



AURINETE DAIENN BORGES DO VAL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OLIVEIRA
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

LAVRAS - MG

2011

AURINETE DAIENN BORGES DO VAL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OLIVEIRA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Val, Aurinete Daienn Borges do.

Caracterização genética de oliveira utilizando marcadores
moleculares / Aurinete Daienn Borges do Val. – Lavras : UFLA,
2011.

100 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Azeitona. 2. *Olea europaea* L. 3. SSR. 4. Microssatélites. 5.
Probabilidade de identidade. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 634.6323

AURINETE DAIENN BORGES DO VAL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OLIVEIRA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2011.

Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado	EPAMIG
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dr. Adelson Francisco de Oliveira	EPAMIG
Dr. Juliano Lino Ferreira	PNPD/CAPES/EPAMIG

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG
2011

A Deus,

Pelo amor incondicional e presença diária na minha vida.

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Bernardo José do Val e Maria do Carmo Borges do Val,

Aos meus irmãos, Aurideia e Ronaldo

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Artur e Otto.

Pelo amor, apoio e confiança.

DEDICO

Aos meus amigos,

pela torcida.

AGRADEÇO

Aos agricultores brasileiros,

MINHA HOMENAGEM.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura – Programa de pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Moacir Pasqual pela orientação recebida, amizade, estímulo e confiança em mim depositados. Saiba que admiro seu otimismo, assertividade e competência profissional.

Ao Pesquisador Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado pela co-orientação, pelos ensinamentos, ajuda, crítica e sugestões, que possibilitaram a realização do trabalho. Obrigada pela amizade, confiança e cordialidade prestadas a mim quando cheguei à cidade de Caldas.

À Pesquisadora Dra. Bárbara Dantas Fontes Soares pelos ensinamentos e sugestões no decorrer deste trabalho. Obrigada pela amizade e companheirismo.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, e em especial ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado na Fazenda Experimental de Caldas, Minas Gerais que forneceu todas as condições necessárias para realização deste trabalho.

Ao Dr. Pesquisador João Vieira Neto pelos ensinamentos sobre a cultura da oliveira.

Aos pesquisadores e técnicos do Núcleo Tecnológico EPAMIG Azeite e Azeitona em Maria da Fé, Minas Gerais pelo fornecimento de frutos de oliveira e orientação no uso dos acessos do germoplasma dessa espécie.

Ao Dr. Juliano Lino Ferreira pela importante participação e ajuda na execução deste trabalho, assim como por todos os ensinamentos.

Aos Doutores Adelson Francisco de Oliveira e João Bosco dos Santos, pelos ensinamentos e pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

À minha família, que é o pilar em que sustento toda minha vida. Meu amor eterno.

À Verônica, Simone, Néia e Dalíhia pela amizade, alegria e ajuda em momentos difíceis que passei durante o curso.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Ana Paula, Andressa, Alisson, Bruna, Evaldo, Hermínio, Franciane, Gustavo Freitas, Monique, Rafaeli e Sâmara, pelos momentos de alegria, pela convivência saudável e preciosa ajuda.

Aos laboratoristas Vantuil, pelo conhecimento e entretenimento; Claret, pela bondade e carinho.

A todos os colegas do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, doutorandos, mestrandos e estagiários por tornarem meu trabalho mais agradável e promissor. De forma especial à Catarina, Thais, Thati, Leila, Rafinha e Filipe.

À Marli, pela ajuda e presteza.

À Carol, Maritê, Claudia, D.Iza. Sr. Achson, D. Dita, Margarete, Paulo, César, amigos e funcionários da EPAMIG de Caldas, pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos amigos da cidade de Teresina-PI, minha terra natal. De forma especial à Adriana, Janina, Neide, Lúcio Flavo e Diolino.

Ao Pesquisador Dr. Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza (*In memoriam*), que me ajudou muito ao longo da minha vida acadêmica e profissional.

A todos que de forma direta ou indireta, auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O Brasil, grande importador de azeite e de azeitona, possui enorme potencial para o cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.). Entretanto, ainda são poucas as informações disponíveis a respeito do comportamento produtivo da espécie em condições locais e pouco se conhece sobre o potencial de produção e de crescimento, bem como da origem, identificação e caracterização genética das variedades que são atualmente cultivadas no País. Nesse estudo, foi efetuada a caracterização e identificação genética de acessos de germoplasma e material propagativo de oliveira proveniente de diferentes origens geográficas com o auxílio de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Inicialmente, foram utilizados 12 microssatélites para caracterização de 60 acessos de oliveira pertencentes ao Banco de Germoplasma de Oliveira da EPAMIG. Os marcadores utilizados foram: GAPU 12, UDO99-031, UDO99-039, GAPU 101, GAPU 59, GAPU 11 e 17, UDO99-009, UDO99-019, GAPU 45, GAPU 71 A, GAPU 71 B e GAPU 89. Como resultado obteve-se a divisão da população avaliada em quatro grupos distintos (*Bayesiano*) e uma Probabilidade de Identidade (PI) igual a $1,51 \times 10^{-10}$, o que demonstrou a grande eficiência dos marcadores para a diferenciação das cultivares analisadas. Os microssatélites usados também identificaram cultivares sinônimos e possíveis erros de denominação ou a possibilidade de mutações nos genótipos amostrados. Numa segunda etapa do trabalho, foi realizada a identificação genética (“DNA fingerprinting”) de oito genótipos de oliveira supostamente pertencentes ao cultivar ‘Arbequina’ fornecidos pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada – CATI. Utilizaram-se nove marcadores microssatélites (GAPU 101, GAPU 59, GAPU 89, GAPU 59, GAPU 71-A, GAPU 71-B, UDO99-009, UDO99-019, UDO99-036 e UDO99-039) e constatou-se que os genótipos de oliveira testados realmente pertencem a cultivar ‘Arbequina’, com uma Probabilidade de Identidade (PI) igual a $2,9 \times 10^{-3}$ e Probabilidade de Exclusão (PE) igual a 0,86.

Palavras-chave: Oliveira. Marcadores microssatélites. SSR. Identidade genética. Recursos genéticos.

ABSTRACT

Brazil, an important importer of olive oil and olive fruits, has a huge potential for the commercial cultivation of olive trees (*Olea europaea* L.). However, there is almost no information available about the best kind of growth technology for domestic environmental. Furthermore, little is known about the origin, the identification, and genetic characterization of varieties cultivated in Brazil. This study analyzed the characterization and genetic identity of olive cultivars from different geographical locations by using microsatellite markers (SSR). First, 12 SSR markers were used to characterize 60 olive accessions belonging to the Germplasm Bank of EPAMIG. The markers used were: GAPI 12, UDO99-031, UDO99-039, GAPI 101, GAPI 59, GAPI 11 and 17, UDO99-009, UDO99-019, GAPI 45, GAPI 71 A, GAPI 71 B, and GAPI 89. The results obtained showed the division of all genotypes assessed into four distinct Bayesian groups as well as a Probability of Identity (PI) of 1.51×10^{-10} , indicating great efficiency of these markers for genotype differentiation. The SSR markers have also allowed the identification of synonyms due possible errors in designation or even due mutations in some of the accessions evaluated. Moreover, at a second part of this work, we did a genetic fingerprinting of eight genotypes provided by Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada – CATI to check if they belong to the olive cultivar 'Arbequina'. For this purpose, it was used nine SSR markers (GAPI 101, GAPI 59, GAPI 89, GAPI 59, GAPI 71-A, GAPI 71-B, UDO99 -009, UDO99-019, UDO99-036 and UDO99-039) and the results indicate that the genotypes evaluated belong to the olive cultivar 'Arbequina' with a probability of identity (PI) equal to 2.9×10^{-3} and a probability of exclusion (PE) of 0.86.

Keywords: Olive. Microsatellite markers. SSR. Genetic identity. Genetic resources.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução Geral.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
	REFERENCIAS.....	18
	CAPÍTULO 2: Caracterização e estruturação genética de germoplasma de oliveira utilizando marcadores microssatélites.....	23
1	INTRODUÇÃO.....	26
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1	Materiais vegetais.....	30
2.2	Extração de DNA.....	34
2.3	Análises com marcadores microssatélites.....	35
2.4	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.....	39
2.5	Análises dos dados.....	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1	Análise dos marcadores microssatélites.....	42
3.2	Análise da diversidade genética.....	46
3.3	Análise dos cultivares sinônimos.....	62
4	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE.....	75
	CAPÍTULO 3: Aplicação de marcadores microssatélites na identificação genética de uma cultivar de oliveira.....	79
1	INTRODUÇÃO.....	82
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Material vegetal.....	85
2.2	Extração de DNA.....	85
2.3	Análises com marcadores microssatélites.....	87
2.4	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.....	90
2.5	Análises dos dados.....	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4	CONCLUSÃO.....	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS	98

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A oliveira, uma importante espécie arbórea da Bacia do Mediterrâneo, pertencente à família *Oleaceae*, ao gênero *Olea*, à espécie *Olea europaea* e à subespécie *Olea europaea* susp. *europaea*. Na região mediterrânea é possível encontrar tanto a oliveira selvagem (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) quanto a oliveira cultivada (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) (BRETON et al., 2009).

