b). Os fingerprintings baseados em marcadores microssatélites tornaram-se uma ferramenta popular para a caracterização de cultivares, avaliação de similaridade e análises de paternidade e parentesco em culturas de espécies vegetais (LACAPE et al., 2007; BALDONI et al., 2009).

Desta maneira, a caracterização através de marcadores moleculares dos bancos de germoplasma tem permitido determinar as distâncias genéticas entre os diferentes genótipos e, portanto, inferir as relações genéticas entre os acessos. Além da possibilidade de identificar pontos de máxima variabilidade nas zonas geográficas de onde procede o material analisado (RALLO et al., 2005).

Em geral, a falta de informações sobre recursos genéticos de plantas tem o efeito de restringir o adequado aproveitamento, favorecendo a erosão genética devido à falta de conhecimento do potencial genético agregado em cada acesso. Assim, a caracterização do germoplasma de uma coleção é um pré-requisito primordial para o devido aproveitamento e conhecimento do material vegetal conservado, sendo um dos primeiros passos para a classificação dos acessos mantidos em um banco de germoplasma para garantir a produção sustentável e melhor aproveitamento genético da espécie em estudo em programas de melhoramento (MUZZALUPO et al., 2014).

Como regra, para a cultura de oliveira os esforços têm sido focados na coleção e conservação dos recursos genéticos de oliveira, com o estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ* em todo o mundo (BELAJ et al., 2012; LINOS et al., 2014).

Ao longo das duas últimas décadas, novos conhecimentos sobre a genética de oliveira foram produzidos, com o desenvolvimento de marcadores moleculares nucleares e plastidiais, bem como a construção de mapas de ligação. Estes marcadores serão também utilizados para a seleção assistida

por marcadores (MAS) para a obtenção de genótipos de elite, permitindo a análise de progênes cruzadas em fases anteriores (MULEO et al., 2012). Pois, a nova e moderna indústria do azeite exige cultivares mais competitivas que estejam melhor adaptadas às novas tendências para a cultura de oliveira (LAVEE, 1994; DÍAZ et al., 2007).

Hoje em dia, o cultivo da oliveira está experimentando mudanças do sistema tradicional para a forma de cultivo moderno, sendo selecionado para o plantio apenas algumas cultivares, com atraentes características agronômicas e adaptativas. Além disso, sistemas de super-alta densidade de pomares têm reduzido ainda mais as variedades a serem utilizadas, a uma fração do seu potencial. Assim, em contraste a enorme diversidade, pomares modernos estão limitando o germoplasma disponível por falta de empregabilidade, levando a uma gradual erosão genética (LINOS et al., 2014).

Sendo assim, a identificação correta dos recursos genéticos de oliveiras não é apenas indispensável para a conservação da biodiversidade e da agricultura sustentável, mas também para pesquisas de fins científicos (FENDRI et al., 2014). Dessa forma, com este trabalho objetivou-se: caracterizar, através de análise molecular, os acessos de *O. europaea* do banco ativo de germoplasma de oliveiras da Embrapa Clima Temperado/RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal avaliado no presente estudo foi proveniente da Coleção de Oliveiras (*Olea europaea* L.), conservada no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Clima Temperado/RS, mantida em área experimental (condições de campo) na Sede da Embrapa Clima Temperado.

A coleção é constituída por 72 acessos, sendo 61 introduzidos da Argentina, Espanha, EUA, França, Grécia, Israel, Itália, Líbano, Portugal e 11 do Brasil. A lista dos acessos avaliados neste estudo e a sua origem está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Coleção de Oliveiras (*Olea europaea* L.), conservada no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado/RS, em condições de campo, 72 acessos.

Cultivares	Origem	Referência
Arauco	Argentina	Belaj et al. (2002)
B21	Brasil	Embrapa (2009)
VB2_11	Brasil	Coutinho et al.(2009)
Gordales_09	Brasil	Embrapa (2009)
Frank_09	Brasil	Embrapa (2009)
Gran_Vitale_09	Brasil	Embrapa (2009)
Portuguesa_09	Brasil	Embrapa (2009)
Nelson	Brasil	Embrapa (2009)
Frank	Brasil	Embrapa (2009)
Maria_da_Fé_09	Brasil	Embrapa (2009)
Gran_Vitale_12	Brasil	Coutinho et al.(2009)
Grossissima_12	Brasil	Coutinho et al. (2009)
Zarza	Espanha	Rallo et al. (2005)
Arbequina	Espanha	Rallo et al. (2000)
Arbosana	Espanha	Las Casas et al. (2014)
Picual	Espanha	Trujillo et al. (2014)
Sevillana	Espanha	Gomes et al. (2009)
Manzanilla_CT_10	Espanha	Rallo et al. (2000)
Zarzalena_12	Espanha	Rallo et al. (2005)
Arbequina_MF	Espanha	Rallo et al. (2000)
Hojiblanca_09	Espanha	Trujillo et al. (2014)
Cornicabra_09	Espanha	Rallo et al. (2000)
Sevillana_09	Espanha	Baldoni et al.(2009)
Manzanilla_ar_09	Espanha	Rallo et al. (2000)
Blanqueta_09	Espanha	Trujillo et al. (2014)
Arbequina_2001_12	Espanha	Rallo et al. (2000)
Alfafara_09	Espanha	Trujillo et al. (2014)
Manzanilla_UY_09	Espanha	Rallo et al. (2000)
Carrasquena_09	Espanha	Belaj et al.(2011)
Arbequina_09	Espanha	Rallo et al. (2000)
Mission_09	EUA	Naveiro et al. (2000)
Tanche_09	França	Belaj et al. (2011)
Picholine_09	França	Trujillo et al. (2014)
Koroneiki	Grécia	Rallo et al. (2000)

Barnea_09	Israel	Belaj et al. (2002)
Itrana	Itália	Belaj et al. (2003)
Grigman	Itália	Navelo et al. (2000)
Coratina	Itália	Carriero et al. (2002)
Carboncella	Itália	Rotondi et al. (2003)
Carolea	Itália	Trujillo et al. (2014)
Grapollo	Itália	Trujillo et al. (2014)
Ascolana_09	Itália	Gomes et al. (2009)
Moraiolo_09	Itália	Trujillo et al. (2014)
Maurino	Itália	Ganino et al.(2007)
Rociola_2	Itália	Coutinho et al.(2009)
Pendolino	Itália	Belaj et al. (2011)
Frantoio	Itália	Trujillo et al. (2014)
Coratina_09	Itália	Carriero et al. (2002)
Ascolana_MF	Itália	Rallo et al. (2000)
Leccio	Itália	Belaj et al. (2003)
Dritta_11	Itália	Muzzalupo et al. (2008)
Grapollo_1_11	Itália	Trujillo et al. (2014)
Grapollo_541_11	Itália	Trujillo et al. (2014)
Grapollo_575_09	Itália	Trujillo et al. (2014)
Sta_Catarine_09	Itália	Belaj et al. (2002)
Taggiasca_09	Itália	Bracci et al. (2009)
Favarol	Itália	Muzzalupo (2012)
Seggianese	Itália	Cantini et al. (2008)
Rociola	Itália	Coutinho et al.(2009)
Razzo	Itália	Muzzalupo et al.(2009)
Cipressino	Itália	Bracci et al. (2009)
Seggianese_09	Itália	Cantini et al. (2008)
Canino_09	Itália	Baldoni et al.(2009)
Bosana_11	Itália	Baldoni et al.(2009)
Soury_10	Libano	Navelo et al. (2000)
Penafiel_08	Portugal	Coutinho et al.(2009)
Galega_12	Portugal	Rallo et al. (2000)
Penafiel	Portugal	Coutinho et al.(2009)
Cobrançosa	Portugal	Rallo et al. (2000)
Negroa_11	Portugal	Navelo et al. (2000)
Penafiel_12	Portugal	Coutinho et al.(2009)
Alto_D_Ouro	Portugal	Coutinho et al.(2009)

Extração de DNA

Para a extração de DNA foram coletadas folhas jovens de plantas do BAG, identificadas e armazenadas a -80 °C. O DNA genômico foi isolado de acordo com protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996), sendo

utilizadas entre 0,15 e 0,20g de tecido vegetal. A qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a sua concentração foi determinada em espectrofotômetro (Stramedical® digital). Posteriormente as concentrações das amostras de DNA foram ajustadas para 30 ng/μL para as reações de amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Os 72 genótipos de oliveiras foram analisados com 20 *loci* SSR (Tabela 2), previamente desenvolvidos para *Olea europaea* L. por diferentes grupos de pesquisa: Cipriani et al. (2002); Sabino Gil et al. (2006); Rallo et al. (2000) e Sefc et al. (2000). A reação de PCR foi realizada com o volume final de 15 μL, contendo 1,5 μL de tampão 10X; 2,5 mM de MgCl₂; 0,25mM de cada dNTP; 0,2 μM de cada primer; 30 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen®) e água milli-Q autoclavada.

O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*®) conforme segue: 1 ciclo de 94°C por 11 min.; 35 ciclos de 96°C por 30 s., temperatura de anelamento entre 50 a 64°C por 1 min. dependendo da característica de cada par de *primer* (Tabela 2), e extensão a 72°C por 1 min, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3%, por 3h a 80 volts, em tampão TBE 1x (89 mM de Tris; 0,89 M de ácido bórico e 8 mM de EDTA com pH 8,0). As bandas foram visualizadas sob luz UV, fotografadas com câmera digital e analisadas. O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). As amplificações foram realizadas pelo menos duas vezes, e apenas os produtos reproduzíveis foram levados em consideração para serem analisadas estatisticamente. A presença e a ausência de alelos para cada *locus* e acesso foram registradas em uma matriz de frequência de dados. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se diferentes matrizes. Algumas matrizes foram construídas de forma manual e outras foram transformadas com o auxílio do software CONVERT Ver. 1.31 (GLAUBITZ, 2004), o qual converte uma matriz padrão para diferentes formatos de arquivos, para análises posteriores.

As análises estatísticas foram conduzidas de forma conjunta e separadas na forma de grupos, de acordo com a classificação por origem dos acessos da Embrapa Clima Temperado (Tabela 1).

Tabela 2 - Características dos 20 pares de oligonucleotídeos (*primers*) alvos de loci SSR empregados para avaliação da coleção de *Olea europaea* L. do Centro Nacional de Pesquisa de Clima Temperado da EMBRAPA/RS.

<i>Loco</i> SSR	Referên Cia	Sequência do <i>primer</i>	Motivo SSR	Tamanho esperado de amplicon (bp)	Tamanho observado de amplicon (bp)
ssrOeUA-DCA3 AJ279854	Sefc et al., 2000	F:CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R:TGCTTTTGTCTGTGTTTGAGATGTTG	(GA) ₁₉	250	310
ssrOeUA-DCA8 AJ279858	Sefc et al., 2000	F: ACAATTCAACCTCACCCCATACCC R:TCACGTCAACTGTGCCACTGAACTG	(GA) ₁₈	140	180
ssrOeUA-DCA10 AJ279860	Sefc et al., 2000	F: CGTGACCACCTAAATCCGCCCC R: CTGTCCAGAGCTAAAGGTTTCG	(TA) ₁₄ (GA) ₁₇	218	220
ssrOeUA-DCA16 AJ279865	Sefc et al., 2000	F:TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R:TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	180	220
ssrOeUA-DCA18 AJ279867	Sefc et al., 2000	F:AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	(CA) ₁₄ CT (CA) ₃ (GA) ₁₉	180	220
ssrOeIGP3 DQ386900	Sabino et al., 2006	F: CTATTCACCTTGCCCAACTTG R: TCAATGTAATGAGCCGTAGC	(GT) ₂₂ (AT) ₆ ...(AT) ₆	220	240
ssrOeIGP4 DQ386901	Sabino et al., 2006	F: CTTTATCCAATGCTTGACTAG R: TGATTGATTGAGTTCTAGTATG	(TTAG) ₂ (TG) ₂₅	150	180
ssrOeIGP9 DQ386906	Sabino et al., 2006	F: AATATTCGGTGGCATGTGGC R: GATGACGGACCAACTAACA	(TTC) ₂ TAC (TTC) ₂ (TGT) ₂ (TTC) ₂	152	250
ssrOeIGP16 DQ386913	Sabino et al., 2006	F: CTGAGCTTGATACAGTGG R: TCTGGCATAATCTTGAATG	(TG) ₂₂	141	300
ssrOeIGP18 DQ418773	Sabino et al., 2006	F: CCCCTTCTTTTCTTTCTTTTG R: CACCCACAAAATCCAAACCC	(TCC) ₂ TT (TC) ₂ TT (TC) T (TC) ₇	161	150

<i>UDO99-004</i>	Cipriani et al., 2002	F: TTTGCCCTGGATTGGTACA R: AGCTTGAGCATCATCTGTGAG	(AC) ₁₀	150	180
<i>UDO99-011</i>	Cipriani et al., 2002	F: TGACTCCCTTTAACTCATCAGG R: TGCGCATGTAGATGTGAATATG	(CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂	132	150
<i>UDO99-019</i>	Cipriani et al., 2002	F: TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG R: GGCCTGATCATCGATACCTC	(GT) ₂₀ (AT) ₅	170	200
<i>UDO99-031</i>	Cipriani et al., 2002	F: TATCCTCTATGTGGCGATG R: TTGGTTAAAAGGATTGATACA	(TG) ₂₁ (TATG) ₆	155	180
<i>UDO99-039</i>	Cipriani et al., 2002	F: AATTACCATGGGCAGAGGAG R: CCCCAAAGCTCCATTATTGT	(AT) ₅ (GT) ₁₁	180	200
IAS-oli06	Rallo et al., 2000	F: GAG CCC AAC CCT TAA CCA ACT TCA GCA AC R: GCC TTC ACA TCG CCT TCC TAA ATG CAT C	(GA) ₁₇	230	230
IAS-oli11	Rallo et al., 2000	F: TGC ACG TGT CCA AAA TCT TTT CAA GGC R: TCC ATA TTT CTC CAC ACC AAA AGT TAT GCG	(GA) ₁₈	160	200
IAS-oli12	Rallo et al., 2000	F: TAG CTA CAA GCA ATG ACG CTT R: TTT GTA ATC CCT CTC CCT CAT	(GA) ₁₇	150	180
IAS-oli17	Rallo et al., 2000	F: TTA GAT AAA AAG GGA GCA TGG CTG A R: CAA ATA TAT GAG AAA ACA GTA CAC AGG AAC	AGGAG (AGAGGG) ₇ AGGGAG	190	240
IAS-oli22	Rallo et al., 2000	F: CAA GAA GAG AGA GAA AAT GAG AGC CCC CAT R: TCC GAC TTA TGA GCT GTT TTT TCT TTG GAA	(GA) ₆ (GT) ₅ GACCT (GA) ₅	134	200

Análise de Dados

Variabilidade Genética

Para avaliar as informações obtidas com os 20 *loci* SSR estudados e estimar a diversidade genética geral, as seguintes medidas foram calculadas: número de alelos observados por *locus* (N_a), número efetivo de alelos por *locus* (N_e) ($N_e = 1 / \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência alélica na população *ith* para cada *locus*), heterozigosidade observada (H_o) (H_o = número de acessos heterozigotos / número total de acessos), heterozigosidade esperada (H_e) ($H_e = 1 - \sum p_i^2$), índice de fixação de *Wright* ou coeficiente de endogamia ($F = 1 - H_o/H_e$) (WRIGHT, 1978) e o índice de informação de *Shannon* (LEWONTIN, 1972). Estes parâmetros foram calculados utilizando o *software* POPGENE Ver. 1.32 (YEH et al., 1997). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980), indicativo da habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente, foi estimado para cada *locus* com o *software* Powermarker Ver. 3.25 (LIU & MUSE, 2005). O *software* IDENTITY Ver. 1.0 (WAGNER & SEFC, 1999) foi empregado neste estudo para determinar a probabilidade de alelos nulos ($r = [H_e - H_o] / [1 + H_e]$) e a probabilidade de identidade [$P_i = 1 - \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$]. Para a probabilidade de identidade assume-se que dois acessos tenham a probabilidade de ser aleatoriamente idênticos baseado na observação da frequência alélica e na escolha de *locus* ao acaso (PAETKAU et al., 1995).

Para cada *locus* microsatélite os *amplicons* foram pontuados como um (1) para alelo homozigoto, 0.5 para cada fragmento quando alelo heterozigoto e zero (0) para alelo ausente, sendo posteriormente convertidos em uma matriz de dados a partir da qual foi estimada a similaridade genética entre os genótipos usando o índice de Dice. Com base na matriz de similaridade genética foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância da média UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). O ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética com o teste de Mantel (MANTEL, 1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento. As análises descritas

acima foram conduzidas com o *software* NTSYS-PC Ver. 2.1 (ROHLF, 2000). A análise de *bootstrap* foi conduzida utilizando 500 réplicas no *software* WINBOOT Ver. 1.0 (YAP & NELSON, 1996) para avaliar a robustez do dendograma.

Com o auxílio do programa NTSYS-PC foi também realizada a análise de coordenadas principais, com base na mesma matriz de similaridade genética utilizada na construção do dendograma, visando identificar a formação de (sub)grupos por uma abordagem não hierárquica. A representação gráfica também foi realizada no *software* NTSYS-PC Ver. 2.1.

Estrutura de População

A estrutura genética foi determinada por meio de análise Bayesiana utilizando o *software* STRUCTURE versão 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000). Os agrupamentos foram detectados com o emprego de um modelo de combinação, que utiliza a correlação das frequências alélicas entre os agrupamentos (K), e com o modelo de ancestralidade Admixture Model. A partir deste modelo foram computadas 10 réplicas para valores de K de 1 a 10, analisados por um período de aquecimento de 20^4 seguido de 20^5 interações. O número correto de agrupamentos (K) foi identificado com o auxílio do *software on line* STRUCTURE HARVESTER Ver. 0.6.92 (EARL & VON HOLDT, 2012), o qual emprega o método estatístico de ΔK descrito por Evanno et al. (2005), com os valores de K de 1 a 10. As réplicas das análises de agrupamento dos valores de K selecionados foram posteriormente sumarizadas pelo *software* CLUMPP Ver. 1.1.2 (JAKOBSSON & ROSENBERG, 2007) com o algoritmo *Greedy* e *Large K Greedy*, utilizando 10^4 repetições em combinações aleatórias, objetivando identificar os valores comuns e combinar os resultados de agrupamentos das dez réplicas. Os resultados das combinações juntamente com os valores comuns de agrupamentos foram representados de forma gráfica através do *software* DISTRUCT Ver. 1.1 (ROSENBERG, 2004).

Distribuição da variabilidade genética

A análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) foi estimada com 1000 réplicas de permutações com base nos grupos de origem da tabela 1 sob o *software* ARLEQUIN Ver. 3.1 (EXCOFFIER, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 20 *loci* SSR utilizados neste estudo foram polimórficos, sob diferentes taxas, com perfis genéticos únicos para os acessos avaliados, os quais possibilitaram identificar molecularmente a coleção. O total de 64 alelos foram identificados nos 72 genótipos analisados, variando de dois a quatro alelos, com média de 3,2 alelos identificados por *locus*, indicando a taxa média de diversidade genética existente dentro da coleção de oliveiras. Essa taxa média de diversidade pode ser considerada boa, pois diversos autores (LOPES et al., 2004; LA MANTIA et al., 2005; SEFC et al., 2000) afirmam que os SSR aplicados para oliveiras e, em geral, para a maioria das espécies de polinização cruzada que são propagadas clonalmente, parecem serem caracterizados por níveis médios de heterozigosidade, (ALBA et al., 2009b). Esses níveis médios de diversidade e variabilidade genética da coleção de oliveiras proporcionam possibilidades de desenvolvimento de novas variedades com características de interesses agronômicos. Os valores das médias observadas por diversos autores variam bastante ao analisarem diferentes acessos de *Olea europaea*, 3 alelos por locus (CIPRIANI et al., 2002) e (MARRAZZO et al., 2000), 5,2 (RALLO et al., 2000), 5,7 (CARRIERO et al., 2002) e (CANTINI et al., 2008), 5,8 (LINOS et al., 2014), 6,4 (DE LA ROSA., 2002) e (ALBA et al., 2009b), 6,75 (SABINO GIL et al., 2006), 6,9 (BEGHÈ et al., 2015), 7,1 (LA MANTIA et al., 2006), 7,6 (MUZZALUPO et al., 2014), 8,26 (SEFC et al., 2000), 8,75 (FENDRI et al., 2014), 8,8 (ALBA et al., 2009a), 9,3 (LAS CASAS et al., 2014), 14,12 (TRUJILLO et al., 2013).