O gênero *Olea* abriga ainda outras cinco subespécies: *Olea europaea* susp. *cuspidata*, *Olea europaea* susp. *maroccana*, *Olea europaea* susp. *laperrinei*, *Olea europaea* susp. *cerasiformis* e *Olea europaea* susp. *guanchica*. Além da região Mediterrânea no continente europeu, a espécie *Olea europaea* L. também encontra-se difundida na Ásia, África e ilhas do Oceano Índico (BELAJ et al., 2007; BRETON et al., 2009; HANNACHI et al., 2009). Recentemente essa cultura se difundiu para os demais continentes, sendo cultivada também na Austrália, América do Norte e América do Sul.

De maneira geral, a planta possui copa de formato arredondado, com o porte, densidade da copa e cor da madeira variando em função da cultivar, condições ambientais, manejo de poda e condução das mesmas. O tamanho das folhas, textura e comprimento dos entrenós variam de acordo com a fase fenológica da planta, que apresenta folhas mais curtas, grossas e com a distância dos entrenós menor na fase juvenil. Na fase reprodutiva, a planta adulta apresenta inflorescência do tipo rácimo. Trata-se de uma espécie de clima temperado quente, mas que necessita de baixas temperaturas no período pré-floração (OLIVEIRA; RIO RINCON, 2007; VIEIRA NETO et al., 2008).

O cultivo, uso e valor econômico da oliveira cultivada (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) tem persistido e evoluído com as civilizações do Mediterrâneo à medida que contribui com um importante papel nas economias

locais. A produção de oliveira no mundo usa mais de 1.275 cultivares, sendo que a maioria trata-se de cultivares de origem européia (ROUBOS; MOUSTAKAS; ARAVANOPOULOS, 2009). Além do consumo da oliveira como fruta de mesa, o azeite extraído da fruta é uma importante *commodity* tanto para o mercado interno como para o mercado internacional, graças ao grande volume exportado pelos principais países produtores, dentre os quais estão a Espanha, Itália, Grécia, Turquia, Tunísia, Marrocos, Síria e Portugal como os responsáveis por mais de 95% da produção mundial (DUNDAR; SUAKAR, 2010; IPEK et al., 2009).

Trata-se de uma espécie diplóide ($2n = 2x = 46$), com a maioria das cultivares auto-incompatíveis. As flores possuem pétalas brancas, geralmente são hermafroditas, porém algumas cultivares possuem flores macho-estéreis, enquanto outras apresentam apenas flores estaminadas. Trabalhos de genotipagem de sementes de oliveira mostraram que a maioria delas é oriunda de polinização cruzada, embora ocorra uma pequena porcentagem de descendentes que surge a partir de autofecundação, mesmo quando uma cultivar é considerado auto-incompatível (DOVERI et al., 2008; RONY et al., 2009; TAAMALI et al., 2006).

A polinização aberta, a longevidade da espécie e a capacidade das oliveiras para sobreviver por longo tempo sem manejo adequado tornaram a espécie resistente à erosão genética, o que promoveu a preservação de sua ampla biodiversidade. Tamanha diversidade genética ocasionou algumas desvantagens no que se refere ao manejo e identificação de material vegetal (ALBA et al., 2009; DI DONNA et al., 2010; IPEK et al., 2009; SESLI; YEGENOGLU, 2010; TAAMALI et al., 2006).

O mercado consumidor brasileiro é considerado o maior importador de azeite de oliva da América do Sul e possui grande importância para a olivicultura chilena, uma vez que 63% do total da exportação de azeitona de

mesa do Chile destina-se ao Brasil (MASQUIMILLAN; ITURRIETA, 2008). O cultivo de oliveiras no Brasil, com finalidade comercial, é uma atividade agrícola recente. Apesar de ser uma cultura introduzida no País há muitas décadas, durante algum tempo seu cultivo não prosperou devido à falta de estudos científicos e da adaptação tecnológica (OLIVEIRA et al., 2010), além do consumo *per capto* reduzido. Em 2010, o volume importado de azeite de oliva foi de 52.514 mil toneladas (BRASIL, 2011). Por se tratar de uma cultura cujos frutos e produtos possuem boa qualidade organoléptica e reconhecido efeito benéfico à saúde humana, a cultura tem atraído a atenção do consumidor que, por sua vez, tem despertado o interesse econômico de agricultores e da indústria alimentícia brasileiros.

No entanto, a cadeia produtiva da oliveira no Brasil ainda esbarra em limitações técnicas próprias de uma atividade agrícola recém implantada em uma região. O desconhecimento do material genético mais apropriado para as diferentes condições ambientais, inclusive com a inexistência de programas de melhoramento direcionados para desenvolver novas cultivares mais adequadas, a desinformação do potencial produtivo das cultivares comerciais já introduzidas no País nas diferentes condições edafoclimáticas do Brasil, ausência de programas de certificação e fiscalização do material propagativo e de um sistema padronizado de produção de mudas, são alguns dos fatores de ordem técnica que dificultam o avanço da olivicultura no Brasil.

Ao longo dos últimos anos vários materiais genéticos vêm sendo introduzidos no Brasil, na sua maioria cultivares européias, de forma desorganizada e em desobediência à normas técnicas e normativas, o que pode comprometer o futuro da cultura, principalmente, pela introdução de doenças e pragas ainda inexistentes no país. Além disso, a identificação das cultivares de oliveira que aqui são cultivadas é dificultada pelo grande número de cultivares sinônimos e homônimos, pelo intenso intercâmbio de material vegetal, pela

presença de clones de cultivares e problemas de certificação varietal nos viveiros.

O conhecimento da identidade através de descritores morfológicos e agronômicos são tradicionalmente utilizados na caracterização de plantas. Apesar de recomendado, o emprego destes descritores apresenta algumas limitações como a influência a estresses abióticos e bióticos e aos efeitos do ambiente. Além disso, não são estáveis ao longo do tempo e muitos só podem ser avaliados durante a fase adulta das plantas, o que requer tempo e espaço físico para as avaliações, e em alguns casos, o número de descritores recomendados para uma determinada cultura e/ou cultivar são insuficientes para diferenciá-las das demais (VIEIRA et al., 2009).

A utilização de isoenzimas, como marcador enzimático para diferenciação de plantas parece ser uma técnica limitada, contudo, vantajosa quando comparada com a utilização de marcadores morfológicos (CABRAL, 2008). As isoenzimas são os produtos de expressão dos genes, através de processos de transcrição e de tradução e sua expressão depende do estágio de crescimento da planta e dos seus tecidos (WÜNSCH; HORMAZA, 2002).

Com base na proporção de loco que apresentam mais do que um alelo, no número de alelos por locos e na proporção média de genes heterozigóticos por indivíduo é possível, através dos dados isoenzimáticos, calcular uma estimativa da variação genética dentro de populações naturais (ABDULLAH, 2001). Porém, a influência das condições ambientais e do estágio fenológico das plantas compromete a eficiência das isoenzimas na detecção de diferenças genéticas existentes entre os indivíduos. Um outro fator limitante à utilização das isoenzimas é o fato de que somente aquelas que não apresentam variações em diferentes condições ambientais e fisiológicas podem ser utilizadas como marcadores eficientes, reduzindo assim o número de marcadores disponíveis e restringindo o grau de polimorfismo possível de ser detectado. Apesar dessas

limitações, até cerca de 20 anos atrás, as isoenzimas representaram os principais tipos de marcadores usados para análise de variação em populações de plantas, por apresentarem um custo operacional relativamente baixo.

Com o surgimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase), em meados da década de 1980, aconteceram grandes mudanças em termos de pesquisas genéticas. Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de genética das populações, permitindo avaliar a diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (CABRAL, 2008; LACERDA et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando iniciadores (*primers*) pequenos, permite a análise genética de diversas espécies a um custo relativamente baixo e de forma bastante simplificada (GOMES FILHO et al., 2010).

Os marcadores moleculares oferecem numerosas vantagens relativamente às alternativas convencionais baseadas no fenótipo, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos vegetais, independente do ambiente e fase de desenvolvimento. Uma das principais vantagens da sua utilização é proporcionar a redução do tempo na identificação da diversidade genética entre os indivíduos estudados (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; GOMES FILHO et al., 2010), podendo ser avaliados genótipos ainda na fase de semente ou de plântula.

Os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats - Sequências Simples Repetidas) são sequências de nucleotídeos constituídas pela repetição ininterrupta de um único padrão de nucleotídeos, com um máximo de 6 pb (CABRAL, 2008). Tratam-se de sequências simples de DNA, encontradas em maior ou menor grau nos genomas de todos os organismos e organelas (mitocôndrias e proplastídeos) conhecidos (CHAMBERS; MACAVOY, 2000;

CIPRIANI et al., 2008). Estes marcadores moleculares podem fornecer muita informação e, juntamente com a PCR, permitem detectar os diferentes graus de polimorfismo (SCHLÖTTERER, 2004). Os SSR são abundantes em plantas e os alelos SSR e seus diferentes produtos amplificados podem ser separados por eletroforese e visualizados por fixação em prata, auto-radiografia ou fluorescência (SANTOS et al., 2010).

Em oliveira, diferentes classes de marcadores moleculares estão sendo utilizados em programas de melhoramento, rastreabilidade e certificação da origem do azeite produzido, caracterização e identificação genética de cultivares, estudo do processo de polinização, fluxo gênico e certificação de mudas (BESNARD et al., 2009; MARTINS-LOPES et al., 2009; MONTE ALEGRE; MONTE ALEGRE; GARCIA-RUIZ, 2010; PAFUNDO et al., 2007; RABIEI et al., 2010; SESLI; YEGENOGLU, 2010). Bracci et al. (2009) consideram os SSR como os marcadores mais utilizados na cultura da oliveira, pois são mais interessantes para identificação dos genótipos pela sua co-dominância, grande potencial informativo, baixo custo e resultados reproduzíveis.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) possui um dos maiores e mais antigo banco de germoplasma de oliveira do País. A coleção vem sendo organizada ao longo das últimas décadas por pesquisadores interessados no estudo da cultura e possui genótipos provenientes de várias localidades geográficas, com diversas características morfológicas e fenológicas.

No Brasil, apesar de necessários, ainda são poucos os trabalhos que envolvem o uso de marcadores moleculares para o estudo da cultura da oliveira. As informações geradas nesses estudos podem ser utilizadas eficientemente na identificação de sinónimas e antónimas, na análise da diversidade genética existentes nos pomares e bancos de germoplasmas do país, subsidiar

informações para os programas de certificação de mudas, gerar informações úteis para o pré-melhoramento e formação de grupos heteróticos, caracterizar plantas matrizes e apoiar a proteção de cultivares geradas por programas de melhoramento.

Diante dessa carência de informações, o presente estudo que está organizado em dois capítulos teve como objetivos a caracterização genética de 60 acessos de oliveira pertencentes ao Banco de Germoplasma de Oliveira da EPAMIG e a identificação genética (“DNA fingerprinting”) de genótipos de oliveira por meio do uso de marcadores moleculares do tipo SSR.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, B. The use of isozymes as biochemical markers in rice research. *Bulletin AgroBio*, Ontário, v. 4, n. 2, p. 39-44, 2001.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 617–631, 2008.
- ALBA, V. et al. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 11–16. 2009.
- BELAJ, A. et al. Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western mediterranean assessed by SSR markers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 449–458, 2007.
- BESNARD, G. et al. Pollen-mediated gene flow in a highly fragmented landscape: consequences for defining a conservation strategy of the relict Laperrine's olive. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, p. 662-672, 2009.
- BRACCI, T. et al. SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Ital BELAJ ian region of Liguria. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 209–215, 2009.
- BRASIL. **Indicadores da agropecuária**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_12_16_35_25_0206__balanca__importacao..pdf>. Acesso em: 21 jan. 2011.
- BRETON, C. et al. The origins of the domestication of the olive tree. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, p. 1059–1064, 2009.

CABRAL, E. M. F. M. **Caracterização molecular de variedades de Nogueira (*Juglans regia* L.) portuguesas**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Universidade do Porto, Porto, 2008.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 126, p. 455-476, 2000.

CIPRIANI, G. et al. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 127, p. 1-13, 2008.

DI DONNA, L. et al. Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. **Food Chemistry**, Reading, v. 121, p. 492-496, 2010.

DOVERI, S. et al. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, p. 367-373, 2008.

DUNDAR, E.; SUAKAR, O. Mining olive genome through library sequencing and bioinformatics: Novel sequences and new microsatellites. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 17, p. 2499-2509, 2010.

GOMES FILHO, A. et al. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.

HANNACHI, H. et al. Oleaster (var. *sylvestris*) and subsp. *cuspidata* are suitable genetic resources for improvement of the olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). **Genetic Resource Crop Evolution**, Amsterdam, v. 56, p. 393-403, 2009.

IPEK, A. et al. SSR analysis demonstrates that olive production in the southern Marmara region in Turkey uses a single genotype. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1264-1272, 2009.

LACERDA, D. R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

MARTINS LOPES, P. et al. Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 82-89, 2009.

MASQUIMILLAN, E. V.; ITURRIETA, L. T. Competitividad de las exportaciones de aceituna de mesa (*Olea europaea* l.) chilena en el mercado brasileño entre los años 1993-2005. **IDESIA**, Taracapá, v. 26, n. 1, p. 49-57, 2008.

MONTE ALEGRE, C.; MONTE ALEGRE, M. L.; GARCIA-RUIZ, C. Traceability markers to the botanical origin in olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 28-38, 2010.

OLIVEIRA, A. F. et al. Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 317-322, 2010.

OLIVEIRA, A. F.; RIO RINCÓN, C. Oliveira (*Olea europaea* L.). In: PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. **101 culturas**: manual de tecnologias agrícolas. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 800 p.

PAFUNDO, S. et al. Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 6052-6059, 2007.

RABIEI, Z. et al. Simple sequence repeats amplification: a tool to survey the genetic background of olive oils. **Iranian Journal of Biotechnology**, Teerã, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.

RONY, C. et al. Molecular characterization of Lebanese olive germplasm. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 5, p. 109–115, 2009.

ROUBOS, K.; MOUSTAKAS, M.; ARAVANOPOULOS, F. A. Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1865-1876, 2010.

SANTOS, C. A. F. et al. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 49-55, 2010.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 63-69, 2004.

SESLI, M.; YEGENOGLU, E. D. RAPD assay of wild-type olives in Turkey. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, 2, p. 966-972, 2010.

TAAMALI, W. et al. Agronomic and molecular analyses for the characterization of accessions in Tunisian olive germplasm collections. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 9, n. 5, p. 468-481, 2006.

VIEIRA, E. S. N. et al. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 86-94, 2009.

VIEIRA NETO, J. et al. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 56 p. Boletim Técnico, 88.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, Wageningen, v. 125, p. 59-67, 2002.

CAPITULO 2

**CARACTERIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE
GERMOPLASMA DE OLIVEIRA UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

RESUMO

O cultivo comercial da oliveira no Brasil ainda é uma atividade recente. A cultura está sendo estudada por diferentes instituições de pesquisa, que avaliam seu desempenho agrônomico em diferentes condições edafoclimáticas do país com o intuito de identificar e selecionar genótipos com potencial para exploração comercial e uso em programas de melhoramento. Porém, o setor produtivo e a pesquisa enfrentam problemas na identificação e certificação genética das cultivares introduzidas no Brasil. Consequentemente, a identificação e caracterização da diversidade genética e a estrutura populacional preservada nos bancos de germoplasma dessa espécie é fundamental para a evolução dos programas de melhoramento para as condições nacionais. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar as inter-relações genéticas entre 60 genótipos de oliveira pertencentes ao Banco de Germoplasma da EPAMIG utilizando marcadores microssatélites. Os genótipos estudados incluem acessos brasileiros e, na maioria, cultivares de importância comercial a nível mundial. Foram utilizados 12 marcadores microssatélites específicos para a oliveira: GAPI 101, GAPI 11 e 17, UDO 99-009, UDO 99-019, GAPI 45, GAPI 71A, GAPI 71B, GAPI 89, GAPI 59, UDO 99-031, GAPI 12 e UDO 99-039. A análise genética foi realizada com auxílio dos aplicativos Convert, GenAlex v. 6, Powermaker v. 3.25 e Structure v. 2.3.1. O número total de alelos identificados foi de 72, sendo que os locos GAPI 101 e GAPI 71B foram os que apresentaram os maiores números de alelos, 10 e 9 respectivamente. Enquanto que GAPI 45 gerou apenas 3 alelos. A maior diversidade gênica e conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram encontrados nos marcadores GAPI 101 (0,8399 e 0,8203) e GAPI71B (0,8117 e 0,7863). Já o marcador UDO99-019 apresentou os níveis mais baixos (0,1976 e 0,1860). Além disso, os 12 marcadores SSR foram capazes de gerar uma Probabilidade de Identidade (PI) acumulada de $1,52 \times 10^{-10}$. Os dois primeiros componentes da Análise das Principais Coordenadas explicam 48,16% da variação total. A análise multiloco discriminou 52 perfis do total de 60. Interessantemente, não foram detectadas diferenças genéticas entre os genótipos 'Tafahi 390' e 'Ascolano 323', 'Zalmate' e 'Zalmate 0010', 'Negroa' e 'Galega', 'Ropades 398' e 'Maria da Fé' (acesso da Fazenda Experimental Uva e Vinho – EPAMIG, Caldas – MG). Também não houve diferença entre as cultivares 'JB1', 'Epamig 0012', 'Alto D'oro' e 'Mission', que apresentaram os mesmos perfis alélicos para os 12 marcadores microssatélites utilizados. Esses resultados geram informações importantes para o pré-melhoramento da oliveira no Brasil, discriminando grupos heteróticos, otimizando programas de hibridação e auxiliando na identificação e certificação genética de cultivares de oliveira.