Essa variação pode ser devido a diversidade de genótipos, ao conjunto de microssatélites usados por cada grupo de pesquisa, com maior nível de polimorfismo, devido as diferentes metodologias aplicadas para o dimensionamento do alelo, erros de genotipagem, ocorrência de variação intra-cultivar (BALDONI et al., 2009). No presente estudo, o número de alelos efetivos apresentou média de 2,09 e total de 41,82 (65,34%). O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,36 (IAS_oli22) a 1,20 (IAS_oli17), com média de 0,84. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre -0,02 (SsrOeUA_279865 DCA16) a 0,32 (SsrOeUA_279854 DCA3), com a média de 0,16 alelos nulos por *locus*. Os resultados dos parâmetros de diversidade genética avaliados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de variabilidade genética calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira (*Olea europaea* L.). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

Locus	Ng	Na	Ne	I	R	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	71	3	2,21	0,88	0,32	0,55	0,06	0,90	0,45	0,30
SsrOeUA_279858	71	2	1,68	0,59	0,05	0,40	0,34	0,16	0,32	0,44
SsrOeUA_279860	71	3	2,78	1,06	0,05	0,64	0,56	0,12	0,57	0,20
SsrOeUA_279865	71	2	1,75	0,62	-0,02	0,43	0,45	-0,05	0,34	0,42
SsrOeUA_279867	72	3	2,61	1,03	0,27	0,62	0,18	0,71	0,55	0,22
SsrOeIGP3_386900	72	2	1,89	0,67	-0,10	0,47	0,63	-0,32	0,36	0,39
SsrOeIGP4_386901	71	4	2,57	1,10	0,19	0,61	0,31	0,49	0,55	0,21
SsrOeIGP9_386906	72	4	1,82	0,89	0,31	0,45	0,00	1,00	0,42	0,33
SsrOeIGP16_386913	72	4	1,27	0,46	0,11	0,22	0,08	0,61	0,21	0,63
SsrOeIGP18_418773	71	3	2,40	0,95	0,18	0,58	0,30	0,49	0,49	0,26
UDO99_004	72	3	1,54	0,65	0,24	0,35	0,03	0,92	0,32	0,45
UDO99_011	72	3	2,12	0,86	0,17	0,53	0,26	0,50	0,44	0,31
UDO99_019	72	4	1,82	0,84	0,11	0,45	0,29	0,35	0,41	0,34
UDO99_031	71	3	2,13	0,91	0,16	0,53	0,28	0,47	0,47	0,28
UDO99_039	71	4	2,71	1,17	0,27	0,63	0,20	0,69	0,58	0,18
IAS_oli06	71	4	2,30	0,96	0,31	0,57	0,08	0,85	0,48	0,28
IAS_oli11	71	3	1,76	0,70	0,28	0,43	0,03	0,93	0,36	0,39
IAS_oli12	71	3	2,23	0,87	0,11	0,55	0,38	0,31	0,45	0,30
IAS_oli17	71	4	3,02	1,20	0,05	0,67	0,59	0,12	0,61	0,17
IAS_oli22	71	3	1,22	0,36	0,15	0,18	0,00	1,00	0,17	0,68
Media	71,5	3,2	2,09	0,84	0,16	0,49	0,25	0,51	0,43	
Total	72	64	41,82							$1,02_e^{-010}$

Ng - número de genótipos, Na - número de alelos observados, Ne - alelos efetivos, I - índice de Shannon, r - probabilidade de alelos nulos, He - heterozigosidade esperada, Ho - heterozigosidade observada, F - índice de fixação, PIC - conteúdo de informação polimórfica e PI - probabilidade de identidade.

No presente trabalho a heterozigosidade esperada (He) apresentou média de 0,49, variando de 0,18 (IAS_oli22) a 0,67 (IAS_oli17), enquanto no trabalho desenvolvido por Cantini et al. (2008), também com oliveiras He foi de 0,52. No trabalho desenvolvido por Alba et al. (2009), a média da heterozigosidade esperada foi de 0,66 e de acordo com Diaz et al. (2006), com o conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos em oliveiras e utilizados em seu trabalho, parecem caracterizados por níveis médios de heterozigosidade, isto é, não superior a 0,66. Em todos os *loci* avaliados a heterozigosidade observada (Ho) apresentou valores inferiores aos da heterozigosidade esperada, com valores variando de 0 (SsrOeIGP9_386906, IAS_oli22) a 0,63 (SsrOeIGP3_386900), sendo este último, o único em que a Ho foi maior que a He. Valores de Ho superiores ao He foi relatado em estudos por Diaz et al. (2006) com oliveiras, utilizando outros marcadores SSR, entretanto, conforme relatado no presente estudo, os baixos valores de

heterozigosidade indicam redução do nível de variação genética, o que é provocado, possivelmente, devido à endogamia (ANDERSON, 2010).

O parâmetro de índice de fixação de Wright, o qual mensura a deficiência ou excesso de heterozigosidade, apresentou-se na maioria dos loci avaliados com valores positivos, e média de 0,51 por *locus*, indicando certo grau de deficiência de heterozigosidade. O máximo valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC) detectado foi de 0,61 (IAS_oli17), o mínimo de 0,17 (IAS_oli22) e média de 0,43. A máxima probabilidade de identidade (PI) (0,68) foi identificada para o *locus* que apresentou o menor número de alelos efetivos (IAS_oli22), e o melhor valor (0,17) para o *locus* ((IAS_oli17) que apresentou o maior valor de alelos efetivos (3,02 alelos). A probabilidade de identidade total dos *loci* avaliados foi de $1,02 \times 10^{-10}$.

A explicação para a aparente diferença entre os resultados de acordo com Trujillo et al. (1990), pode ser a possibilidade de melhoramento local, seleção, e propagação clonal de mudas obtidas para o germoplasma, transportadas de país para país (Fabbri et al., 1995). Resultados encontrados em nosso trabalho que coincidiram com a literatura, segundo Sabino Gil et al. (2006), o marcador SsrOeIGP3_386900 obteve H_o de 0,625 e neste estudo foi de 0,63, o SsrOeIGP4_386901 a H_o foi de 0,37 e neste de 0,31. O SsrOeIGP9_386906 obteve o valor H_e de 0,41 e nesta pesquisa foi de 0,45. Conforme Sefc et al. (2000) e Muzzalupo et al. (2014), este SsrOeUA_279867 obteve os mesmos valores para H_e de 0,68 e neste de 0,62. Como Cantini et al. (2008), o UDO99_019 a H_e de 0,428 e neste de 0,45. Em Rallo et al. (2000), os marcadores IAS_oli17 e IAS_oli22 apresentaram o mesmo número de alelos identificado por *locus*, de 4 e 3 alelos, respectivamente.

Já, no trabalho desenvolvido por Erre et al. (2010), o marcador UDO99_019, apresentou valores de N_e 1,69, H_e 0,414, H_o 0,385, PIC 0,451 e PI 0,405 muito semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde obtivemos: N_e de 1,82, H_e de 0,45, H_o de 0,414, PIC de 0,41 e PI de 0,34. Enquanto que no trabalho desenvolvido por Marrazzo et al. (2000), este mesmo marcador apresentou-se em conformidade com o número de alelos observados (N_a), com 4 alelos.

Após a análise conjunta dos parâmetros de diversidade genética, os 72 acessos foram divididos em cinco grupos, visando fazer inferências sobre a variabilidade genética dentro de cada grupo e qual a contribuição para a diversidade genética total da coleção de oliveiras.

Variabilidade genética em grupos

O primeiro grupo é representado por 11 acessos de oliveiras introduzidos no Brasil (Tabela 1), o qual objetiva-se realizar avaliações diretas sob o seu potencial de uso nas condições brasileiras. Dos 20 *loci*, 17 foram polimórficos, que permitiram distinguir todos os acessos. O total de alelos identificados foi de 50 alelos, com média de 2,5 alelos por *locus*, variando de um (SsrOeIGP16_386913, IAS_oli11 e IAS_oli22) a quatro (UDO99_019, UDO99_039 e IAS_oli17). Os *loci* SsrOeIGP16_386913, IAS_oli11 e IAS_oli22, foram os três menos informativos para os seguintes parâmetros: número de alelos efetivos (1), índice de informação de Shannon, heterozigosidade esperada, observada e conteúdo de informação polimórfica, todos com valor de zero (0), quando comparados aos outros *loci* avaliados. O número de alelos efetivos apresentou seu melhor valor de 2,81 alelos (IAS_oli17), com média de 1,88 e total de 37,54 alelos efetivos neste grupo.

Com relação ao índice de informação de Shannon, os resultados variaram desde zero observado nos loci SsrOeIGP16_386913, IAS_oli11 e IAS_oli22 a 1,16 observado no IAS_oli17. O índice de fixação de Wright apresentou valores variando de -0,69 (SsrOeIGP3_386900) a 1 (SsrOeIGP9_386906, UDO99_004 e IAS_oli06), com média de 0,37. O valor máximo observado de índice de fixação de Wright observado nos *loci* 1 (SsrOeIGP9_386906, UDO99_004 e IAS_oli06), indica uma deficiência em heterozigosidade. A probabilidade de alelos nulos variou de -0,23 (SsrOeIGP3_386900) a 0,34 (SsrOeIGP9_386906) apresentando média de 0,12.

O valor médio da heterozigosidade esperada foi de 0,41, enquanto que a média da heterozigosidade observada foi de 0,24, com variação desde zero (SsrOeIGP9_386906, SsrOeIGP16_386913, UDO99_004, IAS_oli06,

IAS_oli11 e IAS_oli22) a 0,82 (SsrOeIGP3_386900). Os *loci* IAS_oli17 e UDO99_039 apresentaram os melhores valores para os parâmetros de conteúdo de informação polimórfica (0,58 e 0,57, respectivamente) e probabilidade de identidade (0,19), respectivamente, sendo que a probabilidade de identidade total foi de $6,20 \times 10^{-9}$.

O segundo grupo de acessos de oliveiras da coleção é constituído por 18 acessos originários da Espanha. Verificou-se maior variabilidade de polimorfismo nos *loci* SSR estudados. Foram detectados no total 60 alelos, com valores variando de 2 (SsrOeUA_279858, SsrOeUA_279865 e SsrOeIGP3_386900) a 4 (SsrOeIGP4_386901, UDO99_039 e IAS_oli17), com média de 3 alelos por *locus*. A média de alelos efetivos detectada foi de 2,10, com mínimo de 1,18 (SsrOeIGP16_386913) e máximo de 2,91 (SsrOeUA_279867), total de 41,95 alelos efetivos neste grupo. O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,34 (SsrOeIGP16_386913) a 1,14 (SsrOeIGP4_386901 IAS_oli17), com média de 0,83. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre -0,08 (SsrOeUA_279865) a 0,35 (SsrOeUA_279854), e média de 0,16 alelos nulos por *locus*.

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,49, enquanto que a heterozigosidade observada com média de 0,25. O parâmetro de índice de fixação de Wright apresentou valores variando entre -0,08 (SsrOeUA_279865) indicando alto coeficiente de endogamia, próximo a panmixia (0), a 1,0 (SsrOeUA_279854, SsrOeUA_279865, UDO99_004 e SsrOeIGP9_386906) indicando alta taxa de deficiência de heterozigosidade, e média de 0,51.

O conteúdo de informação polimórfica dos *loci* apresentaram máximo de 0,57 (SsrOeUA_279860, SsrOeIGP4_386901 e IAS_oli17), mínimo de 0,15 (SsrOeIGP16_386913) e média de 0,43. A máxima probabilidade de identidade (0,72) foi identificada para o *locus* SsrOeIGP16_386913, e a mínima de 0,19 para SsrOeUA_279867, e o total de $1,17 \times 10^{-10}$.

Os maiores valores detectados no *locus* SsrOeUA_279867 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,66), relacionado juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,19).

O terceiro grupo de acessos de oliveiras da coleção é constituído pelo maior número de acessos, 29 originários da Itália. Verificou-se uma variabilidade semelhante ao grupo da Espanha, nas taxas de polimorfismo nos *loci* SSR estudados. Foram detectados 60 alelos, com valores variando de 2 (SsrOeUA_279858, SsrOeUA_279865, SsrOeIGP3_386900, IAS_oli11, IAS_oli12, IAS_oli22) a 4 (SsrOeIGP4_386901, SsrOeIGP9_386906, UDO99_019, UDO99_039, IAS_oli06, IAS_oli17), com média de 3 alelos por *locus*. A média de alelos efetivos detectada foi de 2,02, com mínimo de 1,15 (IAS_oli22) e máximo de 2,81 (SsrOeUA_279860), total de 40,41 alelos efetivos neste grupo.. O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,25 (IAS_oli22) a 1,10 (IAS_oli17), com média de 0,79. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre -0,10 (SsrOeUA_279865) a 0,32 (IAS_oli11), e média de 0,15 alelos nulos por *locus*.

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,48, enquanto que a heterozigosidade observada obteve média de 0,25. O parâmetro de índice de fixação de Wright apresentou valores variando entre -0,35 (SsrOeUA_279865) indicando alto coeficiente de endogamia, próximo a panmixia (0), a 1,0 (SsrOeIGP9_386906, IAS_oli11e IAS_oli22) indicando alta taxa de deficiência de heterozigosidade, e média de 0,49.

O conteúdo de informação polimórfica dos *loci* apresentaram máximo de 0,57 (SsrOeUA_279860 e IAS_oli17), mínimo de 0,12 (IAS_oli22) e média de 0,41. A máxima probabilidade de identidade (0,77) foi identificada para o *locus* IAS_oli22, e a mínima de 0,20 para SsrOeUA_279860, IAS_oli17 e o total de $3,36_e^{-10}$.

Os maiores valores detectados no *locus* SsrOeUA_279860 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,64), relacionado juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,20).

O quarto grupo são apenas sete acessos de oliveiras oriundas de Portugal. Verificou-se variabilidade semelhante ao grupo dos acessos do Brasil, foram detectados 50 alelos ao total, com valores variando de 1 (IAS_oli22) a 4 (SsrOeIGP16_386913, UDO99_039 e IAS_oli17), com média de 2,5 alelos por *locus*. A média de alelos efetivos detectada foi de 1,98 com o mínimo de 1 (IAS_oli22) e máximo de 3,27 (UDO99_039 e IAS_oli17), total

de 39,67 alelos efetivos neste grupo. O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de zero (IAS_oli22) a 1,28 (UDO99_039 e IAS_oli17), com média de 0,73. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre -0,03 (SsrOeUA_279860 e UDO99_019) a 0,33 (SsrOeUA_279860, SsrOeIGP18_418773 e IAS_oli11), e média de 0,14 alelos nulos por *locus*.

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,46, enquanto que a heterozigosidade observada com média de 0,24. O parâmetro de índice de fixação de Wright apresentou valores variando entre -0,17 (UDO99_019) indicando alto coeficiente de endogamia, próximo a panmixia (0), a 1,0 (SsrOeUA_279865, UDO99_004, SsrOeIGP9_386906, SsrOeIGP18_418773 e IAS_oli11) indicando alta taxa de deficiência de heterozigosidade, e média de 0,45.

O conteúdo de informação polimórfica dos *loci* apresentaram máximo de 0,64 (UDO99_039 e IAS_oli17), mínimo de zero (IAS_oli22) e média de 0,38. A máxima probabilidade de identidade (1) foi identificada para o *locus*, IAS_oli22 e a mínima de 0,15 para UDO99_039 e IAS_oli17, e o total foi de $1,07_e^{-9}$.

Os maiores valores detectados nos *loci* UDO99_039 e IAS_oli17 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,69), relacionado juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,15)

O quinto grupo, constituído por sete acessos oriundos de diversos países, o número total de alelos detectados foi de 51, (Tabela 1), e os *loci* apresentaram mínimo de 1 (SsrOeIGP16_386913), com média de 2,6 alelos por *locus*. Identificou-se total de 40,43 alelos efetivos. O *loci* SsrOeIGP4_386901 e IAS_oli17, apresentaram os melhores valores para número de alelos observados (4); número de alelos efetivos (3,6 e 3,43); índice de informação de Shannon (1,33 e 1,29); heterozigosidade esperada (0,72 e 0,71); heterozigosidade observada (0,67 e 0,83), sendo a H_o no IAS_oli17 maior que a H_e ; e probabilidade de identidade (0,13 e 0,14). O índice de informação de Shannon apresentou valor médio de 0,74. Ambos os parâmetros de probabilidade de alelos nulos e índice de fixação de alelos de Wright apresentaram seus valores mínimos negativos para o mesmo *locus* (SsrOeIGP3_386900), os quais foram -0,33 e -1,0, respectivamente.

O conteúdo de informação polimórfica apresentou média de 0,39, com índices variando de zero (SsrOeIGP16_386913) a 0,67 (IAS_oli17).

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,46, enquanto a observada foi de 0,29. Os maiores valores detectados nos *loci* SsrOeIGP4_386901 e IAS_oli17 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,72 e 0,71) e índice de informação de Shannon (1,33 e 1,29), juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,13 e 0,14), estão relacionados com o maior número de alelos observados nesses *loci* (4)

A representação da relação genética entre os acessos de oliveiras está demonstrada na forma de um dendrograma (Figura 1), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de similaridade genética com base no coeficiente de Dice, baseada no polimorfismo de 20 *loci*. O teste de Mantel foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento representados em dendrograma, o que resultou no valor de 0,59 indicando um coeficiente de similaridade com uma moderada correlação. A partir da análise de agrupamento UPGMA foi possível constatar a mescla da diversidade genética existente dentro da coleção, com a similaridade variando desde 0,51 a 0,99, com variação de até 0,48 entre os acessos. Segundo Baldoni et al. (2009), em seu estudo com oliveiras, também foi verificado uma baixa diferenciação genética entre as áreas de cultivo, em particular para as variedades do oriente Mediterrâneo.

Vários estudos têm argumentado que os padrões filogeográficos em olivas são indescritíveis (BESNARD et al., 2002; LUMARET e OUZZANI 2001; LUMARET et al., 2004). Além disso, a propagação ocorre principalmente pela forma vegetativa, por meio de corte e enxertia favorecendo uma intensa troca de material vegetal e, por conseguinte, a mistura de genótipos de diferentes origens e os seus múltiplos, além de difusões multidirecionais. Sabe-se que houve, por muito tempo, a troca de materiais de oliveira, entre diferentes países que impossibilitam a rastreabilidade de sua origem, porém, a diferenciação desses materiais ocorre, mesmo que tenham sido propagados vegetativamente devido a mutações que podem ter ocorrido de forma natural ou mesmo induzidas

devido as condições de manejo agrícola aos quais as culturas foram submetidas, as quais produzem variantes clonais (BELAJ et al., 2004b; GEMAS et al., 2004).

A abordagem Bayesiana foi empregada com todo o conjunto de *loci* para a identificação de *pools* alélicos. O teste do K verdadeiro baseado na estatística de delta (Δ) K descrita por Evanno et al. (2005) foi aplicado com a finalidade de identificar o melhor valor de K de estruturação da população em estudo, e sua relação com os grupos de origem que compõem a coleção. A abordagem estatística de identificação do melhor valor de K revelou o valor de K_2 , K_3 e K_7 como sendo os melhores valores de agrupamentos (Figura 1)

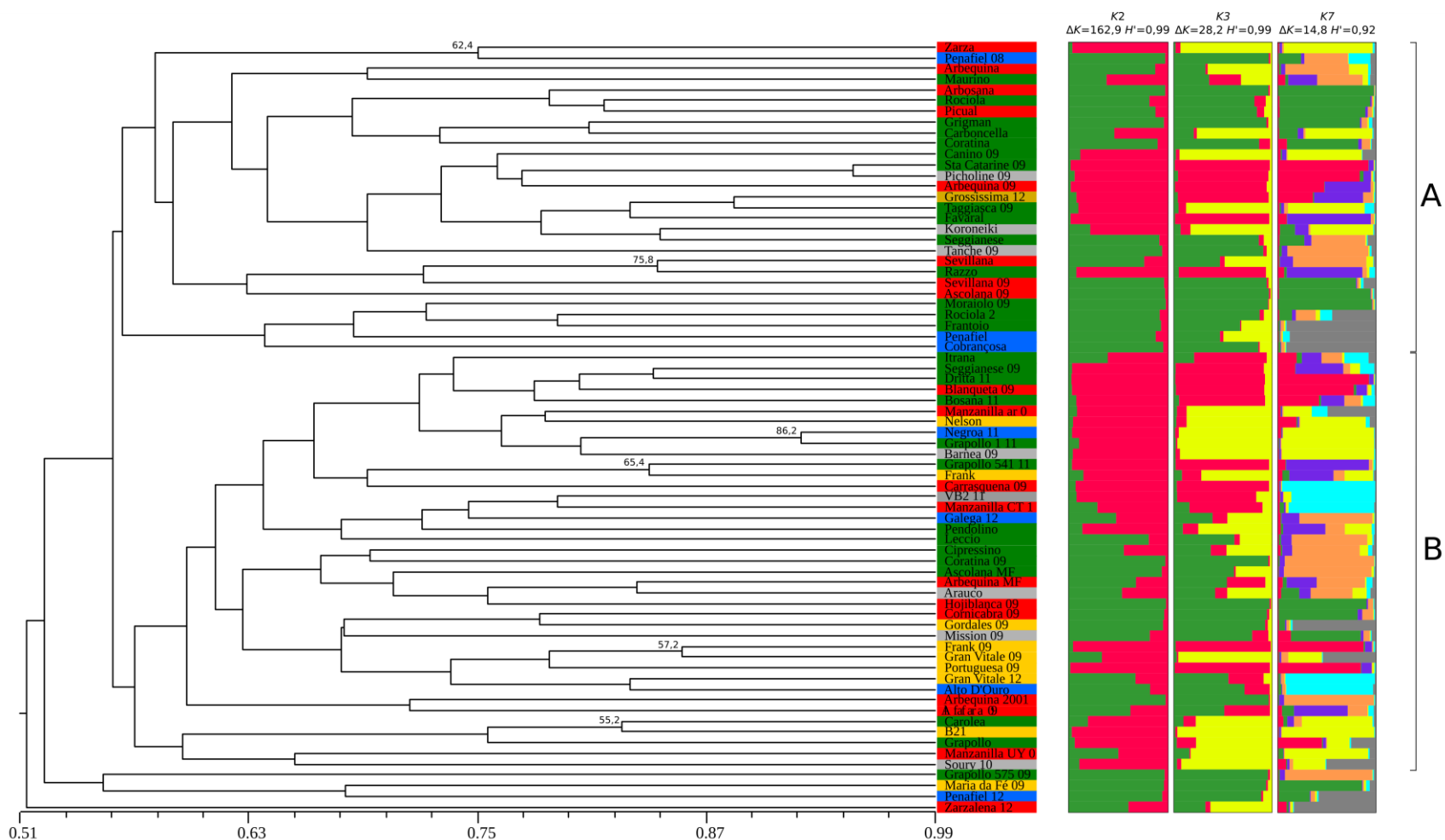


Figura 1 . Variabilidade genética e estrutura populacional de 72 genótipos de *Olea europaea* com base em 20 *loci* SSR. a) Dendrograma obtido através da análise de agrupamento UPGMA com base na matriz de similaridade genética obtida pela correlação de Mantel. A identificação dos genótipos ocorre conforme descrito na tabela 1. b) Estratificação da população: acessos identificados como amarelo= Brasil, vermelho= Espanha, verde= Itália, azul= Outros e cinza= Portugal c) Estratificação da população para valores de $k = 2$. d) $k = 3$. e) $k = 7$ Cada cor representa uma diferente subpopulação.