ABSTRACT

The commercial cultivation of olive trees in Brazil have been a recent activity. This crop is being studied by different research institutions, which evaluate their agronomic performance in different soil and climatic conditions in Brazil, in order to identify and select genotypes with potential for commercial production as well as improve the national breeding programs. However, the olive industry and research are facing problems associated with the genetic identification and certification of cultivars released in Brazil. Consequently, the identification and characterization of genetic diversity and population structure preserved in the germplasm collections of this specie are fundamental to the progress of Brazilian breeding programs. Thus the aims of this study were the genotype identification and the characterization and evaluation of inter-genetic relationships among 60 olive accessions, belonging to the EPAMIG Olive Germplasm Bank using microsatellite markers. The genotypes evaluated include Brazilian accessions and most cultivars of commercial importance worldwide. We used 12 microsatellite markers specific for the olive: GAPI 101, GAPI 11 and 17, UDO 99-009, UDO 99-019, GAPI 45, GAPI 71A, GAPI 71B, GAPI 89, GAPI 59, UDO 99-031, GAPI 12 and UDO 99-039. Genetic analyses were performed using the Convert application, GenAlex v. 6, Powermaker v. 3.25 and Structure v. 2.3.1. The total number of alleles was 72, being the *loci* GAPI 101 and GAPI 71B with the highest counting, 10 and 9 respectively, while GAPI 45 generated only three alleles. The greatest genetic diversity and polymorphic information content (PIC) were found in the markers GAPI 101 (0.8399 and 0.8203) and GAPI 71B (0.8117 and 0.7863). Whereas, UDO 99-019 presenting the lowest estimative (0.1976 and 0.1860). In addition, 12 SSR markers were able to generate an accumulated Probability of Identity (PI) 1.52×10^{-10} . The first two components of the Analysis of Principal Coordinates explain 48.16% of total variation. The multilocus analysis discriminated 52 of 60 profiles. Interestingly, it were not detected any genetic differences between genotypes 'Tafari 390' and 'Ascolano 323'; 'Zalmate' and 'Zalmate 0010'; 'Negroa' and 'Galega'; and 'Ropades 398' and 'Maria da Fé' (accession from the Experimental Farm of EPAMIG, Caldas – MG). There was no difference among the cultivars 'JB1', 'Epamig 0012', 'Alto D'oro' and 'Mission', which showed the same allelic profiles for the 12 microsatellite markers used. These results generate important pre-breeding information for genetic improvement of olive in Brazil, discriminating heterotic groups, optimizing controlled hybridization and enabling the identification and certification of genetic varieties of olive trees.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie subtropical pertencente à família *Oleaceae* e originada da bacia do Mediterrâneo (DOVERI et al., 2008). Seu desenvolvimento é dividido em fase juvenil, período em que a planta está se desenvolvendo, e fase adulta, período no qual atinge sua maturidade fisiológica sendo, portanto, capaz de florescer e produzir frutos (RAPOPORT, 1998). É considerada uma planta alógama, embora alguns estudos indiquem que essa condição depende da cultivar e do ambiente. Segundo Besnard (2007), a oliveira é uma espécie diplóide ($2n = 2x = 46$) cuja polinização ocorre principalmente pelo vento (eólica) e suas sementes são dispersas por aves, animais e pelo homem. Em termos gerais, a planta demanda cerca de 10 anos para atingir sua maturidade fisiológica e, portanto, se tornar produtiva. Para evitar o longo período de maturidade fisiológica e a segregação genética, as plantas de oliveira são multiplicadas preferencialmente por meio da propagação vegetativa.

Trata-se de uma importante espécie frutífera que é tradicionalmente cultivada nos países da bacia do Mar Mediterrâneo. Considerada uma cultura de aptidão comercial (azeite e azeitona), a produção da planta possui alto valor agregado, uma vez que seus frutos são bastante apreciados pela população mundial e a mesma é consumida também como azeitona, além de ser matéria prima para o azeite, um produto que possui boas qualidades nutricionais. Segundo estimativas, cerca de 95% da produção mundial da cultura concentra-se na Espanha, Itália, Grécia, Portugal, Turquia e Síria (GOMES et al., 2009).

No Brasil a oliveira foi introduzida no início do século XIX nas regiões Sul e Sudeste. O País é um grande mercado consumidor de azeite de oliva e de azeitonas e apesar de apresentar regiões que possuem características climáticas favoráveis ao cultivo da oliveira, a espécie ainda é pouco cultivada no País.

Um dos maiores gargalos para o desenvolvimento da olivicultura no Brasil é a ausência de programa de certificação da identidade genética das cultivares que foram introduzidos no País, associado à escassez de informações agronômicas para seu cultivo nas condições ambientais e nos solos brasileiros. A espécie apresenta polinização cruzada intra e interespecífica (TAAMALLI et al., 2006), o que promove altos níveis de heterozigosidade e polimorfismo no DNA. Além disso são comuns nomes diferentes atribuídos para o mesmo genótipo de oliveira (sinonímia) ou a atribuição dos mesmos nomes para diferentes genótipos (homonímia).

O conhecimento da diversidade genética que existe entre as cultivares de oliveira é de grande importância para o êxito de programas de melhoramento e na exploração dos recursos genéticos disponíveis. Tradicionalmente, a identificação dos acessos genéticos é feita por meio de características morfológicas, que são fortemente influenciadas pelo ambiente, pelo estágio fenológico e por ataque de doenças e pragas. As isoenzimas também foram utilizadas para detecção da diversidade genética de oliveiras, no entanto, devido a sua característica variável, seu uso foi substituído pelo emprego de marcadores moleculares, que são capazes de identificar genótipos acessando diretamente a variabilidade existente na molécula de DNA, além de ser um método não destrutivo, aplicável em qualquer fase de crescimento das plantas e independente de fatores bióticos e abióticos aos quais as plantas estão expostas.

Inicialmente, os marcadores RFLP, RAPD e AFLP foram utilizados em estudo de caracterização molecular e análise da relação genética entre cultivares de oliveira. Atualmente os marcadores mais usualmente utilizados são os microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas - *Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* - Inter Sequências Simples Repetidas).

Os microssatélites estão sendo utilizados em programas de melhoramento (HANNACHI et al., 2009), estudos de variabilidade (MARTINS LOPES et al., 2009), caracterização de germoplasma (GANINO et al., 2007; RONY et al., 2009), identificação genética de cultivares de oliveira (MUZZALUPO et al., 2008; SARRI et al. 2006), na certificação genética e de origem do azeite (MUZZALUPO; PELLEGRINO; PERRI, 2007; PASQUALONE et al., 2007) e na avaliação da polinização (MOOKERJEE et al., 2005; RALLO; DORADO; MARTIN, 2000). Esses marcadores diferenciam indivíduos homozigotos e heterozigotos, promovem a identificação de muitos alelos presentes nas populações amostradas, produzindo resultados de fácil interpretação e de elevada reprodutibilidade (ALBA et al., 2009).

Alguns relatos de pesquisa com oliveira demonstraram que poucos marcadores microssatélites já são suficientemente polimórficos para distinguir mais de 100 genótipos, e sugerem que a seleção adequada de um conjunto de microssatélites em quantidade e características apropriadas agiliza os trabalhos de identificação e diferenciação de alelos (BALDONI et al., 2009). Diaz et al. (2006) conseguiram diferenciar 51 cultivares de oliveira quando obtiveram 68 alelos utilizando 12 microssatélites. Taamali et al. (2008) caracterizaram 26 cultivares de oliveira da Tunísia com apenas 10 marcadores microssatélites e identificaram 86 alelos, o mínimo de 4 e o máximo de 14 alelos por marcador, com uma média de 8,6. Já Omrani-Sabbaghi et al. (2007), mesmo trabalhando com uma população de 87 acessos de oliveira, observaram que o número de alelos variou de 3 a 14 com uma média de 9, valores próximos aos encontrados por Taamali et al. (2008).

De acordo com Gil et al. (2006), essa similaridade entre os resultados obtidos em diferentes estudos é justificável uma vez que o polimorfismo dos marcadores pode variar de acordo com o tamanho e a origem do germoplasma

amostrado, assim como a presença de ancestrais comuns de diferentes cultivares, o que influencia na redução da variabilidade genética de um grupo.