Verificou-se que os resultados da abordagem Bayesiana são suportados pelos resultados da análise hierárquica clássica de agrupamentos baseada em dendograma gerado pelo método UPGMA.

A análise não hierárquica de coordenadas principais (PCoA) devido a alta relação entre os genótipos não foi capaz de separar em grupos definidos os acessos que compõem a coleção do banco ativo de germoplasma de Oliveiras da Embrapa Clima Temperado/RS. Os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais revelou que a contribuição do PCo1 foi de 59,11%, PCo2= 5,03 % e PCo3= 3,12%, o somatório das coordenadas principais representa 67,26% de representação da variabilidade genética nas três primeiras dimensões, figura 2.

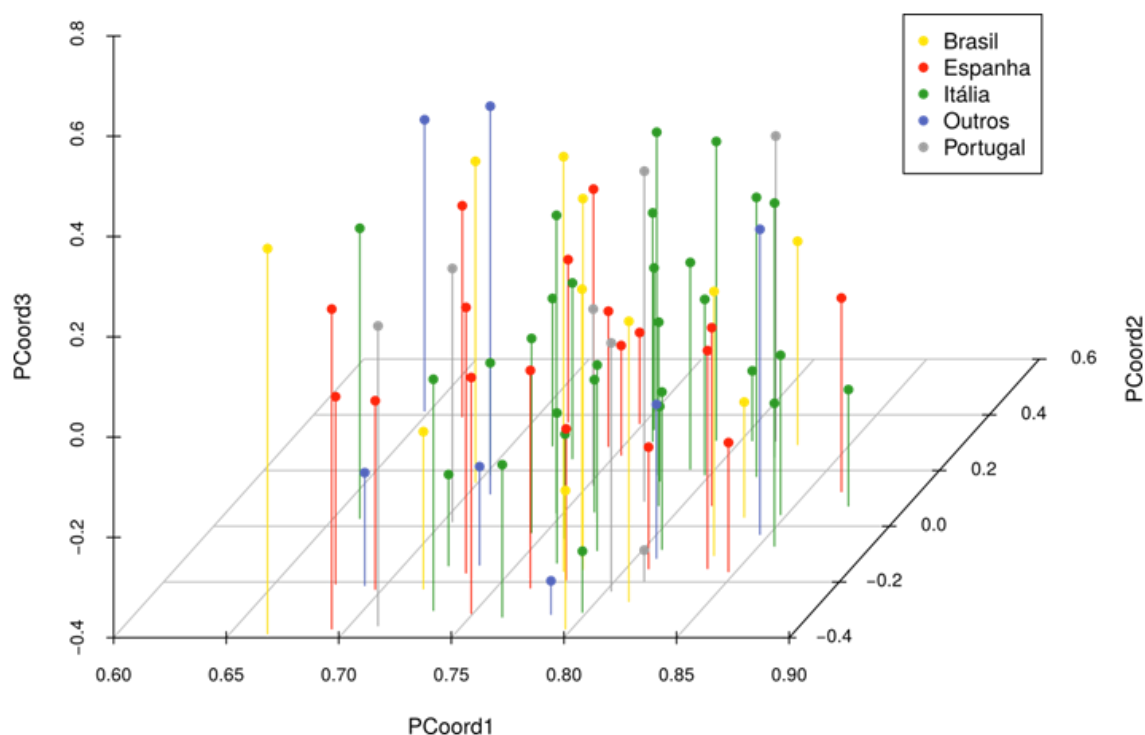


Figura 2. Resultados da análise não hierárquica de coordenadas principais (PCoA- *Principal Coordinates Analysis*) para as três primeiras coordenadas principais dos acessos de oliveiras do Banco ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado/RS. Nota: PCoord1= 59,11; PCoord2= 5,03 e PCoord3=3,12.

Neste estudo empregou-se dois métodos de agrupamento para classificar os acessos de oliveiras *Olea europaea*, o tradicional método hierárquico baseado em dendograma e o não hierárquico de abordagem

Bayesiana. A abordagem Bayesiana tem sido eficientemente utilizada para inferir agrupamentos e para a elucidação da estrutura genética de populações em espécies vegetais do gênero *Olea* (BALDONI et al., 2009). Embora a população em estudo não esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, este modelo leva em consideração este equilíbrio para inferir a estrutura genética e classificar os acessos em subpopulações, sendo que indivíduos que se apresentam em desequilíbrio, estes agrupam-se juntamente em valores de K baixos, com baixa diferenciação, conforme observado neste estudo. O modelo Bayesiano foi empregado juntamente com a análise hierárquica para agrupar os acessos deste estudo em diferentes *pools* alélicos. Com o valor de $K=2$ foi possível diferenciar o banco de germoplasma em dois diferentes *pools*, os quais são referentes em alta relação genética com os diferentes grupos que compõem a coleção do Banco Ativo de Germoplasma de oliveiras da Embrapa Clima Temperado de Pelotas/RS.

A falta de identidade genética entre as oliveiras estudadas, pode ser devido a maioria dos acessos, 79,16% com a mesma origem, a Europa (29 acessos da Itália, 18 da Espanha, 7 de Portugal, 2 da França e 1 da Grécia), sendo seguidos por 16,66% de acessos oriundos da América do Sul (11 acessos do Brasil e 1 da Argentina), Ásia, com 2,77% (1 acesso de Israel e 1 do Líbano) e América do Norte com 1,38% dos acessos (1 acesso dos Estados Unidos da América).

As oliveiras agruparam-se em vários subagrupamentos neste estudo, com similaridade genética mínima de 0,97 e máxima de 0,51. Resultado próximo em relação a similaridade genética de oliveiras foi encontrado por Belaj et al. (2002), o qual utilizou marcadores SSR e encontrou medidas de similaridade entre 0,70 e 0,38.

Rallo et al. (2001) também não conseguiu agrupar claramente as 46 cultivares de oliveiras de acordo à sua origem geográfica utilizando marcadores SSR. De acordo com Belaj et al. (2003), a dificuldade de diferenciar cultivares de oliveiras entre os países, provavelmente é consequente do intercâmbio de material genético entre Itália e Espanha. Esta estrutura da diversidade genética em comparação com origem geográfica de cultivares reflete, muito provavelmente, um processo de seleção multilocus

em oliveiras (BESNARD et al., 2001), uma difusão limitada de cultivares de oliveiras fora de suas áreas de cultivo (SANZ-CORTÉS et al., 2001) e uma possível troca de material vegetal entre as diferentes regiões e países ao longo da história das oliveiras (ANGIOLILLO et al., 1999). Porém, a diferenciação genética entre as cultivares, detectada por três marcadores moleculares, foi mais elevada no interior de cada país (Itália e Espanha) do que entre eles. Esta é consistente com a observação geral de que espécies lenhosas exogâmicas e perenes, como oliveiras, apresentam maior variação dentro de cada país (LAMBOY et al., 1996; BARTISH et al., 2000; GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000; ORAGUZIE et al., 2001).

Segundo Belaj et al. (2007), seu estudo indica um grau de mistura em todas as populações, e sugere uma certa prudência em relação a diferenciação genética a nível de população, tornando-se difícil identificar limites genéticos claros entre áreas candidatas que contenham germoplasmas genuinamente silvestres ou selvagens. O maior nível de similaridade observada entre as cultivares originárias dos mesmos, ou nas proximidades das origens geográficas, concorda tanto com a hipótese de origem autóctone, como a difusão limitada de cultivares de oliveira a partir de suas zonas de cultivo (BARRANCO, 1994, 1997; RALLO e CIDRAES, 1978; BELAJ et al., 2001).

Atienza et al. (2013) sublinhou que níveis muito elevados de similaridade, devido a pouca discriminação apresentada pelos microssatélites, são suscetíveis de excluir uma possível origem de reprodução sexual devido a baixa variabilidade encontrada entre os acessos. No entanto, pequenas diferenças nos perfis de microssatélites, provavelmente, podem ser devido a uma interpretação incorreta dos padrões de repetição (BALDONI et al., 2009). Portanto, os perfis genéticos que diferem em alguns alelos podem ser também atribuídos a um genótipo (BALDONI et al., 2009; BEGHÈ et al., 2015).

Algumas razões podem explicar a dificuldade dos *loci* selecionados para atribuir corretamente cultivares para sua área de cultivo. Assim, mesmo utilizando marcadores SSR, o problema da atribuição de cultivares de sua área de cultivo será possível apenas para uma parte das cultivares

autóctones e nas áreas em que a introdução de *pools* genéticos provenientes do exterior tenha sido limitada, como parece para o extremo oeste do Mediterrâneo (BESNARD et al., 2001).

No Mediterrâneo, segundo Hosseini-Mazinani et al. (2014), como a distância geográfica e diferentes eventos históricos das duas áreas podem ter contribuído para a manutenção da separação entre o germoplasma do Mediterrâneo e o iraniano. Levando a conclusão de que o efeito fundador é a mais provável explicação para a variabilidade genética dos ecótipos iranianos, assim como dos resultados obtidos no presente trabalho.

Análise de variância molecular

A análise de variância molecular foi utilizada para verificar a relação genética existente entre os grupos, entre os acessos dentro de grupos e dentre os acessos da coleção do banco de germoplasma.

A análise de variância molecular apresentou moderada significância no particionamento da variação genética entre os grupos de olivas, com valor de $FST = 0,49$. Alta variação molecular foi detectada entre o conjunto total de acessos do banco de germoplasma.

A diferenciação dos grupos pelo coeficiente de endogamia (Figura 3) apresentou os seguintes resultados: grupo de acessos do Brasil= 0,46, grupo de acessos da Espanha= 0,51, o grupo de acessos da Itália= 0,48, o grupo de acessos de Portugal= 0,53 e grupo de acessos de outros países= 0,38. O grupo de Portugal apresenta a maior contribuição para a diversidade genética do banco de germoplasma. Entretanto estes valores são para todo o grupo, e cada grupo não é constituído pelo mesmo número de acessos, mas o grupo de acesso de Portugal, apesar de ter somente sete genótipos representados no Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, obteve além do mais alto valor de FIS (variação entre indivíduos dentro de populações) um Na de 50 alelos.

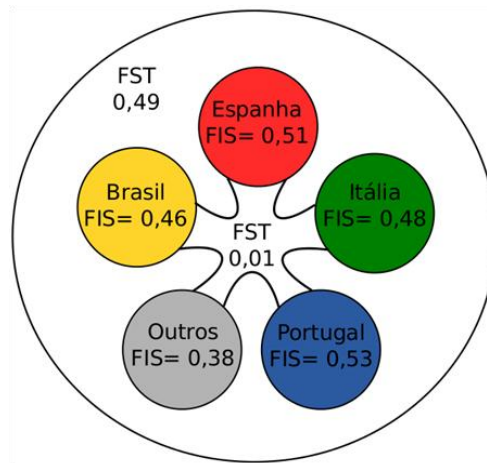


Figura 3: Representação gráfica da variação molecular da coleção de germoplasma de oliveiras da EMBRAPA Clima Temperado.

Mesmo cada grupo sendo constituído por diferentes números de acessos, a média de alelos por locus foi muito semelhante entre eles, nos acessos Espanha e Itália 3 alelos por *locus*, nos acessos Brasil e Portugal, 2,5 alelos por *locus* e no acesso de outros países 2,6 alelos por *locus*. Em trabalhos realizados por Marrazzo et al. (2000) e Cipriani et al. (2002) também foi encontrado um baixo número de alelos por *locus*, o que pode ser justificado pela possível coancestralidade das cultivares estudadas. A ocorrência de variação genética clonal tem sido relatada para outras espécies, como uva (*Vitis* spp.), onde cultivares muito antigas ainda são propagadas (SENSI et al., 1996; CERVERA et al., 1998).

Segundo Fendri et al. (2014), concluíram de que não existe nenhuma separação significativa entre cultivares espanholas e portuguesas de acordo com a origem geográfica, sendo, a distinção ocasionada como consequência da continuidade do cultivo e da seleção integrada pelos agricultores. No trabalho de Belaj et al. (2004), não foi encontrada diferenciação entre cultivares espanholas e italianas. Podendo-se inferir que a diversidade genética de oliveiras, provavelmente, reflete um processo de seleção multilocal (BESNARD et al., 2001b), bem como um limite de difusão das cultivares de oliveiras fora de suas áreas de cultivo (Sanz-Cortés et al., 2001), e uma possível troca de material vegetal entre as diferentes regiões e países ao longo da história do cultivo de oliveiras (ANGIOLILLO et al., 1999).

O elevado grau de variabilidade encontrado em vários estudos pode ser explicado pela grande diversidade de cultivares de oliveira (BARTOLINI et al, 1998; LAVEE, 1994; ZOHARY e SPIEGEL-ROY, 1975) e a complexidade do genoma de oliva; ou seja, a oliveira tem 23 pares de cromossomos e acredita-se ter sido originado por aloploidia (ZOHARY e SPIEGEL-ROY, 1975; BELAJ et al., 2001). A região de amplificação neste trabalho ocorreu em torno de 50 pb após a especificação do *primer*. Os mecanismos que produzem variação SSR são complexos e podem depender de vários fatores, incluindo o tipo e número de repetições ou a sequência das regiões flanqueadas (ALMEIDA e PENHA-GONÇALVES, 2004). Em oliva, alelos de diferentes tamanhos com variação não esperada de repetição devem-se principalmente a presença de repetições composto di- e tri-nucleótidos. Discrepâncias entre os padrões de alelos esperado e obtido dificultam a criação de faixas de alelos, como já foi relatado para outras espécies, (BALDONI et al., 2009).

A espécie de oliveira é diplóide, mas Minelli et al. (2000) sugere que uma evolução no genoma pode ser responsável pela presença ou redundâncias de sequências de DNA repetidos em dadas regiões cromossômicas, que pode ser o caso destes SSRs. Neste caso, estes alelos podem ser úteis para discernir cultivares, mas eles não devem ser usados em estudos populacionais, segundo Sabino Gil et al. (2006).

Tabela 4. Análise de variância molecular [AMOVA (Weir & Cockerham, 1984; Excoffier et al., 1992; Weir, 1996)] da coleção de acessos de oliveiras da EMBRAPA Clima Temperado.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações (FST)	4	36	0,07	1,42
Entre indivíduos dentro de populações (FIS)	67	480,2	2,33	47,59
Entre indivíduos [FIT (geral)]	72	180	2,50	50,99
Total	143	698,2	4,90	

Nota: Teste de significância (1023 permutações), p-value: FIS: 0,00; FST: 0,96 e FIT: 0,00.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que há uma moderada diversidade alélica mesclada dentro e entre os diferentes grupos que

constituem a coleção de oliveiras. A diversidade genética desta coleção pode ser aumentada com a introdução de genótipos de oliveiras de diferentes regiões do mundo, abrangendo outras espécies, selvagens ou cultivadas. O aumento da diversidade genética a partir de diferentes regiões edafoclimáticas do mundo poderá facilitar a obtenção ou seleção de genótipos bem adaptados às condições de solo e clima do sul do Brasil.

Até agora, a alta diversidade genética das oliveiras cultivadas, a dúvida sobre os nomes dados para cada genótipo, a distribuição local de mais variedades e ao grande número de coleções estabelecido em cada país representam fatores importantes que não permitem o desenvolvimento de um confiável banco de dados de perfis de cultivar SSR. Além disso, os resultados obtidos por importantes grupos de trabalho de forma independente na caracterização e identificação de cultivares de oliveiras, a comparação de dados entre os laboratórios ainda representa uma tarefa muito difícil, (Baldoni et al., 2009).

A impressão digital baseada em SSR de cultivares de oliveiras pode ajudar a gerar bancos de dados moleculares que facilitarão a gestão de coleções de cultivares, controle comercial de material vegetal, e seleção de genótipos para programas de melhoramento, (Belaj et al., 2004).

CONCLUSÕES

O conjunto de marcadores SSR escolhidos apresentaram-se polimórficos, permitindo a caracterização de todos os acessos do Banco ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS).

Os acessos da coleção possuem alta relação genética, não sendo possível separar seus grupos de acordo com a origem geográfica, provavelmente devido a maioria ser do mesmo centro de origem.

CAPÍTULO 3

Caracterização de acessos de Oliveiras(*Olea europaea* L.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado –RS baseados em marcadores morfológicos e moleculares

INTRODUÇÃO

A riqueza do germoplasma de oliveiras cultivadas é um extraordinário caso entre as culturas frutíferas devido à longevidade da árvore e a falta de renovação com novos genótipos obtidos por melhoramento (LINOS et al., 2014). Alguns inconvenientes na gestão e identificação da planta, a diferença entre cultivares é complicada pela freqüência de homônimos e sinônimos (ALBA et al., 2009). De acordo com Chiappetta e Muzzalupo et al., 2012, até poucos anos, a identificação de cultivares foi baseada apenas em caracteres morfológicos e agronômicos. Tradicionalmente a diversidade dentro e entre cultivares de oliveira foi determinada por diferenças na avaliação da árvore de oliveira, ou seja, a forma e cor da folha, a morfologia do fruto, etc. Estas medidas têm a vantagem de estar prontamente disponíveis, não exigem equipamentos sofisticados e são medidas diretamente no fenótipo, assim, elas são acessíveis para uso imediato, um importante atributo.

O desenvolvimento da cultura da oliveira no Rio Grande do Sul, basicamente, se dará em função do acerto das cultivares mais adequadas para cada região, com os resultados dos experimentos que estão sendo desenvolvidos pela Embrapa Clima Temperado e pelas instituições parceiras, como: Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), entre várias outras por toda a região Sul do Brasil. Os caracteres morfológicos utilizados sistematicamente permitem a caracterização primária e a identificação das cultivares (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2000). A realização da caracterização morfológica através de diversos descritores das cultivares com potencial de exploração comercial no RS é uma estratégia fundamental para verificar se estas tem comportamento diferenciado em nosso país. O método tradicional de caracterização de plantas agro-morfológicas é um passo comum no melhoramento de plantas para seleção e também representa a primeira escolha usada para descrever e caracterizar o germoplasma, (BELAJ et al., 2011). Pois, tradicionalmente características morfológicas são usadas para identificar cultivares de oliveira (FABBRI et al., 1995) e tem sido amplamente usadas para descrever o germoplasma de oliveiras, (CIPRIANI et al., 2002).

No entanto, estes marcadores morfológicos e fenológicos têm a desvantagem devido ao pequeno número de polimorfismo detectado e de serem dependentes do ambiente. Os resultados da caracterização morfológica têm implicações importantes relativas tanto a adaptação das cultivares a seu ambiente local e seu desempenho agrônomo sob condições específicas. Isto também implica que cada iniciativa para promover o cultivo da oliveira tem de ter em consideração as variedades locais e que cada região deve preservar o seu próprio material vegetal para garantir a adaptação de oliveiras e a produtividade e para manter as características típicas intrínsecas do azeite (ROTONDI et al., 2003).

Além disso, segundo Mohan et al. (1997) e Tanksley e Orton (1983), alguns dos caracteres fenológicos são acessíveis apenas por um período limitado (por exemplo, frutos verde-oliva) ou quando a árvore da azeitona

atinge um estágio maduro, o que pode retardar a identificação correta. Devido aos recentes avanços em tecnologias de DNA a maioria dos estudos tem sido realizados por meio de marcadores moleculares, SSR (Sequência Simples Repetida), sendo o mais amplamente utilizado. No entanto, apesar dos inconvenientes da descrição morfológica tradicional, tais como influências ambientais, e a necessidade de extensas observações das plantas maduras, a utilização conjunta de ambas as características agronômicas e SSR podem dar a oportunidade de explorar a complementaridade destes dois métodos (KARP et al., 1997) para avaliar a variabilidade genética das oliveiras.

Conforme já mencionado, até recentemente a identificação de plantas propagadas era baseada unicamente nas características morfológicas e na experiência dos agricultores. Atualmente busca-se a concordância de resultados entre marcadores morfológicos e moleculares. Contudo, a caracterização morfológica e molecular do banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS), pode verificar a variabilidade genética em maiores detalhes, os quais podem ser usados para determinar a relação dos acessos de oliveira gerando agrupamentos entre os mesmos, que favorece a seleção e distinção entre cultivares. A identificação de variedades, utilizando marcadores moleculares é um objetivo crucial da moderna horticultura, porque tal técnica facilita enormemente os programas de melhoramento e gerenciamento de coleção de germoplasma.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar usando marcadores morfológicos e moleculares, 12 importantes acessos de oliveira do germoplasma da Embrapa Clima Temperado, principalmente as de origem brasileira. Essa informação pode ser utilizada para identificar e reduzir a confusão entre as denominações; ambos os passos importantes para a certificação dos materiais de propagação recentemente introduzidos para as oliveiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material vegetal avaliado no presente estudo foi proveniente do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, com 12 acessos, sete originários do Brasil (B21, VB2/11, Gordales 09, Gran Vitale 09, Nelson, Frank e Maria da Fé), dois genótipos de Portugal (Galega 12 e Penafiel), dois genótipos da Itália (Coratina 09 e Canino 09) e um da Espanha (Arbequina 09). A lista dos acessos avaliados e suas origens está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Coleção de Oliveiras (*Olea europaea* L.), conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Clima Temperado, em condições de campo, 12 acessos.

Cultivares	Espécie	Origem	Referência
B21	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
VB2_11	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Coutinho et al.(2009)
Gordales_09	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
Gran_Vitale_09	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
Nelson	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
Frank	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
Maria_da_Fé_09	<i>Olea europaea</i>	Brasil	Embrapa (2009)
Arbequina_09	<i>Olea europaea</i>	Espanha	Rallo et al. (2000)
Coratina_09	<i>Olea europaea</i>	Itália	Carriero et al. (2002)
Canino_09	<i>Olea europaea</i>	Itália	Baldoni et al.(2009)
Galega_12	<i>Olea europaea</i>	Portugal	Rallo et al. (2000)
Penafiel	<i>Olea europaea</i>	Portugal	Coutinho et al.(2009)

Caracterização morfológica

As avaliações morfológicas foram realizadas para estimar a variabilidade fenotípica dos 12 acessos (Tabela 1) da coleção de oliveiras do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado.

Foram analisados seis caracteres fenotípicos, de acordo com os descritores morfológicos desenvolvidos no Catálogo Mundial de Variedades de Oliva, do CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (BARRANCO et al., 2000), sendo dois qualitativos e quatro quantitativos, relacionados: à folha e flor. As avaliações foram realizadas com o auxílio de régua milimetrada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (25 por quadrante imaginário - N, S, L, W) nos anos de 2011, 2012,

2013, 2014 e 2015, totalizando 100 folhas e 100 ráculos florais coletados por planta. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O conjunto de descritores morfológicos avaliado neste estudo está descrito na tabela 2, e ilustrados no apêndice 1.

Tabela 2- Caracteres qualitativos e quantitativos avaliados nos acessos da coleção de *Olea europaea*

No	Caracteres	Abreviação	1	2	3	4
Parâmetros qualitativos e seus estados e códigos						
1	Folha-Curvatura (longitudinal de limbo)	FC	Epinás-tica	Plana	Hiponás-tica	Helicoi-dal
2	Folha - Forma	FF	Elíptica	Elíptica-lanceo-lada	Lanceo-lada	
Parâmetros quantitativos e suas unidades						
1	Folha-Comprimento	FLCL	Curta	Média	Longa	cm
2	Folha-Largura	FLL	Estreita	Média	Larga	cm
3	Ráculos-Comprimento	RC	Curto	Médio	Longo	mm
4	Número de flores/inflorescências	NF	Baixo	Médio	Alto	No

Nota: cm - centímetros, mm - milímetros, No - número

Caracterização molecular

Extração de DNA e Genotipagem com Marcadores Microsatélites

Para a extração de DNA foram coletadas folhas jovens de plantas do BAG, identificadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O DNA genômico foi isolado de acordo com protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996), sendo utilizadas entre 0,15 e 0,20g de tecido vegetal, quantificado com Fluorômetro (Qubit™, Invitrogen) e as concentrações ajustadas para 30 ng/μl para as reações de amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Os 12 acessos de oliveira foram analisados em sete *loci* SSR, (Sabino Gil et al., 2006; Cipriani et al., 2002; Rallo et al., 2000), previamente desenvolvidos para *Olea europaea* L (Tabela 3).

O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo cada amostra 1,0 µL de DNA genômico (30ng/µL); 1,5 µL do *primer* (*forward* com iniciador M-13 CACGACGTTGTAAAACGAC adaptado na sequência e *reverse*), contendo 1,5 µL de tampão 10X; 1 mM de MgCl₂; 0,25mM de dNTP, 1 unidade de Taq polimerase (Ludwig®) e água milli-Q estéril. O programa utilizado para amplificação das amostras foi de: 1 ciclo de 94°C por 11 min.; 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, temperatura de anelamento entre 54 a 64°C por 1 min., dependendo da característica de cada par de *primer*, 72°C por 1 min. 1 ciclo de 72°C por 5 min. e 1,0 µL do iniciador marcado M-13 com corante de fluorescência (M-13.FWD(-29)/IRDye 800 *Primer*) (LI-COR) na concentração de 1,0 µM.

As reações de amplificação via PCR foram diluídas com água milli-q estéril para uma concentração desejável que permitisse uma clara visualização dos fragmentos amplificados, geralmente numa proporção de 1:20 (1 µL da reação para 20 de água milli-q esterilizada) sendo necessário ajuste para cada *primer*. Após ajustada a concentração ideal, 2 µL da diluição da reação de PCR e solução *Blue Stop* (LI-COR) numa proporção de 1:1 foram desnaturadas a 94 °C por 3 minutos em termociclador acima descrito.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6,5% (LI-COR), utilizando 4300 DNA Analyzer LICOR, sendo carregados no gel 0,8 µL das reações de amplificação desnaturadas e a corrida programada para um período de 1 hora e 30 minutos a 1500 V e 40 mA. O tamanho dos alelos foi dimensionado com o marcador de DNA de peso molecular de 50-350 pb IRDye 800 (LI-COR). O software Saga Generation 2 (LI-COR) foi utilizado para visualização, registro e análise dos fragmentos amplificados. Os resultados foram organizados em uma matriz binária.

Tabela 3 - Características de 7 pares de oligonucleotídeos (primers) alvos de loci SSR empregados para avaliação da coleção de *Olea europaea* L. do Centro Nacional de Pesquisa de Clima Temperado da EMBRAPA.

Locus SSR	Referência	Sequência do primer	Motivo SSR	Tamanho esperado de amplicon (bp)	Tamanho observado de amplicon (bp)
ssrOelGP3* DQ386900	Sabino et al., 2006	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACCTATTCACTTTGCCC AACTTG R: TCAATGTAATGAGCCGTAGC	(GT) ₂₂ (AT) ₆ (AT) ₆	220	240
ssrOelGP9 DQ386906	Sabino et al., 2006	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACAATATTCGGTGGCA TGTGGC R: GATGACGGACCAACTAACAC	(TTC) ₂ TAC (TTC) ₂ (TGT) ₂ (TTC) ₂	152	180
ssrOelGP16 DQ386913	Sabino et al., 2006	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACCTGAGCTTGATA CAGTGG R: TCTGGCATAATCTTGAATG	(TG) ₂₂	141	160
ssrOelGP18* DQ418773	Sabino et al., 2006	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACCCCCTTCTTT TCTTTCTTTTG R: CACCCACAAAATCCAAACCC	(TCC) ₂ TT (TC) ₂ TT (TC) T (TC) ₇	161	160
UDO99-031	Ciprianiet al., 2002	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACTATCCTCTA TGTGGCGATG R: TTGGTTAAAAGGATTGATACA	(TG) ₂₁ (TATG) ₆	155	160
IAS-oli17	Ralloet al., 2000	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACTTAGATAAAAAGGGA GCATGGCTGA R: CAAATATATGAGAAAACAGTACACAGGAAC	AGGAG (AGAGGG) ₇ AGGGAG	190	220
IAS-oli22	Ralloet al., 2000	F(M13):CACGACGTTGTAAAACGACCAAGAAGAGAGAG AAAATGAGAGCCCCCAT R: TCCGACTTATGAGCTGTTTTTTCTTTGGAA	(GA) ₆ (GT) ₅ GACCT (GA) ₅	134	175

Variabilidade genética

Os parâmetros de variabilidade genética dos sete loci avaliados foram: número de alelos observados por *locus* (N_a), número efetivo de alelos por *locus* (N_e) ($N_e = 1 / \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência alélica na população *ith* para cada *locus*), heterozigosidade observada (H_o) (H_o =número de acessos heterozigotos / número total de acessos), heterozigosidade esperada (H_e) ($H_e = 1 - \sum p_i^2$), índice de fixação de *Wright* ou coeficiente de endogamia ($F = 1 - H_o/H_e$) (WRIGHT, 1978) e o índice de informação de *Shannon* (LEWONTIN, 1972). Estes parâmetros foram calculados utilizando o *software* POPGENE Ver. 1.32 (YEH et al., 1997). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980), indicativo da habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente, foi estimado para cada *locus* com o *software* Powermarker Ver. 3.25 (LIU & MUSE, 2005). O *software* IDENTITY Ver. 1.0 (WAGNER & SEFC, 1999) foi empregado neste estudo para determinar a probabilidade de identidade [$P_i = 1 - \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$]. Para a probabilidade de identidade assume-se que dois acessos tenham a probabilidade de ser aleatoriamente idênticos baseado na observação da frequência alélica e na escolha de *locus* ao acaso (PAETKAU et al., 1995).

Relação genética entre acessos

A relação genética entre os acessos foi analisada através dos resultados da caracterização molecular e fenotípica. Para ambos os dados moleculares e fenotípicos qualitativos foi computada a distância Euclidiana em separado no *software* NTSYS-PC Ver. 2.1 (ROHLF, 2005). Os dados quantitativos foram submetidos a análise de distância de Mahalanobis sob o *software* SAS Ver. 9.3. A sumarização das matrizes de distância para representação em dendrograma foi realizada atribuindo pesos iguais as matrizes (Tabelas 4, 5 e 6). Subsequentemente a sumarização das matrizes foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted*

Pair Group Method with Arithmetic Mean) e posterior construção do dendrograma sob o software NTSYS.

O dendrograma foi computado pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) com 1000 réplicas de permutação.

Tabela 4. Morfológicos quantitativos distância de Mahalanobis.

	Arbequina Uruguay	B21	Canino	Coratina	Frank	Galega	Gordales	Gran Vitale	Maria da Fe	Nelson	Penafiel	VB2
Arbequina_Uruguay	0											
B21	145,47	0										
Canino	122,07	27,4	0									
Coratina	111,73	37,94	4,63	0								
Frank	135,38	4,18	20,19	35,98	0							
Galega	175,06	17,07	11,89	14,19	21,59	0						
Gordales	40,56	37,74	37,41	43,55	29,29	64,85	0					
Gran_Vitale	88,39	11,22	13,69	23,18	5,64	25,83	10,93	0				
Maria_da_Fe	68,04	179,47	125,71	144,08	139,26	207,2	67,61	103,77	0			
Nelson	121,4	7,22	24,66	41,74	1,05	30,92	22,48	4,59	122,33	0		
Penafiel	57,43	24,18	23,27	30,34	16,7	44,23	2,77	3,75	79,08	12,51	0	
VB2	78,35	20,95	6,55	9,93	15,31	22,3	13,42	3,7	100,16	15,6	5,9	0

Tabela 5. Morfológicos qualitativos distância de Euclidiana.

	Arbequina Uruguay	B21	Canino	Coratina	Frank	Galega	Gordales	Gran Vitale	Maria da Fe	Nelson	Penafiel	VB2
Arbequina_Uruguay	0											
B21	2	0										
Canino	2	0	0									
Coratina	2	0	0	0								
Frank	2	1,41	1,41	1,41	0							
Galega	1,41	1,41	1,41	1,41	2	0						
Gordales	2	0	0	0	1,41	1,41	0					
Gran_Vitale	2	0	0	0	1,41	1,41	0	0				
Maria_da_Fe	1,73	1,73	1,73	1,73	1,41	1,73	1,73	1,73	0			
Nelson	2	0	0	0	1,41	1,41	0	0	1,73	0		
Penafiel	1,41	1,41	1,41	1,41	2	0	1,41	1,41	1,73	1,41	0	
VB2	2	1,41	1,41	1,41	0	2	1,41	1,41	1,41	1,41	2	0

Tabela 6. Molecular distância de Euclidiana.

	Arbequina Uruguay	B21	Canino	Coratina	Frank	Galega	Gordales	Gran Vitale	Maria da Fe	Nelson	Penafiel	VB2
Arbequina_Uruguay	0											
B21	2,45	0										
Canino	2,45	1,73	0									
Coratina	2,65	2	2,24	0								
Frank	2,45	2	2,45	1,73	0							
Galega	2,65	2	2,65	2,83	2,24	0						
Gordales	2,45	1,73	2,83	2,45	2,45	2,65	0					
Gran_Vitale	2,24	1,41	2,65	2,45	2,24	2,45	1	0				
Maria_da_Fe	1	1,41	1,41	1,73	1,41	2	0	0	0			
Nelson	1,41	1,41	1,73	1,73	1,41	2	1	0	0	0		
Penafiel	2	1,41	2,45	2,65	2,45	2,65	2	1,73	1	1,41	0	
VB2	2,65	2	2,65	2,83	2,65	2,83	1,73	1,41	0	1,41	2,24	0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram empregados inicialmente sete pares de primers alvos de *loci* SSR isolados a partir de oliveiras (Tabela 3). Todos os sete *loci* SSR foram polimórficos, sendo estes utilizados para a análise de 12 acessos da coleção de oliveiras. A amplificação destes *loci* resultou na identificação de dois (SSROilGP18, IAS_Oli22) a cinco alelos (UDO99_031) por acesso. A região de amplificação ocorreu em torno de 20 pb após a especificação do primer, devido ao uso do iniciador M-13 adaptado na sequência *Forward* do primer. A avaliação dos sete *loci* polimórficos revelou 22 alelos, média de 3,14 alelos por locus, resultado que corrobora com a média de 3 alelos em Cipriani et al. (2002), com o mesmo número de acessos investigados, indicando a taxa média de diversidade genética existente entre os acessos estudados da coleção de oliveiras. O número de alelos efetivos apresentou média de 2,16 e total de 15,11 (68,68%). O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,20 (SSROilGP18) a 1,28 (UDO99_031), com média de 0,82. Os resultados dos parâmetros de diversidade genética avaliados neste estudo estão apresentados na tabela 7. A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,48 com valores variando de 0,10 (SSROilGP18) a 0,68 (IAS_Oli17). Ainda, a heterozigosidade observada apresentou valores variando de 0,10 (SSROilGP18) a 1 (SSROeIGP3 e SSROilGP9), com média de 0,67, semelhante a média encontrada em Caruso et al. (2014) que foi de 0,71. O parâmetro de índice de fixação de Wright, o qual mensura a deficiência ou excesso de heterozigosidade, apresentou-se na maioria dos *loci* avaliados com valores negativos, e média de -0,42 por locus. O máximo valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC) detectado foi de 0,63 (IAS_Oli17), o mínimo de 0,09 (SSROilGP18) e média de 0,41, em Diéz et al. (2014) que foi de 0,45-0,90 e média de 0,69 e Marra et al. (2014) com média de 0,68 e Caruso et al. (2014) 0,59. A máxima probabilidade de identidade (PI) 0,82 foi identificada para o locus que apresentou o menor número de alelos efetivos (SSROilGP18), e o melhor valor 0,15 para o locus (IAS_Oli17). O marcador UDO99_031, que apresentou os melhores resultados, amplificou os mesmos 5 alelos em Cipriani et al. (2002) e Marrazzo et al. (2000). O

também informativo IAS_Oli17, com 4 alelos conforme Rallo et al. (2000). Os parâmetros de variabilidade genética variam muito de acordo com a biodiversidade de genótipos, ao conjunto de microsatélites usados por cada grupo de pesquisa, as diferentes metodologias aplicadas para o dimensionamento do alelo, erros de genotipagem e ocorrência de variação intra-cultivar (BALDONI et al., 2009).

Locus	Ng	Na	Ne	I	He	Ho	F	PIC	PI
-------	----	----	----	---	----	----	---	-----	----

Tabela 7. Parâmetros de variabilidade genética calculados para sete *loci* SSR em 12 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016

Locus	Ng	Na	Ne	I	He	Ho	F	PIC	PI
SSROeIGP3	10	3	2.20	0.85	0.54	1	-0.83	0.44	0.31
SSROiIGP9	9	3	2.22	0.86	0.55	1	-0.82	0.44	0.30
SSROiIGP16	11	3	1.45	0.60	0.31	0.36	-0.15	0.29	0.49
SSROiIGP18	10	2	1.10	0.20	0.10	0.10	-0.05	0.09	0.82
UDO99_031	12	5	3.03	1.28	0.67	0.83	-0.24	0.61	0.16
IAS_Oli17	9	4	3.17	1.26	0.68	0.55	0.19	0.63	0.15
IAS_Oli22	12	2	1.94	0.68	0.48	0.83	-0.71	0.36	0.38
Media	21	3.14	2.16	0.82	0.48	0.67	-0.42	0.41	
Total		22	15.11						

Ng - número de genótipos, Na - número de alelos observados, Ne - alelos efetivos, I - índice de Shannon, He - heterozigosidade esperada, Ho - heterozigosidade observada, F - índice de fixação, PIC - conteúdo de informação polimórfica e PI - probabilidade de identidade.

Nos dados morfológicos verificou-se uma variação nos valores dos caracteres, comprimento de folha, ('Coratina' e 'Arbequina'), largura de folha, ('Arbequina' e 'Maria da Fé'), ainda, o comprimento de ramos, ('Maria da Fé' e 'B21'), e número de flores ('Arbequina' e 'Nelson'), citados primeiramente o acesso com o valor máximo, seguido do valor mínimo, respectivamente. Os resultados dos caracteres morfológicos avaliados neste estudo estão apresentados na figura 1.