A EPAMIG possui o maior e mais antigo banco de germoplasma de oliveira presente no Brasil. Essa coleção de genótipos começou com a iniciativa de alguns fazendeiros da região que trouxeram de Portugal algumas mudas de oliveira. Mais tarde, o pesquisador da EPAMIG Dr. Washington Winglione introduziu uma coleção de oliveiras procedentes de diversas regiões do mundo, como: Estados Unidos, Portugal, Grécia, Itália, Espanha, entre outras, na Fazenda Experimental de Maria da Fé, para que pudessem ser realizadas pesquisas de adaptação e desempenho agrônômico dessa espécie nas condições edafoclimáticas do Sul de Minas Gerais. Posteriormente, essa coleção evoluiu para se tornar o primeiro e maior Banco de Germoplasma Ativo de Oliveira localizado no Brasil, contando com mais de 100 diferentes acessos.

No entanto, ainda faltam informações que comprovem a identidade genética desses genótipos e que possam subsidiar os programas de certificação de mudas e de pré-melhoramento e melhoramento genético de oliveira. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivos a caracterização molecular da identidade genética (“DNA fingerprinting”) e o estudo da diversidade genética existente no Banco de Germoplasma de Oliveira localizado na Fazenda Experimental da EPAMIG em Maria da Fé, Minas Gerais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais vegetais

No presente trabalho foram analisados 60 acessos de oliveira pertencentes ao Banco de Germoplasma da espécie, mantido no Núcleo Tecnológico EPAMIG Azeite e Azeitona, localizado na Fazenda Experimental no município de Maria da Fé, sul do estado de Minas Gerais. A amostra de cada acesso foi retirada de uma única planta adulta, mantida a campo e identificada como tal, constituindo assim em uma amostra simples.

O número de identificação do genótipo, nome, aptidão comercial e origem dos cultivares amostrados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Número de identificação, nome, aptidão comercial e provável origem geográfica das cultivares de oliveira analisadas

N ° de Identificação	Genótipo	Aptidão Comercial	Provavel origem geográfica
1	Manzanilla 393	indeterminada	Brasil
2	Picual	azeite	Espanha
3	Cornicabra	azeite	Espanha
4	Arbequina	azeite	Espanha
5	Manzanilla	mesa	Espanha
6	Mission	mesa	Estados Unidos da América
7	Tafari 391	azeite/mesa	Tunísia

Tabela 1, continuação

N ° de Identificação	Genótipo	Aptidão Comercial	Provavel origem geográfica
8	Koroneiki	azeite	Grécia
9	Koroneiki 0023	azeite	Brasil
10	Grapolo 550	azeite	Brasil
11	Grapolo 575	azeite	Brasil
12	Coratina	azeite/mesa	Itália
13	Leccino	azeite/mesa	Itália
14	Grapolo 561*	azeite/mesa	Brasil
15	Ascolano 315*	mesa	Brasil
16	Grapolo 541*	azeite/mesa	Brasil
17	Ascolano USA	mesa	Estados Unidos da América
18	Santa Catalina	mesa	Itália
19	Frantoio	azeite/mesa	Itália
20	Barnea	azeite	Israel
21	Alto D´oro	indeterminada	Portugal
22	Chemlali 003	azeite	Brasil
23	Chemlali 0017	azeite	Brasil
24	Zalmate 0010	indeterminada	Brasil
25	Memeciki 0003	indeterminada	Brasil
26	Clone 0025	indeterminada	Brasil
27	Clone 0012	indeterminada	Brasil
28	Clone 080	indeterminada	Brasil

Tabela 1, continuação

N ° de Identificação	Genótipo	Aptidão Comercial	Provavel origem geográfica
29	Clone 113 **	azeite	Brasil
30	Grousse Alberkan 399	indeterminada	Brasil
31	JB1	indeterminada	Brasil
32	JB2	indeterminada	Brasil
33	Maria da Fé *	azeite	Brasil
34	Negroa	azeite	Portugal
35	Ropades 398	indeterminada	Brasil
36	Salome 488	azeite	Brasil
37	Saiali Magloub	azeite/mesa	Tunísia
38	Galega	azeite	Portugal
39	Empeltre	azeite	Espanha
40	Arauco	mesa	Argentina
41	Gordal de Sevilha	mesa	Espanha
42	Pendolino	azeite	Itália
43	Ascolano 322**	mesa	Brasil
44	Halhali	indeterminada	Grécia
45	Manzanilla Israeli	mesa	Israel
46	Zalmate 0020	indeterminada	Tunísia
47	Lechin de Sevilha	indeterminada	Espanha
48	Manzanilla Reina	mesa	Espanha

Tabela 1, continuação

N ° de Identificação	Genótipo	Aptidão Comercial	Provavel origem geográfica
49	Ascolano 323	mesa	Brasil
50	Tafahi 390	mesa	Brasil
51	Arbosana	azeite	Espanha
52	Megaritiki	indeterminada	Itália
53	Memeciki 0004	indeterminada	Brasil
54	Zalmate	azeite	Tunísia
55	Koroneiki 0007	azeite	Brasil
56	Trouboleg	indeterminada	Desconhecida
57	Queslati 0035	azeite	Brasil
58	Conservolia	mesa	Grécia
59	Cerignola	indeterminada	Itália
60	Penafiel	indeterminada	Desconhecida

* Cultivares registradas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC.

** Cultivares em processo de registro no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC.

A maioria das cultivares analisadas foram amostradas através de plantas que são clones de matrizes mantidas em bancos de germoplasma localizados em diferentes países.

Entretanto, para a avaliação de outras cultivares, foram usadas plantas provenientes de sementes. Essas cultivares, cujas nomenclaturas consistem de um nome seguido de número, são resultantes de um trabalho de pré-melhoramento realizado pela EPAMIG, no município de Maria da Fé, Minas

Gerais. Essas cultivares são: manzanilla 393, koroneiki 0023, grapolo 550, grapolo 575, grapolo 561, ascolano 315, grapolo 541, chemlali 003, chemlali 0017, zalmate 0010, memeciki 0003, grouse alberkan 399, ropades 398, salome 488, ascolano 322, ascolano 323, tafahi 390, memeciki 0004, queslati 0035, koroneiki 0007

2.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas folhas jovens coletadas de plantas adultas mantidas no campo. As folhas retiradas foram colocadas em um envelope de papel alumínio devidamente identificado com o nome do cultivar e a data da coleta. Para o transporte das amostras até o laboratório, os envelopes foram guardados em sacos plásticos e acondicionados em caixas de isopor contendo gelo. No laboratório, as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1990) incluindo pequenas modificações. De cada amostra foram utilizados, aproximadamente, 0,5 g de tecido foliar que foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 1 mL de tampão de extração [Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, CTAB 2% (p/v), PVP 0,1% (p/v), mercaptoetanol 0,2% (v/v)], os extratos foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL e incubados a 65 °C durante 1 hora em banho-maria, com constante agitação. Passado este tempo, foram adicionados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitados gentilmente durante 5 minutos. Em seguida o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos e a fase aquosa do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitados gentilmente durante 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000 rpm durante

15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos e adicionado 1 mL de isopropanol gelado e 100 µL de acetato de amônia (7,5 M) e novamente foram levemente agitados. As amostras foram incubadas a -20 °C “overnight” e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos para a formação dos “pellets” de DNA que foram então lavados 3 vezes com etanol 70%, secos a temperatura ambiente e, logo em seguida, ressuspensos em 200 µL de TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 1mM]. Finalmente as amostras foram tratadas com RNase-A e incubadas a 37 °C por 1 hora.