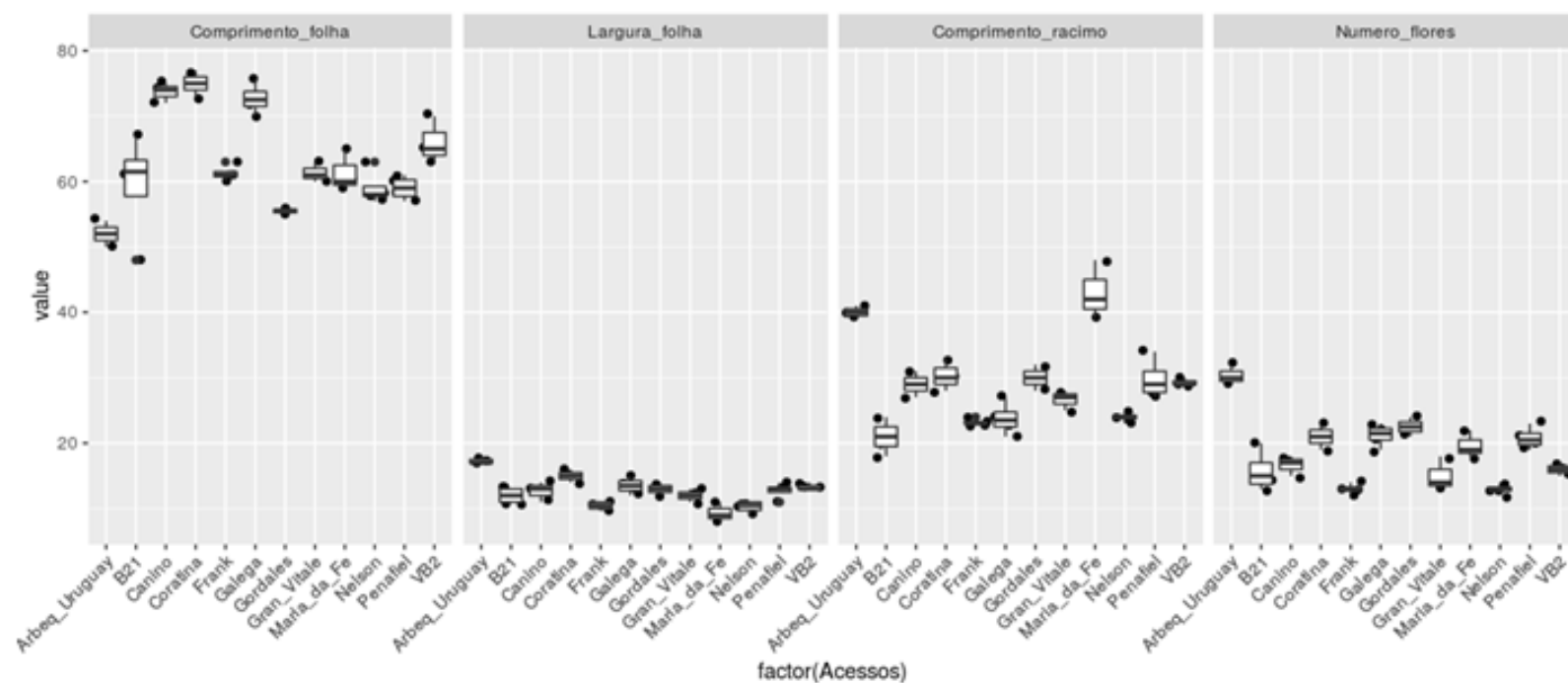


Figura 1. Representação gráfica dos caracteres morfológicos quantitativos dos 12 acessos do BAG-Embrapa Clima Temperado

A análise morfológica dos últimos cinco anos gera uma acumulação de dados que vai resultar num aumento da precisão da avaliação de adesões. Após a produção do dendrograma pode-se observar que cinco grupos principais foram formados: o grupo 1 formado pelos acessos Arbequina Uruguai e Maria da Fé, o grupo 2 formado pelos acessos B21, Gordales, Gran Vitale e Nelson, o grupo 3 formado pelos acessos Canino e Coratina, o grupo 4 formado por Frank e VB2 e o grupo 5 formado por Galega e Penafiel. A maior distância foi observada entre o acesso de Arbequina Uruguai e Maria da Fé, sendo um originário da Espanha e o outro do Brasil, seguidos respectivamente por acessos com níveis mais baixos de distância genética entre indivíduos de um mesmo subgrupo, pois partilham uma origem comum. A distância média entre os acessos foi de 256,46 e o valor do coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,86 revelou um bom ajuste entre as matrizes de distâncias e o dendrograma, indicando que a variação significativa nos caracteres morfológicos ocorreu também entre os genótipos e vice-versa. O resultado da sumarização das matrizes originou um dendrograma que separou os acessos por origem, Galega e Penafiel originários de Portugal, Frank e VB2, do Brasil, Canino e Coratina, da Itália, e os restantes B21, Gordales, Gran Vitale e Nelson, do Brasil, sugerindo a hipótese de que estes acessos de germoplasma de oliveiras da Embrapa tem em comum, uma base genética, assim como em Belaj et al. (2001) e Mardi et al. (2016), seus dendrogramas também revelaram uma correlação de cultivares de oliveiras e sua origem geográfica, em Muzzalupo et al. (2014), sete grupos identificados, confirmando a distribuição do germoplasma de oliveiras italianas germoplasma são devido a aspectos geográficos e culturais, principalmente envolvendo a atividade humana no passado.

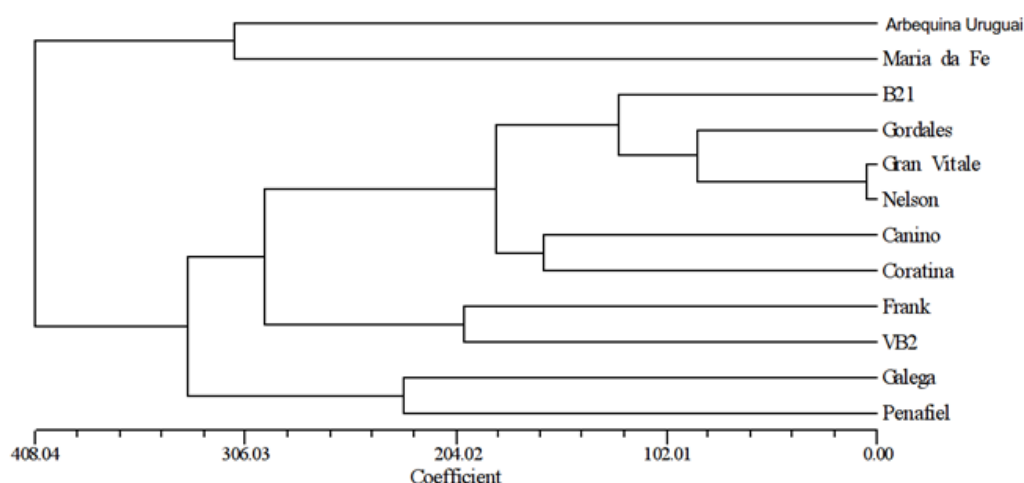


Figura 2. Dendrograma de distância resultante da sumarização das três matrizes dos caracteres morfológicos e moleculares de 12 acessos de oliveiras, através do teste de Mantel.

Segundo Cantini et al. (2008), para a gestão da coleção do germoplasma de oliveiras, é necessário utilizar a informação morfológica, além da molecular, pois os acessos podem apresentar um perfil de microsatélites com alto índice de similaridade; caso contrário, o risco é de superestimar a diversidade entre as cultivares ou subestimar a uma diversidade já presente dentro das cultivares.

Os nossos resultados indicam um nível médio de variabilidade morfológica e molecular, análises estas complementares, pois forneceram uma mais completa compreensão da diversidade disponível nestes acessos da coleção de oliveiras e posteriormente estas informações podem ser utilizadas para melhoramento da oliveira.

CONCLUSÕES

Marcadores moleculares e morfológicos caracterizaram e agruparam os acessos investigados.

O ideal é a análise conjugada de genotipagem e dados morfológicos para resolver a identidade de cada acesso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALI, N.; ATAIEI, S.; KEIHAN, A.; MOTAGHI, L.; NAGHAVI, M.; KAZEMITABAR, S. K.; REZAZADE, A.; HOSSEINI-MAZINANI, M. Comparative study of the morphological and molecular characteristics of 10 Iranian olive (*Olea europaea* L.) cultivars, **Scholars Research Library Annals of Biological Research**, v.5 (3), p 76-83, 2014.

ABU-QAOUD, H. Germination of 'Arabequina' Olive Seeds As Affected By Chemical Scarification, Hot Water Treatment And Endosperm Tissue. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v.1 (1), 2005.

ACEBEDO, M. M.; LAVEE, S.; LIÑÁN, J.; TRONCOSO, A. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes, **Scientia Horticulturae**, v.69, p 207-215, 1997.

ALBA, F.; FLORES, J. M.; WREGE, C. A.; SILVEIRA, M.; COUTINHO, E. F.; OLIVEIRA, J. R. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa Brasília, DF, Embrapa Clima Temperado, RS, 2013.

ALBA, V.; MONTEMURRO, C.; SABETTA, W.; PASQUALONE, A.; BLANCO, A. SSR-based identification key of cultivars of *olea europaea* L. diffused in southern-italy. **Scientia horticulturae**, v.123 (1), p 11–16, 2009b.

ALBA, V.; SABETTA, W.; BLANCO, A.; PASQUALONE, A.; MONTEMURRO, C. Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. **Eur Food Res Technol**, v.229, p 375–382, 2009a.

ALMEIDA, P.; PENHA-GONCALVES, C. Long perfect dinucleotide repeats are typical of vertebrates, show motif preferences and size convergence. **Mol Biol Evol**, v.21(7), p 1226–1233, 2004.

AMANE, M.; OUAZZANI, N.; LUMARET, R.; DEBAIN, C. Chloroplast-DNA variation in the wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) of Morocco. **Euphytica**, v.116, p 59–64, 2000.

AMANE, M.; LUMARET, R.; HANY, V.; QUAZZANI, N.; DEBAIN, C.; VIVIER, G.; DEGUILLLOUX, M. F. Chloroplast-dna variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.), **Theor Appl Genet**, v.99, p 133-139, 1999.

ANDERSON, N. **Diversity of low chill peaches (*Prunus persica*) from Asia, Brazil, Europe, and the USA**. M.S. Thesis in Horticulture, Texas A&M University. 82f, 2010.

ANGIOLILLO, A.; MENCUCCINI, M.; BALDONI, L. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment lenght polymorphisms. **Theor. Appl. Genet**, v.98, p 411-421, 1999.

ATIENZA, S.G.; DE LA ROSA, R.; DOMÍNGUEZ-GARCÍA, M.C.; MARTÍN, A.; KILIAN, A.; BELAJ, A. Use of DArT markers as a means of better management of the diversity of olive cultivars. **Food Res. Int.**, v.54, p 2045–2053, 2013.

AYED, R. B.; GRATI-KAMOUN, N.; MOREAU, F.; REBAI, A. Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. **Eur Food Res Technol**, v.229, p 757–762, 2009.

BALDONI, L.; TOSTI, N.; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G.; GERMANÀ, M. A.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. **Ann Bot (Lond)**, v.98, p 935–942, 2006.

BALDONI, L.; CULTRERA, N. G.; MARIOTTI, R.; RICCIOLINI, C.; ARCIONI, C.; VENDRAMIN, G. G.; BUONAMICI, A.; PORCEDDU, A.; SARRI, V.; OJEDA, M. A.; TRUJILLO, I.; RALLO, L.; BELAJ, A.; PERRI, E.; SALIMONTI, A.; MUZZALUPO, I.; CASAGRANDE, A.; LAIN, O.; MESSINA, R.; Testolin, R. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. **Mol Breeding**, v.24, p 213–231, 2009.

BANDEIRA, F.S. **Enxertia in vitro de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis***. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 73f, Minas Gerais, 2004.

BANDINO, G.; SEDDA, P.; MULAS, M. Germination of olive seeds as affected by chemical scarification, hot water dip, and gibberellic acid treatments. **Acta Hort. (ISHS)**, v.474, p. 35-38, 1999.

BARGHINI, E.; NATALI, L.; COSSU, R. M.; GIORDANI, T.; PINDO, M.; CATTONARO, F.; SCALABRIN, S.; VELASCO, R.; MORGANTE, M.; CAVALLINI, A. The Peculiar Landscape of Repetitive Sequences in the Olive (*Olea europaea* L.) **Genoma Biol Evol**, v.6 (4), 2014.

BARONE, E.; DI MARCO, L.; MOTISI, A.; CARUSO, T. The Sicilian olive gennplasm and its characterization by using statistical methods. **Acta Horticulturae**, v.356, p 66-69, 1994.

BARRANCO, D. Estructura varietal del olivo en España. **Agricultura**, v.63, p 731–732, 1994.

BARRANCO, D. Variedades y patrones, p 59–80. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar, and L. Rallo (eds.). **El cultivo del olivo**. Mundiprensa y Junta de Andalucía, 1997.

BARRANCO, D.; CIMATO, A.; FIORINO, P.; RALLO, L.; TOUZANI, A.; CASTAÑEDA, C.; SERAFINI, F.; TRUJILLO, I. **World olive catalogue of olive varieties**. International Olive Oil Council, 2000.

BARRANCO, D.; RALLO, L. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. M.º de Agricultura, **Junta de Andalucía**, 1984.

BARTISH, I.V.; GRAKAVA, L. P.; RUMPUNEN, K.; NYBOM, H. Phylogenetic relationships and differentiation among and within populations of *Chaenomeles* Lindl. (Rosaceae) estimated with RAPDs and isozymes. **Theor Appl Genet**, v.101, p 554–563, 2000.

BARTOLINI, G.; PREVOST, G.; MESSERI, C.; CARIGNANI, C. **Olive germplasm: cultivars and world-wide collections**. In: FAO SaPGRSo (ed) **FAO**, 2005.

BARTOLINI, G.; PREVOST, G.; MESSERI, C.; CARIGNANI, G. Olive germplasm: Cultivars and world-wide collections. **Food and Agr. Org. Rome**, 1998.

BARTOLINI, G.; PREVOST, G.; MESSERI, C. Olive tree germplasm: descriptor lists of cultivated varieties in the world. **Acta Horticulturae**, v.365, p 116–118, 1994.

BEGHÈ, D.; MOLANO, J. F. G.; FABBRI, A.; GANINO, T. Olive biodiversity in Colombia. A molecular study of local germplasm. **Scientia Horticulturae**, v.189, p 122–131, 2015.

BELAJ, A.; DOMINGUEZ-GARCÍA, M.C.; ATIENZA, S.G.; MARTIN, URDIROZ, N.; DE LA ROSA, R.; SATOVIC, Z.; MARTIN, A.; KILIAN, A.; TRUJILLO, I.; VALPUESTA, V.; DEL RIO, C. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers(DArTs, SSRs SNPs) and agronomic traits. **Tree Genet. Genomes**, v.8, p 365–378, 2012.

BELAJ, A.; LEÓN, L.; SATOVIC, Z.; DE LA ROSA, R. Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.129, p 561–569, 2011.

BELAJ, A.; MUNÓZ-DIEZ, C.; BALDONI, L.; PORCEDDU, A.; BARRANCO, D.; SATOVIC, Z. Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. **Ann Bot**, v.100, p 449–458, 2007.

BELAJ, A.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Characterization and Identification of the Main Spanish and Italian Olive Cultivars by Simple-sequence-repeat Markers. **HortScience**, v.39, p 1557–1561, 2004.

BELAJ, A.; RALLO, L.; TRUJILLO, I.; BALDONI, L. Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of ‘Arbequina’ and ‘Manzanilla de Sevilla’ olive. **HortScience**, v.39 (7), p 1566–1570, 2004b.

BELAJ, A.; SATOVIC, Z.; CIPRIANI, G.; BALDONI, L.; TESTOLIN, R.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive, **Theor Appl Genet**, v.107, p 736–744, 2003.

BELAJ, A.; SATOVIC, Z.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. **Theor Appl Genet**, v.105, p 638–644, 2002.

BELAJ, A.; TRUJILLO, I.; DE LA ROSA, R.; RALLO, L. Polymorphism and Discrimination Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm Bank. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v.126(1), p 64–71. 2001.

BERTONCINI, E.I.; TERAMOTO, J.R.S e PRELA-PANTANO, A. Desafios para produção de azeite no Brasil. **Infobibos – informação tecnológica**. Artigo em Hypertexto. 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm> Acesso em: 26 de julho de 2012.

BESNARD, G.; KHADARI, B.; BARADAT, P.; Bervillé, A. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. **Theor Appl Genet**, v.104, p 1353–1361, 2002.

BESNARD, G.; BARADAT, P. H.; CHEVALIER, D.; TAGMOUNT, A.; BERVILLÉ, A. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. **Genet Resour Crop Evol**, v.48, p 165–182, 2001.

BESNARD, G.; BARADAT, P.; BERVILLE, A. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars, **Theor Appl Genet**, v.102(2–3), p 251–258, 2001b.

BESNARD, G.; BERVILLÉ, A. Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. **Life Sciences**, v.323, p 173–181, 2000.

BOTSTEIN, D; WHITE, RL; SKOLNICK, M; DAVIS, RW. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p 314–331, 1980.

BOUHAFIA, K.; MOUGHILI, L.; BOUCHOUFI, K.; DOUAÏK, A.; DAOUI, K. Nitrogen Fertilization of Olive Orchards under Rainfed Mediterranean Conditions. **American Journal of Experimental Agriculture**, v.4(8), p 890–901, 2014.

BRACCI, T. SEBASTIANI, L.; BUSCONI, M.; FOGHER, C.; BELAJ, A. SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. **Scientia Horticulturae**, v.122 (2), p 209–215, 2009.

BRACCI, T.; BUSCONI, M.; FOGHER, C.; SEBASTIANI, L. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. **Plant Cell Rep**, v.30, p 449–462, 2011.

BRETON, C.; PINATEL, C.; MEDAIL, F.; BONHOMMEA, F.; BERVILLÉ, A. Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. **Plant Sci**, v.175, p 524–532, 2008.

BRHADDA, N.; LOUDYI, D. M. W.; ABOUSALIM, A.; BENALI, D. Effet de latempérature et de l'endosperme surla dormance et la germination des embryons d'olivier *Olea europaea* L. variétéPicholine marocaine. **Agronomie**, v.20, p 643-653, 2000.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S; BRONDANI, R.V. Marcadores Microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p 46-50, 2003.

CABALLERO, J.M.; RÍO, C. Relaciones recíprocas patrón injerto em olivo. **Fruticultura Profissional**. Olivicultura II, v.88, p 6-13, 1997.

CAMPOS, S.D. **Marcadores moleculares de DNA microsatélite**. Disponível em: www.drashirleydecampos.com.br. Acesso em 11 de junho de 2013.

CAÑAS, L. A.; AVILA, J.; VICENTE, M.; BENBADIS, A. Micropropagation of Olive (*Olea Europaea* L.). **Biotechnology In Agriculture And Forestry High-Tech. and Micropropagation**, v.18, p 493-505, 1992.

CAÑAS, L. A.; BENBADIS, M. C. In vitro regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Oleaeuropaea* L.). **Plant Sci**, v.54, p 65, 1988.

CAÑAS, L.A.; CARRAMOLINO, L.; VICENTE, M. Vegetative propagation of the olive tree from in vitrocultured embrions.**Plant Science**, v.50, (1), p 85-90, 1987.

CANÇADO, G.M.; BRAGA, F.T.; SOUZA, R.A.V.; NUNES, C.F.; RIBEIRO, A.P.; SOARES, B.D.F. Cultivo in vitro da oliveira e suas aplicações. In: Oliveira, A.F. (Ed.). Oliveira no Brasil: tecnologias deprodução. Belo Horizonte: **EPAMIG**, p 275-310, 2013.

CANTINI, C.; CIMATO, A. Assessment of the Tuscan Olive Germplasm by Microsatellite Markers Reveals Genetic Identities and Different Discrimination Capacity among and within Cultivars. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v.133(4), p 598–604. 2008.

CARRIERO, F.; FONTANAZZA, G.; CELLINI, F.; GIORIO, G. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). **Theor Appl Genet**, v.104, p 301–307, 2002.

CARUSO, T.; MARRA, F. P.; COSTA, F.; CAMPISI, G.; MACALUSO, L.; MARCHESE, A. Genetic diversity and clonal variation within the main Sicilian olive cultivars based on morphological traits and microsatellite markers, **Scientia Horticulturae**, v.180, p 130–138, 2014.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHÁ, J. C.; MARTINEZ DE TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theor Appl Genet**, v.97, p 51–59, 1998.

CHIAPPETTA, A.; MUZZALUPO, I. Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, **Intech Open Science**, p 24-38, 2012.

CHOULIARAS, V.; TASIOULA, M.; CHATZISSAVVIDIS, C.; THERIOS, I.; TSABOLATIDOU, E. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 89, p 984–988, 2009.

CIMATO, A.; CANTINI, C.; SANI, G.; MARRANCI, M. Il germoplasma dell'Olivo in Toscana. **Ed. Regione Toscana**, 1993.

CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M. T.; MARCONI, R.; CIMATO, A.; TESTOLIN, R. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. **Theor Appl Genet**, v.104, p 223–228, 2002.

CONAB. Balança Comercial do Agronegócio. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/0206-balanca-importacao.pdf>> Acesso em: 21 de julho 2012.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL COI. Disponível em:<<http://www.internationaloliveoil.org/>>Acesso em 24 de março de 2015.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. Catálogo Mundial de Variedades de Olivo. AMV Ediciones, Madrid /ES, 360f, 2000.

COUTINHO, E. F. et al. Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). Embrapa Clima Temperado, Sistema de Produção, v.16, p 1-125, 2009.

CRISOSTO, C., SUTTER, E. G. Improving 'Manzanillo' Olive Seed Germination. **Hortscience**, v.20 (1), p 100-102. 1985.

D'ANGELI, S.; FALASCA, G.; MATTEUCCI, M.; ALTAMURA, M. M. Cold perception and gene expression differ in *Olea europaea* seed coat and embryo during drupe cold acclimation. **New Phytologist**, v.197, p 123–138, 2013.

D'IMPERIO, M.; VISCOSIC, V.; SCARANOD, M. T.; D'ANDREAD, M. S.; ZULLOA, B. A.; PILLA, F. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*)/ **Scientia Horticulturae**, v.130, p 229–240, 2011.

DE LA ROSA, R.; ANGIOLILLO, A.; GUERRERO, M.; PELLEGRINI, M.; RALLO, L.; BESNARD, G.; BERVILLÉ, A.; MARTIN, A.; BALDONI, L. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. **Theor Appl Genet**, v.106, p 1273–1282, 2003.

DE LA ROSA, R.; JAMES, C. M.; TOBUTT, K. R. Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and

their transferability to other genera in the Oleaceae. **Mol Ecol**, v.2, p 265–267, 2002.

DELOUCHE, J.C. Standardization of vigor tests. **Journal of Seed Technology**, v.1, p 75-85, 1976.

DÍAZ, A.; DE LA ROSA, R.; RALLO, P.; MUÑOZ-DÍEZ, C.; TRUJILLO, I.; BARRANCO, D.; MARTÍN, A.; BELAJ, A. Selections of an Olive Breeding Program Identified by Microsatellite Markers, **Crop Science**, v. 47, 2007.

DÍAZ, A.; MARTÍN, A.; RALLO, P.; DE LA ROSA, R. Cross-compatibility of the Parents as the Main Factor for Successful Olive Breeding Crosses. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v.132(6), p 830–835, 2007.

DÍAZ, A.; MARTÍN, A.; RALLO, P.; BARRANCO, D.; DE LA ROSA, R. Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' Olive Assessed by SSR Markers. **J. Amer. Soc. Hort Sci**, v.131 (2), p 250-255, 2006.

DÍEZ, C. M.; TRUJILLO, I.; MARTINEZ-URDIROZ, N.; BARRANCO, D.; RALLO, L.; MARFIL, P.; GAUT, B. S. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin, **New Phytologist**, 2014.

DONNELLY, D. J.; TISDALL, L. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: Ahuja, M. R. (Ed.). **Micropropagation of wood plants**, p 153-166, 1993.

EARL, DENT A. and VON HOLDT, BRIDGETT M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4 (2), p 359-361, 2012.

EL-SHAZLY, S.M.; ABDEL-NASSER, G. Response of Picual olive trees to potassium and boron fertigation. 2- Fruit set, yield, oil content, water use efficiency and fruit quality. **Journal of Advanced Agriculture Research** (Fac. Agric. Saba Basha), v.6 (3), p 651-669, 2001.

EL-SONBATY, M.R.; ABD EL-NABY, S.K.M.; HEGAZI, E.S.; SAMIRA, M.M.; EL-SHARONY T.F. Effect of Increasing Fertilization Levels on Alternate Bearing of Olive Cv. "Picual", **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.6(10), p 608-614, 2012.

EMATER, Associação Rio-Grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/servicos/informacoesagropecuarias.php#.VSz3_tzF9eY> Acesso em 13 de abril de 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultura da oliveira no sul do Brasil. Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2013/cultura-da-oliveira-no-sul-do-brasil>> Acesso em 30 de março de 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2015.

ERCISLI, S.; BARUT, E.; IPEK, A. Molecular characterization of olive cultivars using amplified fragment length polymorphism markers. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p 414-419, 2009.

ERRE, P.; CHESSA, I.; MUNÓZ-DIEZ, C.; BELAJ, A.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers, **Genet Resour Crop Evol**, v.57, p 41–54, 2010.

ESCOBAR, F. R. Fertilizaci3n del olivar. In: OLIVICULTURA: Jornadas Técnicas. Barcelona: **Fundaci3n “la Caixa”/Agro Latino**, p 55-63, 1994.

EVANNO, G; REGNAUT, S; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p 2611-2620. 2005.

EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. **Arlequin version 3.01**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, zoological institute, 2006.

EXCOFFIER, L; SMOUSE, PE; QUATTRO, JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p 479-491, 1992.

FABBRI, A.; HORMAZA, J, I.; POLITO, V, S. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **J Am Soc Hortic Sci**, v.120, p 538–542, 1995.

FAOSTAT (Food Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division).Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>Acesso em:21 de janeiro de 2016.

FENDRI, M.;FERREIRA, E.; CALADO, L.; ABREU, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; AMORIM, M. I.; ALCHÉ, J.D. Discrimination of Portuguese and Spanish olive cultivars using microsatellite markers. **Academia Journal of Agricultural Research**, v.2(3), p 58-61, 2014.

FENDRI, M.; TRUJILLO, I.; TRIGUI, A.; RODRIGUEZ-GARCIA, I. M.; DE DIOS, A. R. J. Simple sequence repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a Tusinian germplasm collection. **Hortscience**, v.45, p 1429–1436, 2010.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., et al. Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile.**European Journal of Agronomy**, v.31(4), p 223-232, 2009.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Fertilizaci3n. In: Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds.), El Cultivo del Olivo. **Mundi-Prensa**, p 299–336, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento-MA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN, p 15, 1996.

GANINO, T.; BEGHÈ, D.; VALENTI, S.; NISI, R.; FABBRI, A. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. **Genet Resour Crop Evol**, v.54, p 1531–1540, 2007.

GANINO, T.; BARTOLINI, G.; FABBRI, A. The classification of olive germplasma review. **J. Hort. Sci. Biotechnol**, v.81 (3), p 319–334, 2006.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of *mat_* (*Illex paraguariensis* A. St. -Hil. Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, v.84, p 647–656, 2000.

GEMAS, V.J.V.; ALMADANIM, M. C.; TENREIRO, R.; MARTINS, A.; FEVEREIRO, P. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. **Genet Resour Crop Evol**, v.51, p 501–511, 2004.

GLAUBITZ, JC. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p 309–310. 2004.

GOBBATO, C. Cultura da oliveira e noções sobre a industrialização das azeitonas. Porto Alegre: Centro, 118f, 1945.

GOMES, S.; MARTINS-LOPES, P.; LOPES, J.; GUEDES-PINTO, H. Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. **Plant Mol Biol Rep**, v.27, p 365–373, 2009.

GOMMERS, A.; THIRY, Y.; DELVAUX, B. Rhizospheric Mobilization and Plant Uptake of Radiocesium from Weathered Soils: I. Influence of Potassium Depletion. **Journal Environmental Quality**, v.34, p 2167–2173, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, v.1, p 183–260, 1998.

GUERRERO, A. Nueva Olivicultura. 5ª ed. **Mundi-Prensa Libros**. Madrid, 304f, 2003.

HAGAG, L. F.; SHANIN, M. F. M.; EL-MIGEED, M. M. M. Effect of NPK and Humic Substance Applications on Vegetative Growth of Egazy Olive Seedlings. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci**, v.11 (6), p 807–811, 2011.

HAMILTON, M.B.; PINCUS, E.L.; DIFIORE, A.; FLEISCHER, R.C. Universal Linker and Ligation Procedures for Construction of Genomic DNA Libraries Enriched for Microsatellites. **Biotechniques**, v.27, p 500-507, 1999.

HANCOCK, J. M. Simple sequences and the expanding genome. **BioEssays**, v.18, p 421–425, 1996.

HARTMAN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* species. **Plant Soil**, v.110, p 225–238, 1988.

HARTMANN, H.T., URIU, K., LILLELAND, O. Olive nutrition. In: Childers, N.F. (Ed.), **Temperate to Tropical Fruit Nutrition Hort. Publ. Rutgers Univ.** New Brunswick, N.J, p 252–261, 1966.

HERNÁNDEZ, P.; DE LA ROSA, R.; RALLO, L.; DORADO, G.; MARTIN, A. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. **Theor Appl Genet**, v.103, p 788–791, 2001.

HESS, J.; KADEREIT, W.; VARGAS, P. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs), and intersimple sequencerepeats (ISSRs). **Mol Ecol**, v.9, p 857–868, 2000.

HOELZEL, R.; HOELZEL, A. R. Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. **Paperback**, p. 468, 1998.

HOSSEINI-MAZINANI, M.; MARIOTTI, R.; TORKZABAN, B.; SHEIKH-HASSANI, M.; ATAIEI, S.; CULTRERA, N. G. M.; PANDOLFI, S.; BALDONI, L. High Genetic Diversity Detected in Olives beyond the Boundaries of the Mediterranean Sea, **PLOS ONE**, v.9, p 93-146, 2014.

HUSSEIN, A.H.A. Response of Manzanillo olive (*Olea europaea*, L.) cultivar to irrigation regime and potassium fertigation under Tabouk conditions, Saudi Arabia. **Journal of Agronomy**, v.7, p 285-296, 2008.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. Madrid, 2007. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.gov>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

INTERNATIONAL TRADE MAP. Disponível em: http://www.trademap.org/Product_SelCountry_TS.aspx Acesso em 16 de janeiro de 2016.

ISTANBOULI A.; NEVILLE, P. Etude de l'adormance des semences d'Olivier (*Olea europaea* L.). Mise en évidence d'une dormance embryonnaire. C.A. **Acad. Sci. Paris**, v.284, p 2503-2506, 1977.

JACOB, A.; CORDEIRO, T.; VAZ, A.; NASCIMENTO, M. J.; BERNARDINO, S.; FRAZÃO, R.; ARANHA, T.; FERREIRA, B.; SOUSA, J. In vitro clonal behavior of *Olea europaea* L., variety Galega vulgar. **Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém (UIIPS)**, 2013.

JAKOBSSON, M; ROSENBERG, NA. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v.23, p 1801-1806, 2007.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.V.; AYAD, W.G.; HODGKIN, T. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: A Guide to the Technologies. IPGRI Technical Bulletin (2). **International Plant Genetic Resources**, 1997.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, v.13, p 74-78, 1997.

KIRDMANEE, C.; KOZAI, T.; ADELBERG, J. Rapid acclimatization of in-vitro eucalyptus plantlets by controlling relative humidity ex vitro. **Acta Hort**, v.440, p 616, 1996.

LA MANTIA, M.; GUERIN, J.; SEDGLEY, M.; BARONE, E. Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers. **Actes Editions**, 2006.

LA MANTIA, M.; LAIN, O.; CARUSO, T.; TESTOLIN, R. SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. **J. Hort. Sci. Biotechnol**, v.80, p 628–632, 2005.

LACAPE, J. M.; DESSAUW, D.; RAJAB, M.; NOYER, J. L.; HAU, B. Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. **Mol Breed**, v.19, p 45–58, 2007.

LAGARDA, A.; MARTIN, G.C. 'Manzanillo' olive seed dormancy as influenced by exogenous hormone application and endogenous abscisic acid concentration. **Hort Science**, v.18, (6), p 869-871, 1983.

LAGARDA, A.; MARTIN, G.C.; KESTER, D.E. Influence of environment, seed tissue, and seed maturity on 'Manzanillo' olive seed germination. **Hort.Science**, v.18, (6), p 868-869, 1983a.

LAGARDA, A.; MARTIN, G.C.; POLITO, V.S. Anatomical and morphological development of 'Manzanillo' olive seed in relation to germination. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.108,(5), p 741-743, 1983b.

LAMBOY, W.F.; YU, J.; FORSLINE, P.L.; WEEDEN, N. F. Partitioning of allozyme diversity in wild populations of *Malus sieversii* L. and implications for germplasm collection. **J Am Soc Hortic Sci**, v.121, p 982–987, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Rima, 539f, 2000.

LAS CASAS, G.; SCOLLO, F.; DISTEFANO, G.; CONTINELLA, A.; GENTILE, A.; LA MALFA, S. Molecular characterization of olive (*Olea europaea* L.) Sicilian cultivars using SSR markers, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.57, p 15-19, 2014.

LAVEE, S. Por qué la necesidad de nuevas variedades de olivos? **Fruticultura Profesional**, v.62, p 29–37, 1994.

LEITÃO, F. Contributo para o conhecimento de cultivares de (*Olea Europaea*. L) quer sobre o aspecto de caracterização, quer da produtividade, determinante do seu valor económico. INIA. **Estação Agronómica Nacional, Oeiras**, 1988.

LEWONTIN, RC. The apportionment of human diversity. **Evol. Biol**, v.6, p 381-398, 1972.

LIÑÁN, J.; TRONCOSO, A.; RAPOPORT, F. Olive embryo development stage and the possibility of obtaining viable seedlings International Society for Horticultural **Science Acta Horticulturae**, v.474, p 75-78, 1999.

LINOS, A.; NIKOLOUDAKIS, N.; KATSIOTIS, A.; HAGIDIMITRIOU, M. Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.175, p 33–43, 2014.

LIU, K; MUSE, SV. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v.21 (9), p 2128-2129, 2005.

LOPES, M.S.; MENDONÇA, D.; SEFC, K. M.; GIL, F.S.; MACHADO, A. da C. Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. **Hort. Sci**, v.39, p 1562–1565, 2004.

LOUKAS, M.; KRIMBAS, C. B. History of olive cultivars based on their genetic distances. **J Hortic Sci**. v.58, p 121–127, 1983.

LUMARET, R.; AMANE, M.; OUZZANI, N.; BALDONI, L.; DEBAIN, C. Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild taxa of the genus *Olea* L. **Theor Appl Genet**, v.101, p 547–553, 2000.

LUMARET, R.; OUZZANI, N. Ancient wild olives in Mediterranean forests. **Nature**, v.413, p 700, 2001.

LUMARET, R.; OUZZANI, N.; MICHAUD, H.; VIVIER, G.; DEGUILLLOUX, M. F.; DI GIUSTO, F. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. **Heredity**, v.92, p 343–352, 2004.

MALEK, B. K.; MUSTAPHA, S. Response of Arbequina olive tree to reasonable fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v.8 (29), p 3911-3920, 2013.

MANGAL, M.; SHARMA, D.; SHARMA, M.; KUMAR, S. In vitro regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv Frantoio from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.52, p 912-916, 2014.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res**, v. 27, p 209-220, 1967.

MARDI, M.; ZEINALABEDINIA, M.; MOUSAVI-DERAZMAHALLEHB, S. M.; ZEINANLOOC, A. A.; MAJIDIAND, P.; KOLAH-ZONOOZIA, S. H.;

TASLIMPORE, M. R.; MASOOMI-MAJAREHF, S. A.; JAMGARDG, F. A.; MOSTAFAVIH, K. Commercial Iranian olive cultivars: morphological traits, molecular diversity, and genetic structure, **Horticultural by Science Biothecnology**, 2016.

MARRA, F. P.; MARCHESE, A.; CAMPISI, G.; GUZZETTA, G.; CARUSO, T. Intra-Cultivar Diversity in Southern Italy Olive Cultivars Depicted by Morphological Traits and SSR Markers **Acta Hort**, v.1057, 2014.

MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; MACRONI, R.; TESTOLIN, R.; CIMATO, A. Isolation and characterisation of microsatellite DNA in olive (*Olea europaea* L.), ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing, **Acta Horticulturae**, 2000.

MEKURIA, G. T.; COLLINS, G. G.; SEDGLEY, M. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. **J Hortic Sci Biotechnol**, v.74, p 309–314, 1999.

MESQUITA, H. A. de.; FRÁGUAS, J. C.; PAULA, M. B. DE. Adubação Química. Adubação e nutrição da oliveira. **EPAMIG Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, (231), 2006.

MINELLI, S.; MAGGINI, F.; GELATI, M. T.; ANGIOLILLO, A.; CIONINI, P. G. The chromosome complement of *Olea europaea* L. characterization by differential staining of the chromatin and in-situ hybridization of highly repeated DNA sequences. **Chromosome Research**, v.8, p 615–619, 2000.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M.; BHATIA, C. R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants, **Molecular Breeding**, v.3, (2), p 87-103, 1997.

MOOKERJEE, S.; GUERIN, J.; COLLINS, G.; FORD, C.; SEDGLEY, M. Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. **Theor Appl Genet**, v.111, p 1174–1182, 2005.

MORALES-SILLERO, A.; FERNÁNDEZ, J. E.; TRONCOSO, A. Response of Mature 'Manzanilla' Olive Trees to Different Doses of N-P-K Fertilizer Applied By Fertigation. **Acta Hort**, v.791.49, 2008.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J**, v.3, p 75–182, 1993.

MULEO, R.; MORGANTE, M.; VELASCO, R.; CAVALLINI, A.; PERROTTA, G.; BALDONI, L. Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Olive Tree Genomic. **Intech open science/open minds**, v.7, p 133-148, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p 473-497, 1962.

MUZZALUPO, I.; VENDRAMIN, G. G.; CHIAPPETTA, A. Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. **Scientific World Journal**, 12f, 2014.

MUZZALUPO, I.; Olive Germplasm – Italian Catalogue of Olive Varieties. **Agricultural Research Council** - Olive Growing and Oil Industry Research Centre, Rende (CS), 2012.

MUZZALUPO, I.; STEFANIZZI, F.; SALIMONTI, A.; FALABELLA, R.; PERRI, E. Microsatellite markers for identification of a group of Italian olive accessions. **Scientia Agricola**, v.66, p. 685-690, 2009.

MUZZALUPO, I.; SALIMONTI, A.; CARAVITA, M. A. ; PELLEGRINO, M.; PERRI, E. SSR markers for characterization and identification of cultivars of *Olea europaea* L. in the Abruzzo and Molise regions in south-central Italy. *Advances in Horticultural Science, Special Issue On Olive Breeding And Biotechnology*, **Horticultural Science**, v.22, (2) p 129-135, 2008.

NAVERO, D. B.; CIMATO, A.; FIORINO, P.; RALLO, L.; TOUZANI, A.; CASTAÑEDA, C.; SERAFIN, F.; TRUJILLO, I. World catalogue of olive varieties. **Consejo Oleicola Internacional**, 2000.

OLIVEIRA, A. F.; ALVES, M. J.; ABRAHÃO, E.; SILVA, L. F. O. Caracterização e proteção de cultivares. In: Oliveira, A. F (Ed). Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte: **EPAMIG**, p 251-274, 2012.

OLIVEIRA, A.F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A.; RINCÓN, C. R. Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. **Ciência Agrotecnológica**, v.27, (.2), p 332-338, 2003.

ORAGUZIE, N. C.; GARDINER, S. E.; BASSET, C. M.; STEFANATI, M.; BALL, R. D.; BUS, V. G. M.; WHITE, A.G. Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. **J Am Soc Hortic Sci**, v.126, p 318–328, 2001.

OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.89, p 3419-3423, 1992.

OUAZZANI, N.; LUMARET, R.; VILLEMUR, P.; GIUSTO, F. D. Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.).1. **Hered**, v.84, p 34-42, 1993.

PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: an enrichment protocol. **Biotechniques**, v. 26, p. 690-697, 1999.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Mol Ecol**, v.4, p 347–354. 1995.

PAULUS, E. **Avaliação do crescimento inicial de oliveira “arbequina” em diferentes manejos do solo e dosagens de fósforo**. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 83f, 2011.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**, v.1, p 215–222, 1996.

PREVOST, G.; BARTOLINI, G.; MESSERI, C. Italian olive cultivars and their synonyms. Menegazzo edition, 1993.

PRITCHARD, JK; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p 945-959. 2000.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: **Ceres**, 343f, 1991.

RALLO, L.; BARRANCO, D.; CASTRO-GARCÍA, S.; CONNOR, D. J.; GÓMEZ-DEL-CAMPO, M.; RALLO, P. High-density olive plantations. **Hortic Rev**, v.41, p 303–384, 2013.

RALLO, L.; CABALLERO, J. M.; DEL RIO, C.; MARTIN, A.; TOUS, J.; TRUJILLO, I. Variedades de olivo en España: una aproximación cronológica. (eds) Variedades de olivo en España. **Junta de Andalucía**, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, 2005.

RALLO, P. **Desarrollo y aplicación de microsatélites en olivo (*Olea europaea* L.)**. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, España, 2001.

RALLO, P.; DORADO, G.; MARTÍN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theor. Appl. Genet**, v.101, p 984–989, 2000.

RALLO, L.; CIDRAES, F. Mejora vegetal del olivo. **II Seminario Oleícola Internacional**. Ministerio de Agricultura, Madrid, p 26–43, 1978.

RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, v.12, p 113-118, 1991.

RIACH, E.M. **Técnicas de propagación y de acortamiento del periodo juvenil en el programa de mejora del olivo**. Tesis (Doctoral) Universidad de Córdoba, 121f, 2007.

RIBEIRO, H.; ABREU, I.; CUNHA, M.; MOTA, T.; CASTRO, R. Aeropalynological study of *Vitis vinifera* in the Braga region (1999–2003). **Aerobiologia**, v.21, p 131–138, 2005.

RODRIGUES, M.A.; FERREIRA, I.Q.; CLARO, A.M.; ARROBAS, M. Fertiliser recommendations for olive based upon nutrients removed in crop and pruning. **Scientia Horticulturae**, v.142, p 205-211, 2012.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2**. Setauket: Applied Biostatistics, 2005.

ROHLF, J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter. Software, 2001.

ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Mol Ecol**, v.4, p 137-138. 2004.

ROTONDI, A.; MAGLI, M.; RICCIOLINI, C.; BALDONI, L. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars, **Euphytica**, v.132, p 129–137, 2003.

ROTONDI, A.; MAGLI, M. Identificazione e classificazione di cultivar di olivo mediante analisi d'immagine. **Olivo & Olio**, v.10, p 34–38, 1999.

RUFAT, J.; VILLAR, J. M.; PASCUAL, M.; FALGUERA, V.; ARBONÉS, A. Productive and vegetative response to different irrigation and fertilization strategies of an Arbequina olive orchard grown under super-intensive conditions. **Agricultural Water Management**, v.144, p 33-41, 2014.

RUGINI, E.; DE PACE, C.; GUTIÉRREZ-PESCE P.; MULEO, R. *Olea*. In: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits, **Springer-Verlag**, p 79-114, 2011.

RUGINI, E.; FIDELI, E.O. Olive (*Olea europaea* L.) as an oil seed crop. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). Legumes and oilseed crops I. Berlin: **Springer-Verlag**, v.10, p 593-641, 1990.

RUGINI, E. In vitro culture of the olive: an overview of the present scientific status. **Acta Horticulturae**, v.286, p 93-96, 1990.

RUGINI, E. Olive (*Olea europaea* L.). In: Y.P.S Bajaj (Editor). Biotechnology in Agriculture and Forestry. I. Trees. **Springer**, p 253-267, 1986.

RUGINI, E. 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. **Scientia Horticulturae**, v.24, p 123–134, 1984.

SABINO GIL, F.; BUSCONI, M.; MACHADO, A. DA C.; FOGHER, C. Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. **Mol Ecol Notes**, v.6, p 1275–1277, 2006.