As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo (0,2 µg/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] para verificar a qualidade do DNA. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

2.3 Análises com marcadores microssatélites

Foram utilizados 12 marcadores microssatélites previamente indicados na literatura como polimórficos para a espécie *Olea europaea* L.. Os marcadores utilizados foram: GAPI 101, GAPI 11 e 17, GAPI 12, GAPI 45, GAPI 89 (CARRIERO et al., 2002), GAPI 59, GAPI 71A, GAPI 71B (CHAFARI et al., 2008), UDO99-009, UDO99-019, UDO99-031 e UDO99-039 (CIPRIANI et al., 2002). O número de identificação utilizado no trabalho, o nome dos iniciadores microssatélites, referências e tamanho esperado estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Nome dos iniciadores SSR, suas seqüências, referências bibliográficas e tamanho esperado dos alelos (pares de base)

Iniciadores	Seqüência	Referência	Tamanho dos alelos
<i>Forward</i> GAPU 101	5'CATGAAAGGAGGGGGACATA3'	Carriero et al. (2002)	264
<i>Reverse</i> GAPU 101	5'GGCACTTGTTGTGCAGATTG'		
<i>Forward</i> GAPU 59	5'CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA3'	Chafari et al. (2008)	207-222
<i>Reverse</i> GAPU 59	5'CAAAGGTGCACTTTCTCTCG3'		
<i>Forward</i> GAPU 11 e 17	5'CGCGTTACCATACCTTAGCC3'	Carriero et al. (2002)	230
<i>Reverse</i> GAPU 11 e 17	5'TTGAATCTGACGTGGATGGA3'		
<i>Forward</i> GAPU 12	5'TTTTGCAAAGCATTAGAGCA3'	Carriero et al. (2002)	203
<i>Reverse</i> GAPU 12	5'AGCAGCAGCAGAAGCTTGAT3'		
<i>Forward</i> UDO99-009	5'TTGATTTACATTGCTGACCA3'	Cipriani et al. 2002	119
<i>Reverse</i> UDO99-009	5'CATAGGGAAGAGCTGCAAGG3'		
<i>Forward</i> UDO99-019	5'TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG3'	Cipriani et al. 2002	165

Tabela 2, continuação

Iniciadores	Sequência	Referência	Tamanho dos alelos
Reverse UDO99-019	5'GGCCTGATCATCGATACCTC3'		
Forward UDO99-031	5'TATCCTCTATGTGGCGATG3'	Cipriani et al. 2002	151
Reverse UDO99-031	5'TTGGTTAAAAGGATTGATACA'		
Forward UDO99-039	5'AATTACCATGGGCAGAGGAG3'	Cipriani et al. 2002	170
Reverse UDO99-039	5'CCCCAAAAGCTCCATTATTGT3'		
Forward GAPU 45	5'ATCGGGAGGGATGTGATGTA3'	Carriero et al. (2002)	292
Reverse GAPU 45	5'CATCGCATCGCCTGTAAATA3'		
Forward GAPU 71 A	5'GATCATTTAAAATATTAGAGA GAGAGA3'	Chafari et al. (2008)	209-259
Reverse GAPU 71 A	5'TCCATCCATGCTGAACTT3'		
Forward GAPU 71 B	5'GATCAAAGGAAGAAGGGGATA AA3'	Chafari et al. (2008)	118-144
Reverse GAPU 71B	5'ACAACAAATCCGTACGCTTG3'		
Forward GAPU 89	5'GATCATTCACACACGAGAG3'	Carriero et al. (2002)	215
Reverse GAPU 89	5'AACACATGCCACAAACTGA3'		

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30 μL , contendo 50 ng de DNA, 6 μL de tampão de reação 5X, MgCl_2 (1,5mM), DNTPs (200 μM de cada), 0,5 μM de cada iniciador (Sigma, USA) e 0,75 U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA).

As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) programado de maneira diferente, dependendo dos iniciadores utilizados. O passo inicial comum foi um processo de desnaturação por 2 minutos a 95 °C. Em seguida, para os primers GAPI 101, GAPI 59, GAPI 11 e 17, UDO 99-009, UDO 99-019, GAPI 45, GAPI 71A, GAPI 71B e GAPI 89 utilizou-se o sistema “Touchdown” com 45 ciclos, incluindo os processos de desnaturação: 95 °C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores com temperatura variando de 62 a 58 °C, durante os 5 primeiros ciclos e 57 °C para os demais ciclos: 50 segundos; extensão dos iniciadores 72 °C: 50 segundos.

Para os primers GAPI 12, UDO 99-031 e UDO 99-039 também foi utilizado o sistema “Touchdown”, porém incluindo diferente número de ciclos e temperaturas. O sistema usado foi: 45 ciclos: desnaturação 95°C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores (temperatura variando de 65 a 56 °C, durante os 10 primeiros ciclos e 55 °C para os demais ciclos) por 50 segundos; extensão dos iniciadores 72 °C por 50 segundos. Em ambos os sistemas, foi realizado um passo de extensão final a 72 °C por 4 minutos.

Para confirmar a qualidade final dos produtos das reações de amplificação, alíquotas de 5 μL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) e EDTA 10 mM) e corado com brometo de etídeo (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em luz UV.

2.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

Uma vez confirmado o sucesso das reações de amplificação em géis de agarose a 0,7%, o produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, numa potência de 60 W por tempo variável de acordo com o tamanho esperado dos alelos.

Após a corrida os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Creste, Tulmann Neto; Figueira (2001). Inicialmente o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultra-pura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico 1,5%. Passou então por nova lavagem e foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 µL de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos. Finalmente o gel foi imerso durante 5 minutos em solução de parada composta de ácido acético (1,5%). Todas as etapas foram realizadas sobre mesa agitadora e em capela de exaustão.

Depois de seco em temperatura ambiente, o gel foi fotografado sobre negatoscópio. Na Figura 1 é apresentada a separação eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida 6% dos produtos da amplificação dos 60 genótipos de oliveira realizado simultaneamente em duas cubas.

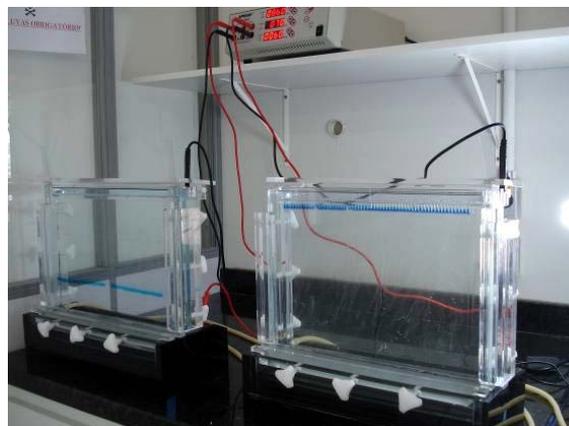


Figura 1 Géis de poliacrilamida durante eletroforese dos produtos de amplificação

2.5 Análises dos dados

A partir dos perfis alélicos gerados com os 12 locos microssatélites para os 60 acessos de oliveira, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos por loco. Utilizando o aplicativo computacional “GenAlex 6” (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foram estimados os seguintes parâmetros: Probabilidade de Identidade (para cada loco e acumulada) (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001) e dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais. O mesmo aplicativo computacional foi utilizado para analisar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos através da Análise Molecular de Variância (AMOVA) (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

Por meio do aplicativo “Convert” (GLAUBITZ, 2004) foi estimada a frequência alélica para todos os locos. Este software foi também utilizado para converter a matriz dos dados para o formato do aplicativo “Structure 2.3.1” (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

O cálculo dos valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), a matriz de dissimilaridade genética baseada na distância “C.S. Chord” (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) e uma árvore filogenética obtida pelo método de agrupamento do Vizinheiro Mais Próximo (SAITOU; NEI, 1987) foram obtidas utilizando o programa “Powermarker Version 3.25” (LIU; MUSE, 2005).

Para averiguar a estruturação genética dos 60 acessos analisados, utilizou-se o método bayesiano através do programa “Structure 2.3.1” para definir o número de grupos (K) mais provável. Empregou-se o modelo de ausência de mistura (“non admixture model”) e frequências alélicas independentes, usando “Burn-in 5.000”, seguido de extensão de 50.000 repetições durante a análise. Foram efetuadas 20 simulações por k, com k variando de 1 a 12. O teste estatístico Δk foi realizado usando o aplicativo “Structure Harvest” (disponível “online” em http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) baseado no critério de Evanno, Regnaut e Goudet (2005). Este critério baseia-se na média e no desvio padrão do $\text{LnP}(D)$ estimado em cada uma das 20 interações por k. Os valores de Δk_i foram estimados através da fórmula:

$$\Delta k_i = \text{ABS} [(k_{i+1} - (2 * k_i) + k_{i-1})] / \text{desvio padrão de } K_i$$

Onde:

i: corresponde ao número de grupos simulados, variando de $i = 1$ até $i = 12$.

ABS = corresponde ao módulo

Esse valor de Δk é estimado para cada k, sendo selecionado o que apresentar maior valor. Após escolhido o Δk ótimo, escolhe-se a simulação de menor valor de $\text{LnP}(D)$ dentre as 20 simulações feitas para a obtenção do mesmo. Cada cor do gráfico gerado representa um possível grupo de indivíduos estruturados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise dos marcadores microssatélites

Com a utilização dos 12 locos foi obtido um total de 72 alelos, um valor médio igual a 6 e variação entre 10, para o loco GAPI 101, a 3 para o loco GAPI 45 (Tabela 3). Na Tabela 3 estão descritos outros parâmetros genéticos gerados a partir dos microssatélites.

Poljuha et al. (2008) trabalhando com uma população de 27 cultivares de oliveira de origem croata e utilizando 12 marcadores microssatélites obtiveram 81 alelos, variando entre 4 e 9, com uma média 6.75 alelos por locos. Nessa análise, os autores verificaram que o loco UDO 99-019 apresentou 4 alelos, o mesmo número encontrado no presente trabalho, de acordo com a Tabela 3.

Chafari et al. (2008), em um trabalho de caracterização de 128 cultivares de oliveira, utilizaram 15 marcadores microssatélites que juntos geraram 70 alelos, uma média de 4,67 alelos por loco e o número máximo de alelos igual a 10. Assim como neste trabalho, Carriero et al. (2002), em um estudo, obtiveram o número máximo de alelos com o uso do microssatélite GAPI 101.

No estudo de Carriero et al. (2002) de caracterização de 20 cultivares de oliveira, obtiveram o número de alelos pelos marcadores GAPI 89 e GAPI 71A de 8 e 5, respectivamente, resultados semelhantes aos apresentados nessa análise. Chafari et al. (2008) também encontraram o mesmo valor para o microssatélite GAPI 71A.

Os resultados encontrados por Baldoni et al. (2009) e Cipriani et al. (2002) para UDO 009-019 e GAPI 71B, respectivamente, também foram os mesmos obtidos nessa análise de 60 cultivares, como pode ser observado na Tabela 3.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) obtido empregando-se o aplicativo computacional “Powermaker”, fornece um valor que permite inferir quanto à eficiência de cada marcador utilizado para identificar os indivíduos em uma população, com base em suas frequências alélicas. Marcadores com informações superiores a 0,5 são considerados bem informativos. Neste trabalho, o PIC médio obtido foi de 0,5946 e com exceção dos marcadores GAPI 12, UDO 99-019 e GAPI 45, que apresentaram valores abaixo de 0,5; os outros nove marcadores empregados apresentaram valores superiores a 0,5 podendo ser considerados como altamente informativos (Tabela 3).

No entanto, o PIC depende do número de alelos e de suas frequências. Desta forma, a informação que este parâmetro produz não deve ser o único aspecto para a seleção ou descarte de um marcador. Portanto, o emprego do aplicativo “GenAlex 6” permite gerar parâmetros adicionais, entre os quais estão a probabilidade de identidade (PI), que considera o conjunto de marcadores empregado em uma análise e que, ao contrário do PIC, quanto mais baixos são os valores encontrados, mais eficiente o conjunto de marcadores utilizado. Nesta pesquisa, os menores valores de PI foram fornecidos pelos marcadores GAPI 101 com 0,041; UDO 99-031, com 0,061 e GAPI 71A, com 0,071 (Tabela 3), os quais são indicativos de que estes marcadores foram os mais apropriados em identificar genótipos.

Tabela 3 Nome do marcador e parâmetros genéticos apresentados pelos 12 marcadores microssatélites utilizados na identificação e caracterização de 60 cultivares de oliveira

Nome do marcador	Frequência do alelo principal	Nº de perfil gerado / marcador	Nº de alelos	Diversidade Alélica	PIC	PI
GAPU 101	0,2414	25	10	0,8399	0,8203	0,045
GAPU 59	0,5909	9	6	0,5924	0,5499	0,114
GAPU 11 e 17	0,3000	5	4	0,7429	0,6950	0,234
GAPU 12	0,5169	3	4	0,5447	0,4437	0,655
UDO99-009	0,6083	7	5	0,5681	0,5204	0,358
UDO99-019	0,8917	5	4	0,1976	0,1860	0,225
UDO99-031	0,2833	15	8	0,7953	0,7660	0,061
UDO99-039	0,4167	16	6	0,7515	0,7215	0,093
GAPU 45	0,6250	5	3	0,4874	0,3919	0,209
GAPU 71 A	0,6102	8	5	0,5730	0,5307	0,071
GAPU 71 B	0,2685	18	9	0,8117	0,7863	0,308
GAPU 89	0,3833	14	8	0,7567	0,7231	0,092
Total			72			1.5 x 10⁻¹⁰
Media	0.4780	10.8	6	0.6384	0,5946	

Para verificar o número mínimo de marcadores necessários para diferenciar todos os genótipos foi construído um gráfico (Figura 2) relacionando a PI em função do número de locos. Assim, foram calculados valores referentes ao acúmulo gradativo da PI dos 12 locos utilizados.

Podemos observar que a partir da combinação entre os cinco primeiros microssatélites utilizados foi possível atingir um nível alto de diferenciação das cultivares. Considerando a combinação dos 12 locos utilizados, a PI acumulado foi igual a $1,51 \times 10^{-10}$, demonstrando uma grande eficiência dos locos utilizados para a diferenciação das cultivares analisadas.

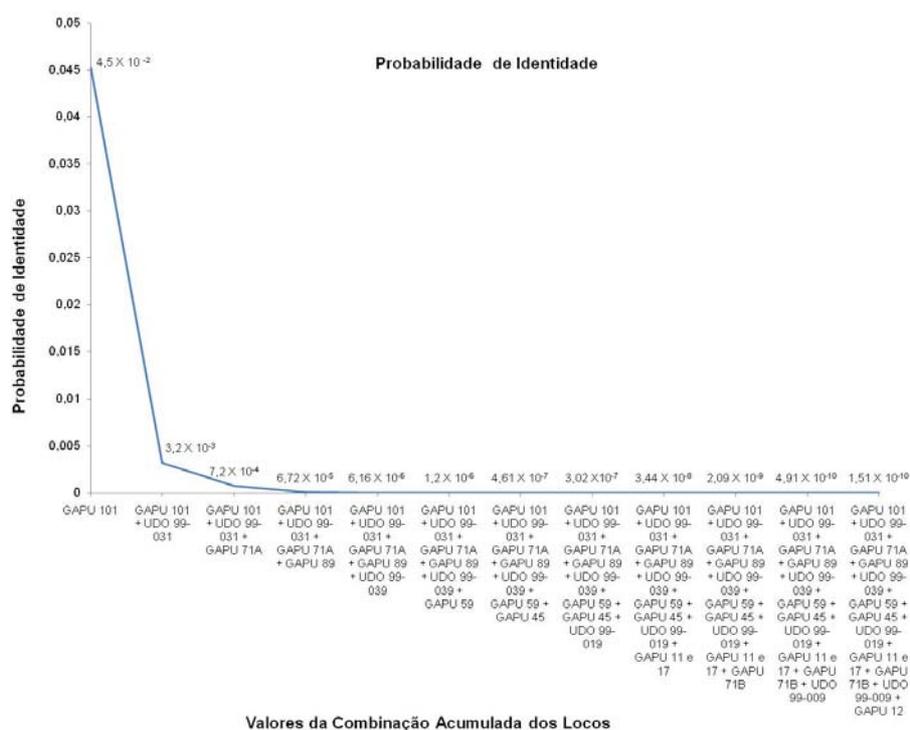


Gráfico 1 Variação da Probabilidade de identidade (PI) de acordo com o acúmulo do valor PI de cada loco

3.2 Análise da diversidade genética

Para melhor avaliar a estruturação genética da população de oliveiras amostrada foi utilizado também o aplicativo computacional “Structure”. De acordo com o critério de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), o ΔK ótimo foi obtido quando $K=4$, valor referente ao pico mais alto (Figura 3), indicando que a estruturação máxima observada foi aquela em que a população foi dividida em 4 grupos, identificados e caracterizados pela cor predominante: Grupo 1 – vermelho; Grupo 2 – verde; Grupo 3 – azul; Grupo 4: amarelo (Figura 4).

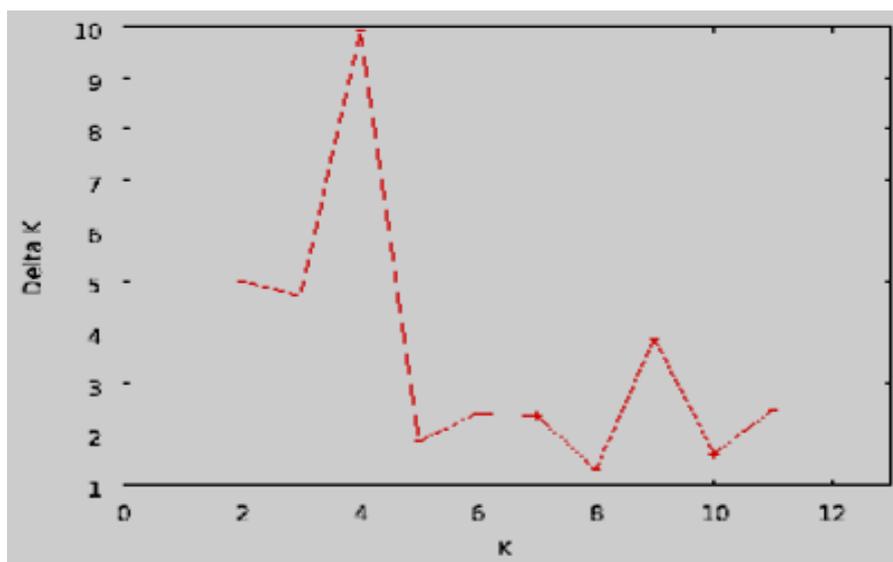


Figura 3 Valores de Delta-K (eixo Y) em função do número de grupos formados pela análise Bayesiana obtido pelo aplicativo do Structure.