SANTOS, F. F. dos.; BANDEIRA, J. M. de.; MARINI, P.; MARTINS, A. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES, D. M. de. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **R. Bras. Biociências**, v.13, (3), p 130-133, 2015.

SANZ-CORTÈS, F.; BADENES, M, L.; PAZ, S.; INIGUEZ, A.; LLACER, G. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. **J Am Soc Hortic Sci**, v.126, p 7–12, 2001.

SARRI, V.; BALDONI, L.; PORCEDDU, A.; CULTRERA, N.G.M.; CONTENTO, A.; FREDIANI, M.; BELAJ, A.; TRUJILLO, I.; CIONINI, P.G. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to defined populations. **Genome**, v.49, p 1606–1615, 2006.

SAS Institute SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Estado Rio Grande do Sul, Disponível em: <http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/7166/?Secretaria_da_Agricultura_e_Pecu%C3%A1ria_realiza_semin%C3%A1rio_de_Olivicultura> Acesso em 13 de abril de. 2015.

SEFC, K. M.; LOPES, M. S.; MENDONÇA, D.; SANTOS, M. R. DOS.; MACHADO, M. L. DA C.; MACHADO, A. DA C. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. **Molecular Ecology**, v.9, p 1171–1193, 2000.

SENSI, E.; VIGNANI, R.; ROHDE, W.; BIRICOLTI, S. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. **Vitis**, v.35, p 183–188, 1996.

SOLERET, D., KOEHMSTEDT, A., ARADHYA, M.K., POLITO, V., PINNEY, K. Comparing the historic olive trees (*Olea europaea* L.) of Santa Cruz Island with contemporaneous trees in the Santa Barbara, CA area: a case study of diversity and structure in an introduced agricultural species conserved in situ. **Genet. Resour. Crop Evol**, v.57, p 973–984, 2010.

SOTOMAYOR-LEÓN, E.M.; CABALLERO, J.M. An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy. **Acta Horticulturae**, v.286, p 113-116, 1990.

SOUZA, R.A.V. et al. Efeito da luz na germinação in vitro de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Rev. Ceres**, v.59, (3), p 299-304, 2012.

SOUZA, R.A.V., BRAGA, F.T., NETO, J.V., MENDONÇA, E.A.F., AZEVEDO, P.H.; CANÇADO, G. M. A. Viabilidade e germinação de embriões de oliveira submetidos a diferentes condições de armazenamento de frutos. **Pesq. Agropec.Bras**, v.46 (3) p 309-314, 2011.

STAN, K.; DAVID, H. Producing Table Olives. **Landlinks Press**, 346f, 2007.

STEIN, L. **Genome annotation: from sequence to biology**. Nature Reviews/ Genetics, v.2, p 493-503, 2001.

STEINER, F.; PIVETTA, L. A.; CASTOLDI, G.; COSTA, M. S. S. DE M.; COSTA, L. A. DE M. Carbono orgânico e carbono residual do solo em sistema de plantio direto, submetido a diferentes manejos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6, (3), p 401-408, 2011.

SUPRA FERTILIZANTES, Disponível em: <http://www.casabugreind.com.br/> <Acesso em 10 de fevereiro de. 2016>.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. Isozymes in plant genetics and breeding. **Part A**. 516f, 1983.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, (16), p 6463–6471, 1989.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, v.322, p 652-656, 1986.

TERAMOTO, J. R. S.; BERTONCINI, E. I.; PRELA-PANTANO, A. Mercado dos Produtos da Oliveira e os Desafios Brasileiros. **Informações Econômicas**, v.43, (2), 2013.

TOSCANO, P.; GODINO, G.; BELFIORE, T.; Bricolli-Bati, C. Foliar Fertilization: a valid alternative for olive cultivar. **Acta Hortic**, v.20, p 594, 2002.

TOUS, J.; ROMERO, A. Variedades del Olivo. Fundación “La Caixa”, Barcelona, 1993.

TRUJILLO, I.; OJEDA, M. A.; NIEVES, M. U.; POTTER, D.; BARRANCO, D.; RALLO, L.; CONCEPCION, M. D. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. **Tree Genetics & Genomes**, v.10, p 141–155, 2014.

TRUJILLO, I.; OJEDA, M. A.; URDIROZ, N. M.; POTTER, D.; BARRANCO, D.; RALLO, L.; DIEZ, C. M. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. **Tree Genetics & Genomes**, 2013.

TRUJILLO, I.; RALLO, L.; ARUS, P. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. **J Am Soc Hortic Sci**, v.120, p 318–324, 1995.

TRUJILLO, I.; RALLO, L.; CARBONELL, E. A.; ASINS, M. J. Isoenzymatic variability of olive cultivars according to their origin. **Acta Hort**, v.286, p 137–140, 1990.

VERGARI, G.; PATUMI, M.; BARTOLOZZI, F.; FONTANAZZA, G. Utilizzo di marcatori RAPD per la discriminazione di varietà di olivo appartenenti alla popolazione varietale di ‘Frantoio’. **Olivae**, v.73, p 31–36, 1998.

VOYIATZIS, D. G. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. **Physiologia Plantarum**, v.95, p 444–448, 1995.

WAGNER, HW; SEFC, KM. 1999. Identity 1.0. **Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences**, Vienna. Disponível em: <<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>>. Acesso em Janeiro de 2016.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)n. (dGdT)n Polymorphisms. **Genomics**, v.7, p 524-530, 1990.

WEIR, B. S. Genetic Data Analysis II. **Sinauer**, Sunderland, MA, 1996.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure, **Evolution**, v.38, (6) p 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. **University of Chicago Press**, v 4, 590f, 1978.

XILOYANNIS, C.; CELANO, G.; PALESE, A. M.; DICHIO, B.; NUZZO, V. Mineral nutrient up take from the soil in irrigated olive trees, cultivar Coratina, over six years after planting. **Acta Horticulturae**, v.586, p 453-456, 2000.

YAP, IV; NELSON, RJ. **WinBoot**: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. 1996.

YEH, FC; YOUNG, RC; TIMOTHY, B; BOYLE, TBJ; YE ZH; et al. **Popgene**, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol Biol Biotech Center, University of Alberta, Canada. 1997.

YOU-CHUN, L.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p 2453-2465, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZARDOYA, R.; AROUHEIF, E.; MEYER, A. Evolution and orthology of hedgehog genes, **Elsevier Science**, v.12 (12), p 496-497, 1996.

ZOHARY, D., HOPF, M. **Domestication of Plants in the Old World**: The Original and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and Nile Valley, third ed.Oxford University Press, Oxford, 2000.

ZOHARY, D.; SPIEGEL-ROY, P. Beginnings of fruit growing in the oldworld. **Science**, v.187, p 319–327, 1975.

Considerações Finais

O cultivo *in vitro* de sementes sem endocarpo e embriões isolados reduziram o período de germinação em até cinco vezes, e podem ser utilizadas para o estabelecimento inicial de plantas em programas de melhoramento de olivas. As sementes íntegras ‘Arbequina’ semeadas *in vitro*, após sua aclimação em casa de vegetação não requerem os nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio recomendado para mudas.

O dendograma obtido a partir da matriz de similaridade genética UPGMA calculada pelo índice de Dice, utilizando os dados dos *loci* SSR, não foi capaz de distinguir os acessos agrupados por países, revelaram elevada relação genética no germoplasma de olivas do banco ativo da Embrapa Clima Temperado, possivelmente devido a maioria dos acessos terem a mesma origem (Europa e Oriente médio), indicando a coancestralidade das cultivares estudadas. O conjunto de marcadores escolhidos resultou como polimórficos, e tornou possível a caracterização de todos os acessos estudados.

O resultado da sumarização das matrizes morfológica qualitativa, quantitativa e molecular originou um dendrograma que separou os acessos por origem, confirmando a hipótese de que estes acessos de germoplasma de oliveiras da Embrapa tem uma base genética comum. Análises estas complementares, forneceram uma mais completa compreensão da diversidade disponível nestes acessos da coleção de oliveiras e, posteriormente, estas informações podem ser utilizadas para melhoramento da oliveira.

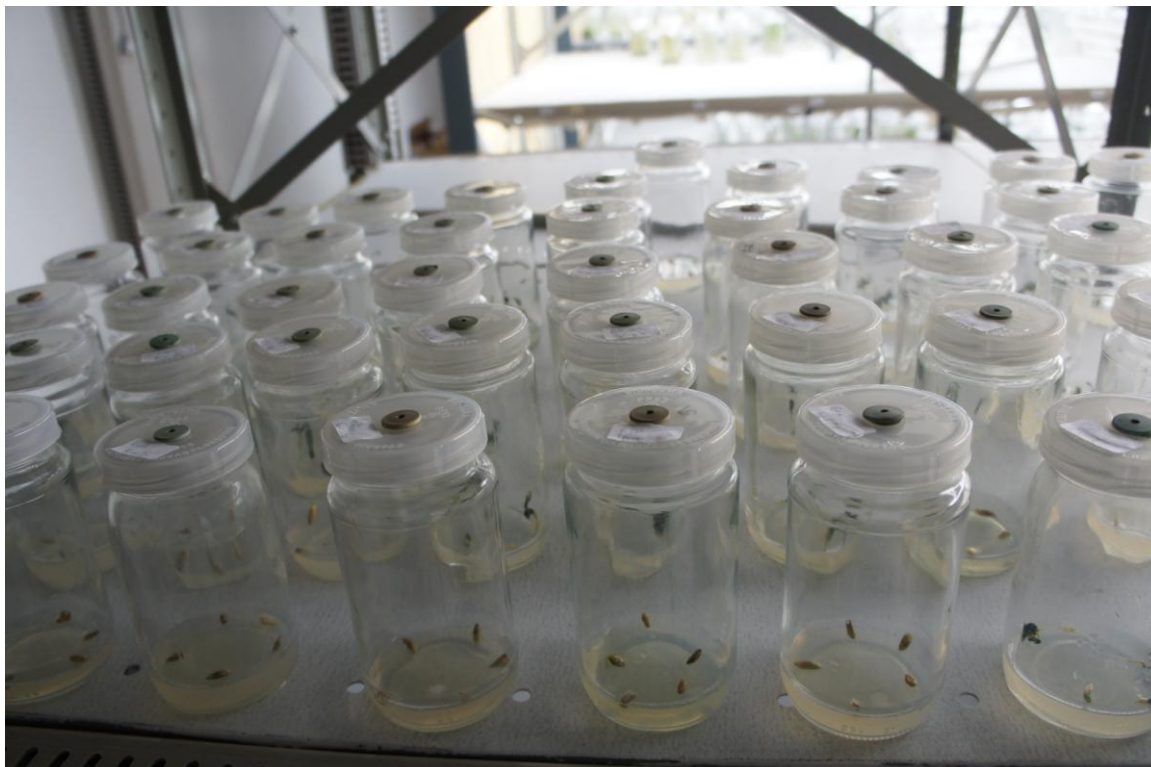
Apêndices



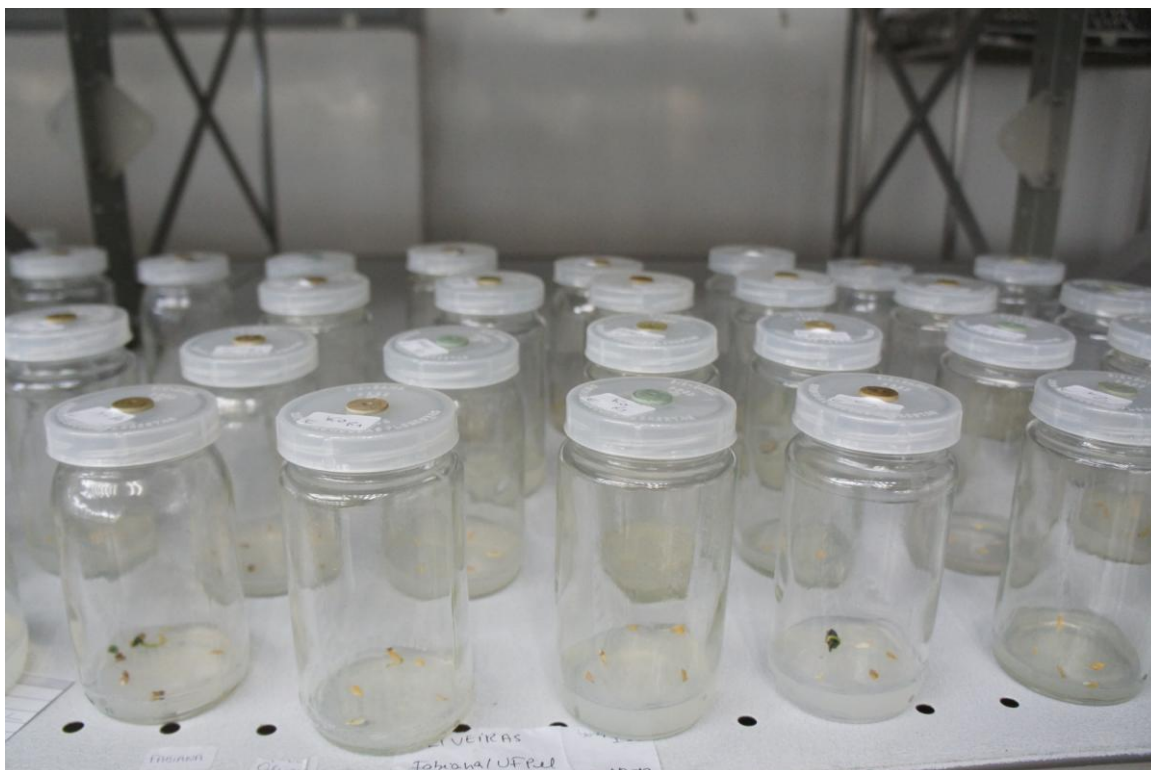
Apêndice 1 – Foto do experimento com sementes íntegras e sem endocarpo de *Olea europaea* L. cv. Arbequina em substrato, em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado.



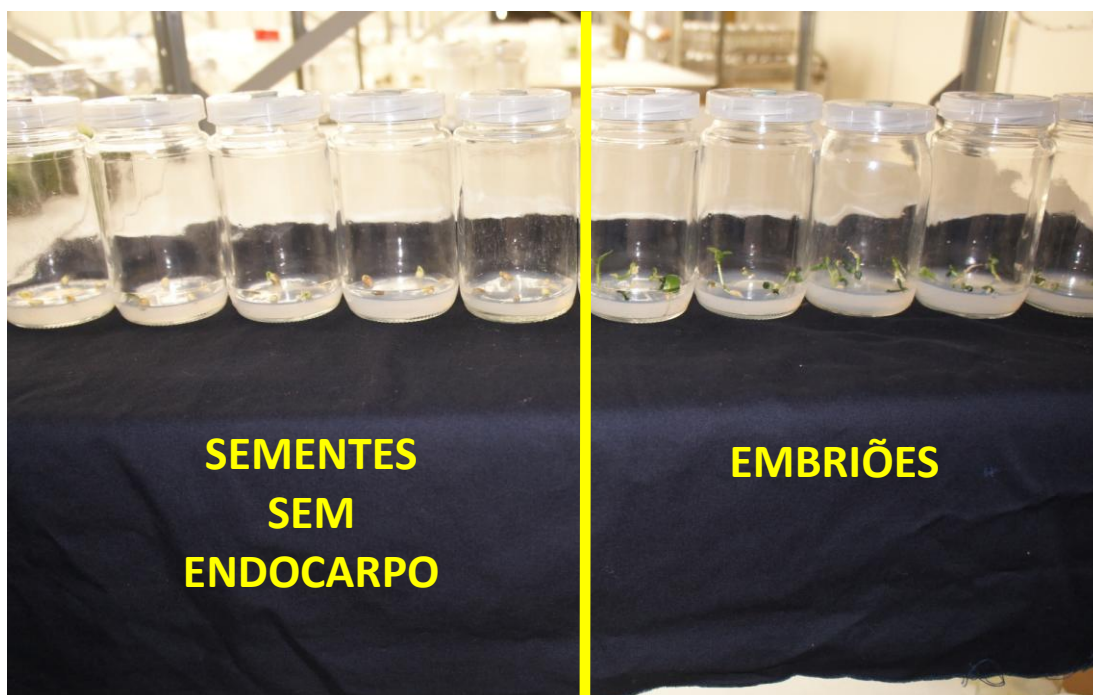
Apêndice 2 – Foto de plantas de *Olea europaea* L. cv. Arbequina originadas das 17 sementes sem endocarpo germinadas, em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado.



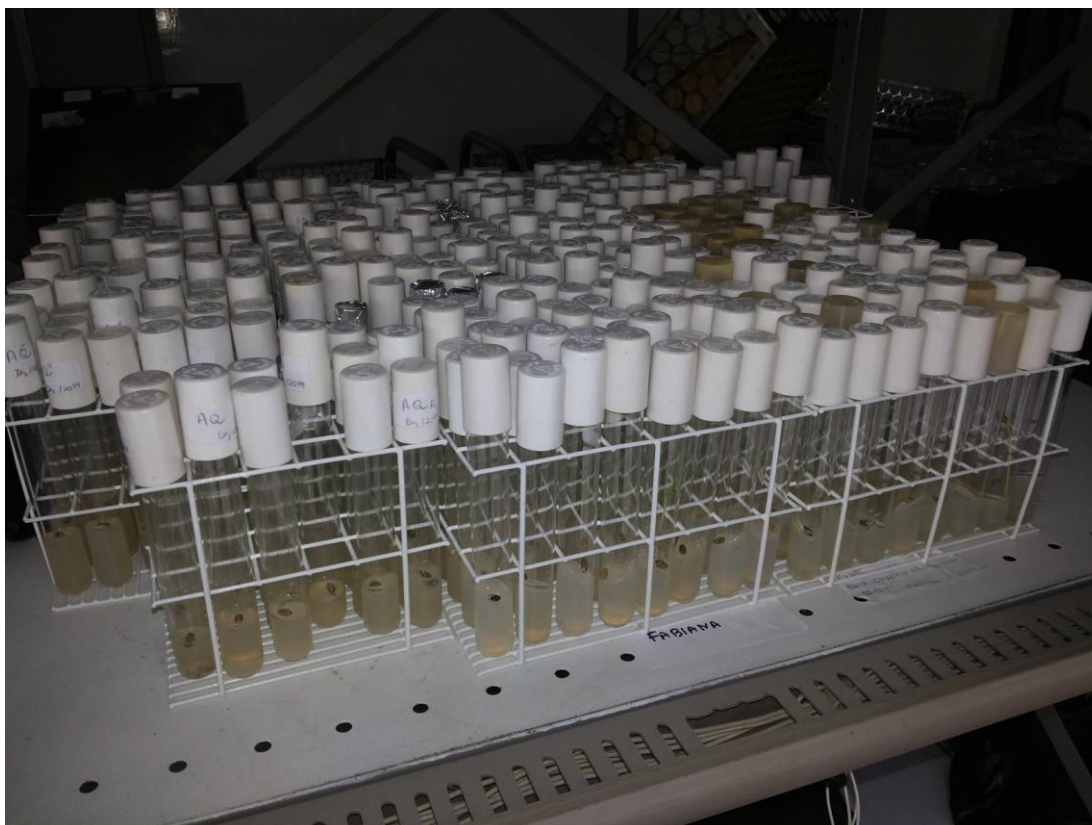
Apêndice 3 – Foto de frascos com sementes de *Olea europaea* L. cv. Arbequina, sem endocarpo, inoculadas em meio de cultivo MS, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado.



Apêndice 4 - Foto de frascos com embriões de *Olea europaea* L. cv. Arbequina inoculadas em meio de cultivo MS, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado.



Apêndice 5 – Experimento com sementes sem endocarpo e embriões de *Olea europaea* L. cv. Arbequina em meio MS, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado.



Apêndice 6 – Sementes sem endocarpo de *Olea europaea* L. cv. Arbequina em meio MS, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado.



Apêndice 7 – Mudas de *Olea europaea* L. cv. Arbequina retiradas do MS e lavadas em água destilada, na Embrapa Clima Temperado.



Apêndice 8 – Mudas de *Olea europaea* L. cv. Arbequina retiradas do MS, aclimatadas em substrato em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado.

Tabela 5. Parâmetros de variabilidade genética do grupo Espanha calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

Locus	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	18	3	2,22	0,87	0,35	0,55	0,00	1,00	0,45	0,30
SsrOeUA_279858	18	2	1,67	0,59	0,05	0,40	0,33	0,17	0,32	0,44
SsrOeUA_279860	18	3	2,76	1,06	0,02	0,64	0,61	0,04	0,57	0,20
SsrOeUA_279865	18	2	1,80	0,64	-0,08	0,44	0,56	-0,25	0,35	0,41
SsrOeUA_279867	18	3	2,91	1,08	0,23	0,66	0,28	0,58	0,58	0,19
SsrOeIGP3_386900	18	2	1,74	0,62	-0,05	0,42	0,50	-0,18	0,33	0,42
SsrOeIGP4_386901	18	4	2,60	1,14	0,21	0,62	0,28	0,55	0,57	0,20
SsrOeIGP9_386906	18	3	1,26	0,43	0,17	0,20	0,00	1,00	0,19	0,64
SsrOeIGP16_386913	18	3	1,18	0,34	0,09	0,16	0,06	0,64	0,15	0,72
SsrOeIGP18_418773	18	3	2,07	0,79	0,08	0,52	0,39	0,25	0,41	0,34
UDO99_004	18	3	1,78	0,78	0,30	0,44	0,00	1,00	0,40	0,36
UDO99_011	18	3	2,29	0,91	0,15	0,56	0,33	0,41	0,47	0,28
UDO99_019	18	3	1,88	0,82	0,21	0,47	0,17	0,64	0,42	0,33
UDO99_031	18	3	2,31	0,94	0,19	0,57	0,28	0,51	0,49	0,27
UDO99_039	18	4	2,66	1,12	0,32	0,62	0,11	0,82	0,56	0,21
IAS_oli06	18	3	2,18	0,89	0,32	0,54	0,06	0,90	0,46	0,29
IAS_oli11	18	3	2,03	0,85	0,30	0,51	0,06	0,89	0,44	0,31
IAS_oli12	18	3	2,45	0,99	0,09	0,59	0,44	0,25	0,52	0,23
IAS_oli17	18	4	2,76	1,14	0,02	0,64	0,61	0,04	0,57	0,20
IAS_oli22	18	3	1,41	0,56	0,22	0,29	0,00	1,00	0,27	0,53
Media	18	3	2,10	0,83	0,16	0,49	0,25	0,51	0,43	
Total	18	60	41,95							$1,17_e^{-010}$

(Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade

Tabela 6. Parâmetros de variabilidade genética do grupo Brasil calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

Locus	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	11	2	1,94	0,68	0,26	0,48	0,09	0,81	0,37	0,38
SsrOeUA_279858	11	2	1,42	0,47	0,09	0,30	0,18	0,39	0,25	0,54
SsrOeUA_279860	11	3	2,18	0,89	0,06	0,54	0,45	0,16	0,46	0,29
SsrOeUA_279865	11	2	1,54	0,54	0,06	0,35	0,27	0,22	0,29	0,48
SsrOeUA_279867	11	3	2,85	1,07	0,23	0,65	0,27	0,58	0,57	0,20
SsrOeIGP3_386900	11	2	1,94	0,68	-0,23	0,48	0,82	-0,69	0,37	0,38
SsrOeIGP4_386901	11	3	2,30	0,96	0,19	0,57	0,27	0,52	0,50	0,25
SsrOeIGP9_386906	11	3	2,05	0,86	0,34	0,51	0,00	1,00	0,44	0,31
SsrOeIGP16_386913	11	1	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
SsrOeIGP18_418773	11	2	1,54	0,54	0,19	0,35	0,09	0,74	0,29	0,48
UDO99_004	11	3	1,75	0,76	0,30	0,43	0,00	1,00	0,39	0,37
UDO99_011	11	3	2,28	0,92	0,13	0,56	0,36	0,35	0,48	0,28
UDO99_019	11	4	1,62	0,78	0,08	0,38	0,27	0,29	0,36	0,40
UDO99_031	11	3	2,12	0,91	0,05	0,53	0,45	0,14	0,47	0,28
UDO99_039	11	4	2,66	1,16	0,10	0,62	0,45	0,27	0,57	0,19
IAS_oli06	11	2	1,98	0,69	0,33	0,50	0,00	1,00	0,37	0,38
IAS_oli11	11	1	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
IAS_oli12	11	2	1,54	0,54	0,19	0,35	0,09	0,74	0,29	0,48
IAS_oli17	11	4	2,81	1,16	-0,05	0,64	0,73	-0,13	0,58	0,19
IAS_oli22	11	1	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Media	11	2,5	1,88	0,68	0,12	0,41	0,24	0,37	0,35	
Total	71	50	37,54							$6,20_e^{-009}$

(Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade

Tabela 7. Parâmetros de variabilidade genética do grupo Itália calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

Locus	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	29	3	2,25	0,89	0,31	0,56	0,07	0,88	0,46	0,29
SsrOeUA_279858	29	2	1,79	0,63	0,04	0,44	0,38	0,14	0,34	0,41
SsrOeUA_279860	29	3	2,81	1,07	0,06	0,64	0,55	0,14	0,57	0,20
SsrOeUA_279865	29	2	1,62	0,57	-0,10	0,38	0,52	-0,35	0,31	0,45
SsrOeUA_279867	29	3	2,12	0,89	0,26	0,53	0,14	0,74	0,46	0,29
SsrOelGP3_386900	29	2	1,92	0,67	-0,07	0,48	0,59	-0,22	0,36	0,39
SsrOelGP4_386901	29	4	2,47	1,05	0,18	0,60	0,31	0,48	0,52	0,23
SsrOelGP9_386906	29	4	1,82	0,89	0,31	0,45	0,00	1,00	0,42	0,33
SsrOelGP16_386913	29	3	1,28	0,44	0,09	0,22	0,10	0,53	0,20	0,62
SsrOelGP18_418773	29	3	2,73	1,05	0,16	0,63	0,38	0,40	0,56	0,21
UDO99_004	29	3	1,32	0,45	0,14	0,24	0,07	0,72	0,22	0,60
UDO99_011	29	3	1,96	0,82	0,19	0,49	0,21	0,58	0,42	0,33
UDO99_019	29	4	1,94	0,86	0,07	0,48	0,38	0,22	0,43	0,32
UDO99_031	29	3	1,98	0,86	0,17	0,49	0,24	0,51	0,44	0,31
UDO99_039	29	4	2,16	1,00	0,30	0,54	0,07	0,87	0,49	0,26
IAS_oli06	29	4	2,49	1,03	0,29	0,60	0,14	0,77	0,52	0,24
IAS_oli11	29	2	1,89	0,66	0,32	0,47	0,00	1,00	0,36	0,39
IAS_oli12	29	2	2,00	0,69	0,06	0,50	0,41	0,17	0,37	0,38
IAS_oli17	29	4	2,73	1,10	0,09	0,63	0,48	0,24	0,57	0,20
IAS_oli22	29	2	1,15	0,25	0,11	0,13	0,00	1,00	0,12	0,77
Media	29	3	2,02	0,79	0,15	0,48	0,25	0,49	0,41	
Total	29	60	40,41							3,36 ⁻⁰¹⁰

(Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade

Tabela 8. Parâmetros de variabilidade genética do grupo Portugal calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

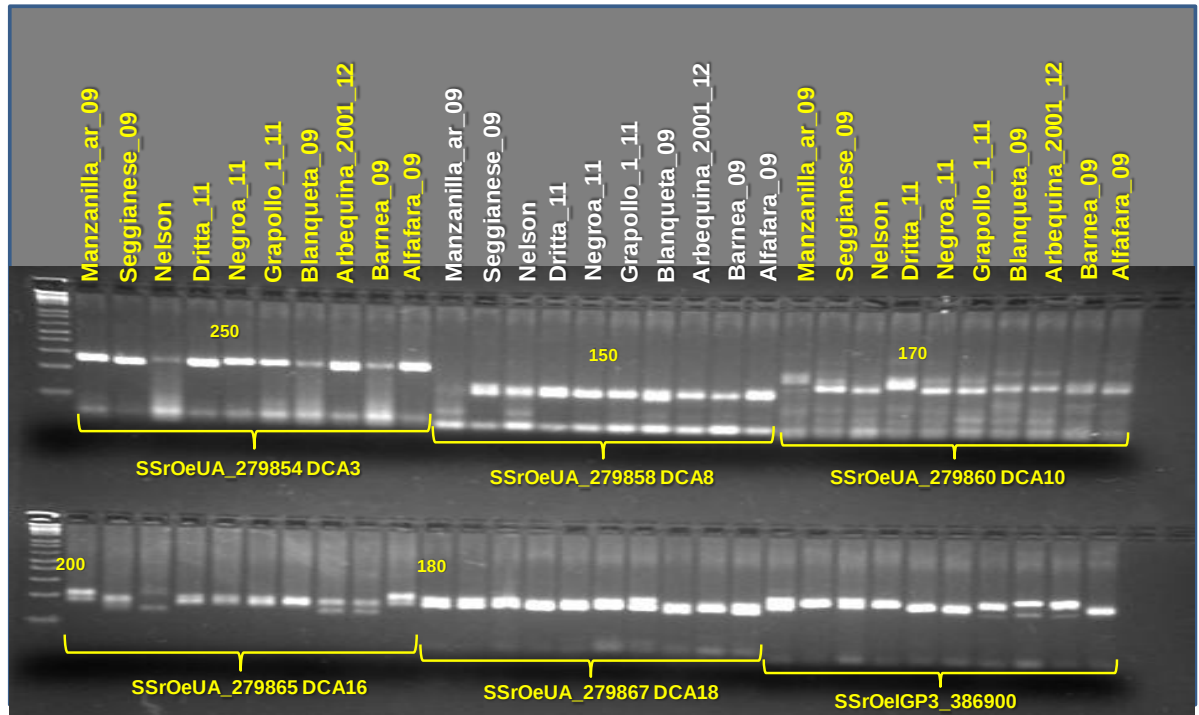
Locus	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	7	3	2,09	0,89	0,25	0,52	0,14	0,73	0,46	0,29
SsrOeUA_279858	7	2	1,69	0,60	0,09	0,41	0,29	0,30	0,32	0,43
SsrOeUA_279860	7	3	2,09	0,89	-0,03	0,52	0,57	-0,10	0,46	0,29
SsrOeUA_279865	7	2	1,96	0,68	0,14	0,49	0,29	0,42	0,37	0,38
SsrOeUA_279867	7	2	1,96	0,68	0,33	0,49	0,00	1,00	0,37	0,38
SsrOelGP3_386900	7	2	1,85	0,65	0,02	0,46	0,43	0,07	0,35	0,40
SsrOelGP4_386901	7	2	1,51	0,52	0,15	0,34	0,14	0,58	0,28	0,50
SsrOelGP9_386906	7	3	1,81	0,80	0,31	0,45	0,00	1,00	0,41	0,35
SsrOelGP16_386913	7	4	2,88	1,20	0,22	0,65	0,29	0,56	0,60	0,17
SsrOelGP18_418773	7	2	1,96	0,68	0,33	0,49	0,00	1,00	0,37	0,38
UDO99_004	7	2	1,69	0,60	0,29	0,41	0,00	1,00	0,32	0,43
UDO99_011	7	2	1,96	0,68	0,14	0,49	0,29	0,42	0,37	0,38
UDO99_019	7	2	1,32	0,41	-0,03	0,24	0,29	-0,17	0,21	0,60
UDO99_031	7	3	2,00	0,83	0,05	0,50	0,43	0,14	0,43	0,32
UDO99_039	7	4	3,27	1,28	0,07	0,69	0,57	0,18	0,64	0,15
IAS_oli06	7	3	1,56	0,66	0,16	0,36	0,14	0,60	0,33	0,44
IAS_oli11	7	2	1,96	0,68	0,33	0,49	0,00	1,00	0,37	0,38
IAS_oli12	7	2	1,85	0,65	0,02	0,46	0,43	0,07	0,35	0,40
IAS_oli17	7	4	3,27	1,28	0,07	0,69	0,57	0,18	0,64	0,15
IAS_oli22	7	1	1	0	0	0	0	--	0,00	1
Media	7	2,5	1,98	0,73	0,14	0,46	0,24	0,45	0,38	
Total	7	50	39,67							1,07 ⁻⁰⁰⁹

(Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade

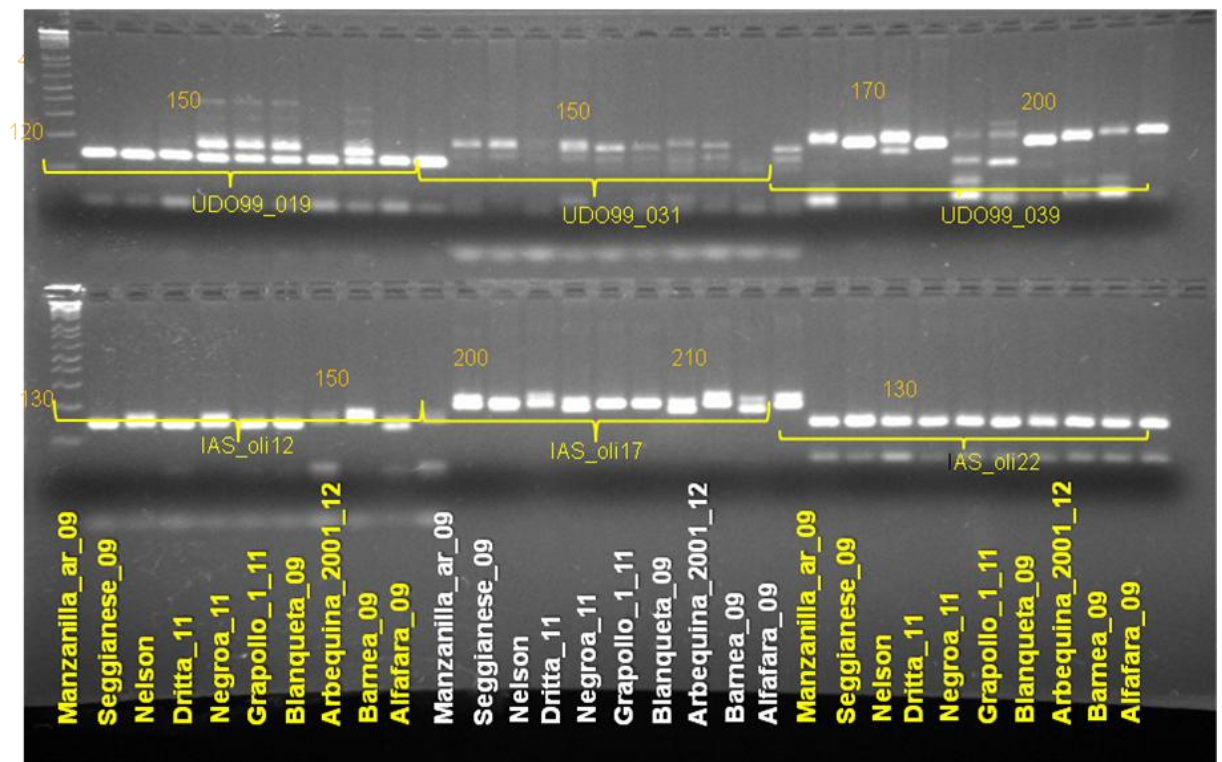
Tabela 9. Parâmetros de variabilidade genética do grupo Outros calculados para 20 *loci* SSR em 72 acessos de oliveira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2016.

Locus	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
SsrOeUA_279854	6	2	2	0,69	0,33	0,50	0,00	1,00	0,36	0,38
SsrOeUA_279858	6	2	1,6	0,56	-0,09	0,38	0,50	-0,33	0,33	0,46
SsrOeUA_279860	6	3	1,95	0,82	-0,12	0,49	0,67	-0,37	0,47	0,33
SsrOeUA_279865	6	2	2	0,69	0,11	0,50	0,33	0,33	0,36	0,38
SsrOeUA_279867	6	3	2,28	0,90	0,27	0,56	0,14	0,75	0,48	0,29
SsrOeIGP3_386900	6	2	2	0,69	-0,33	0,50	1,00	-1,00	0,38	0,38
SsrOeIGP4_386901	6	4	3,6	1,33	0,03	0,72	0,67	0,08	0,65	0,13
SsrOeIGP9_386906	6	3	2,58	1,00	0,38	0,61	0,00	1,00	0,54	0,23
SsrOeIGP16_386913	6	1	1	0	0	0	0	--	0,00	1
SsrOeIGP18_418773	6	3	1,95	0,82	0,10	0,49	0,33	0,31	0,47	0,33
UDO99_004	6	2	1,32	0,41	0,20	0,24	0,00	1,00	0,24	0,60
UDO99_011	6	3	2	0,83	0,24	0,50	0,14	0,71	0,46	0,32
UDO99_019	6	3	1,78	0,76	0,11	0,44	0,29	0,35	0,27	0,37
UDO99_031	6	2	1,8	0,64	0,31	0,44	0,00	1,00	0,36	0,41
UDO99_039	6	3	2,18	0,89	0,24	0,54	0,17	0,69	0,49	0,29
IAS_oli06	6	2	1,8	0,64	0,31	0,44	0,00	1,00	0,36	0,41
IAS_oli11	6	2	1,18	0,29	-0,01	0,15	0,17	-0,09	0,16	0,73
IAS_oli12	6	3	2,18	0,89	0,03	0,54	0,50	0,08	0,47	0,29
IAS_oli17	6	4	3,43	1,29	-0,07	0,71	0,83	-0,18	0,67	0,14
IAS_oli22	6	2	1,8	0,64	0,31	0,44	0,00	1,00	0,36	0,41
Media	6	2,6	2,02	0,74	0,12	0,46	0,29	0,37	0,39	
Total	6	51	40,43							9,45 ₀₁₀ e ⁻

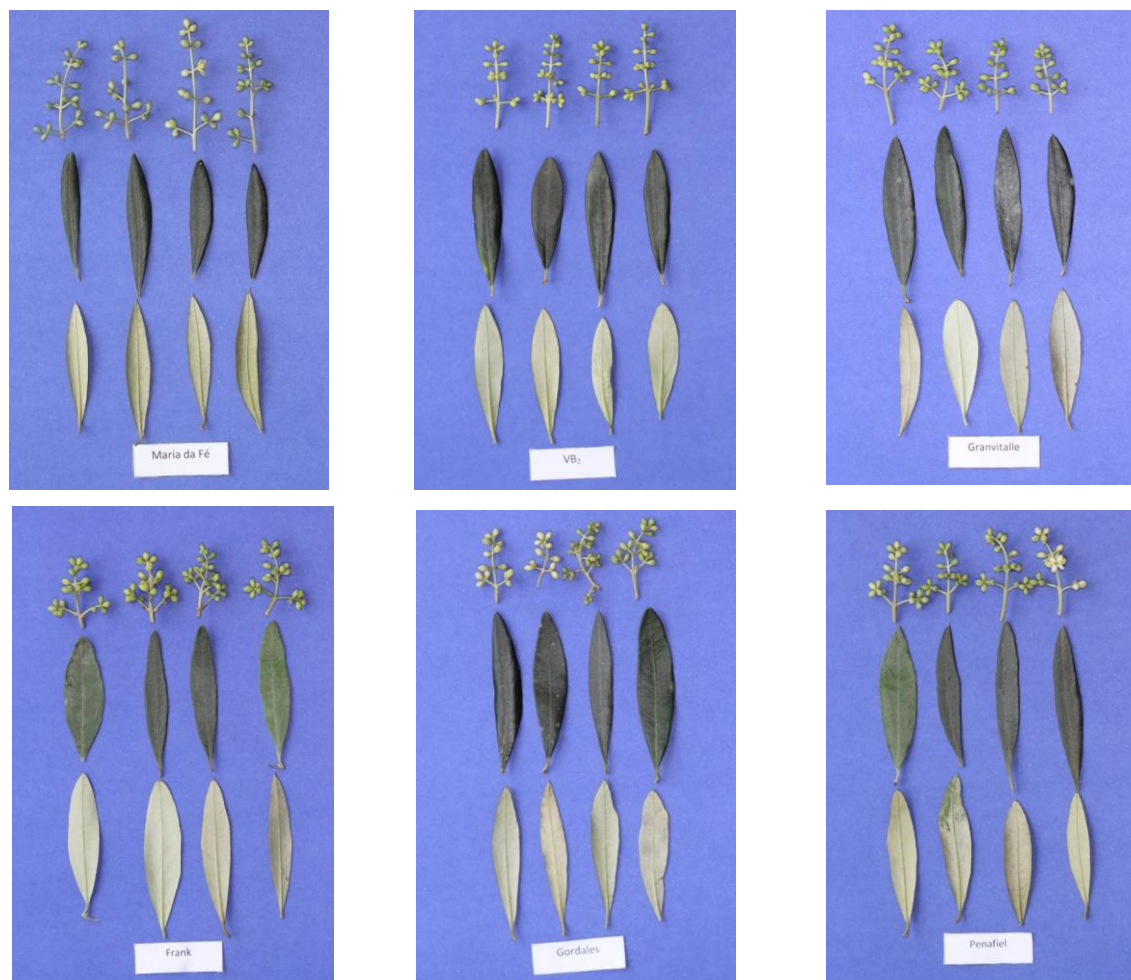
(Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade



Apêndice . Perfil eletroforético obtido pela avaliação dos loci SSrOeUA_279854 DCA3, SSrOeUA_279858 DCA8, SSrOeUA_279860 DCA10, SSrOeUA_279865 DCA16, SSrOeUA_279867 DCA18, SSrOeIGP3_386900 acessos da coleção de oliveiras avaliados neste estudo. * Tamanho do alelo em pares de bases (pb).



Apêndice . Perfil eletroforético obtido pela avaliação dos loci UDO99_019, UDO99_031, UDO99_039, IAS_oli12, IAS_oli17, IAS_oli22 acessos da coleção de oliveiras avaliados neste estudo. * Tamanho do alelo em pares de bases (pb).



Apêndice 11 .Caracteres morfológicos avaliados no órgão folha e flor dos acessos da coleção de oliveiras avaliados neste estudo.