De acordo a análise realizada pelo “Structure”, são considerados indivíduos híbridos aqueles que apresentam um grupo, diferente daquele no qual foi incluído, que influencia em seu perfil o que corresponde a 0,20 ou superior a isso. Esse valor pode ser observado no eixo vertical da Figura gerada após o final da análise.

Pode-se observar na Figura 4 que algumas cultivares analisadas possui forte influência de outro (s) grupos(s) e que essa influência atinge níveis igual ou superior a 0,20. As cultivares que apresentaram esse comportamento foram: ‘Picual’, ‘Grapolo 561’, ‘Grapolo 541’, ‘Barnea’, ‘Clone 0025’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 080’, ‘Clone 113’, ‘Salomé 488’, ‘Saiali Magloub’, ‘Empeltre’, ‘Arauco’, ‘Godal de Servilha’, ‘Halhali’, ‘Zalmate 020’, ‘Manzanilha Reina’, ‘Queslati 0035’ e ‘Conservolia’. As cultivares ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 0025’, ‘Arauco’ e ‘Conservolia’ sofrem influência dos quatro grupos em diferentes proporções.

Na Tabela 4 estão representados os valores referentes à contribuição de cada grupo na ascendência dos indivíduos analisados.

É possível observar que, os indivíduos que têm influência de apenas um grupo na sua ascendência demonstraram a partir de seus perfis alélicos, uma probabilidade de ascendência de no mínimo 0,8. Isso indica que existe a chance de 80%, no mínimo, daqueles indivíduos pertencerem aos respectivos grupos (Tabela 4).

Por outro lado, os resultados da ascendência de alguns indivíduos apresentaram um comportamento diferente e indicaram que mais de um grupo tem influência na sua ascendência, que ainda esses grupos influenciam em diferentes proporções e são relativas ao grau de ascendência que um determinado grupo possui na origem do indivíduo (Tabela 4).

O aplicativo “Structure” dividiu a população amostrada em quatro grupos (Figura 4). Na Figura 4 é possível observar que a formação dos quatro

grupos se deu com base nos perfis alélicos gerados a partir dos microssatélites usados, e não na origem geográfica dos genótipos. Isso pode indicar a proximidade e a distância genética que existe entre as cultivares avaliadas.

Os grupos azul e verde foram os que apresentaram o maior grau de estruturação, uma vez que, de acordo com o resultado seus indivíduos constituintes têm pouca influência dos demais grupos. Os grupos vermelho e azul possuem o mesmo número de indivíduos. Dentre os quatro grupos, o amarelo é formado por um número maior de indivíduos e é o que apresentou o menor grau de estruturação.

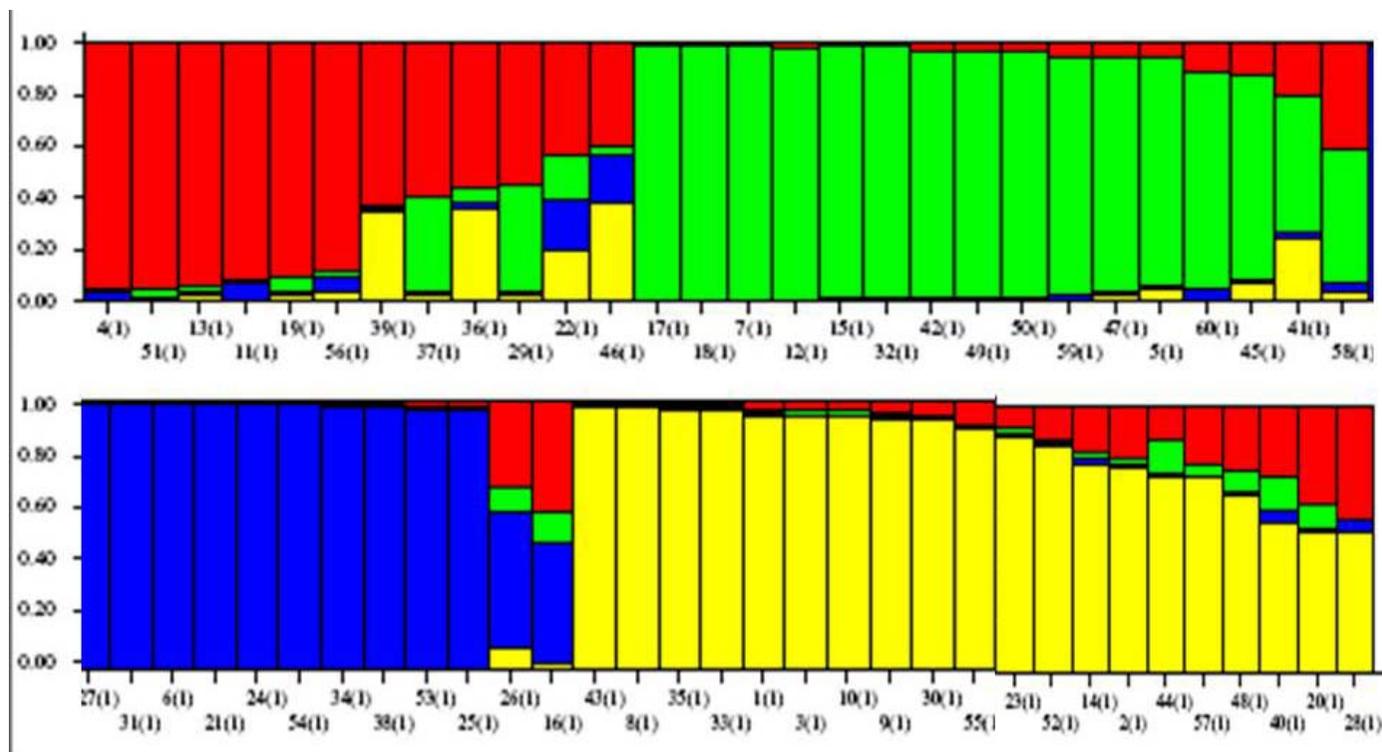


Figura 4 Análise da estruturação genética de 60 variedades de oliveira. No eixo x, os números fora dos parênteses representam as 60 variedades de oliveira estudadas, de acordo com a ordem da Tabela 1. O número entre parênteses indica que todas foram avaliadas como pertencentes a um único grupo a priori. O eixo y é uma escala de referência relativa referente ao coeficiente de “membership”

Tabela 4 Contribuição de cada grupo formado pelo aplicativo computacional 'Structure' na ascendência dos indivíduos analisados

Genótipos	Grupos Inferidos			
	1	2	3	4
1	0,035	0,007	0,006	0,952
2	0,197	0,021	0,012	0,771
3	0,027	0,016	0,004	0,952
4	0,947	0,007	0,04	0,006
5	0,056	0,874	0,019	0,051
6	0,005	0,005	0,985	0,005
7	0,01	0,976	0,005	0,009
8	0,009	0,004	0,004	0,983
9	0,039	0,015	0,004	0,942
10	0,032	0,011	0,007	0,95
11	0,909	0,008	0,076	0,007
12	0,019	0,972	0,005	0,005
13	0,932	0,028	0,011	0,029
14	0,176	0,014	0,025	0,786
15	0,012	0,97	0,014	0,005
16	0,402	0,124	0,442	0,032
17	0,009	0,98	0,004	0,007
18	0,011	0,977	0,005	0,007
19	0,893	0,067	0,017	0,024
20	0,363	0,099	0,006	0,533
21	0,005	0,005	0,985	0,005
22	0,427	0,18	0,186	0,207
23	0,08	0,026	0,004	0,89
24	0,008	0,006	0,981	0,005
25	0,02	0,01	0,958	0,011
26	0,317	0,097	0,5	0,087
27	0,004	0,004	0,987	0,005
28	0,416	0,008	0,047	0,529
29	0,536	0,428	0,008	0,028
30	0,054	0,013	0,004	0,929
31	0,004	0,005	0,987	0,005
32	0,014	0,969	0,012	0,006
33	0,012	0,009	0,007	0,971
34	0,009	0,009	0,975	0,007
35	0,013	0,008	0,007	0,972
36	0,55	0,066	0,015	0,369
37	0,596	0,356	0,014	0,035

Tabela 4, continuação

Genótipos	Grupos Inferidos			
	1	2	3	4
38	0,009	0,008	0,975	0,008
39	0,627	0,014	0,014	0,345
40	0,265	0,122	0,05	0,563
41	0,193	0,537	0,018	0,252
42	0,027	0,956	0,005	0,012
43	0,008	0,004	0,004	0,984
44	0,128	0,12	0,011	0,741
45	0,126	0,782	0,014	0,078
46	0,392	0,03	0,19	0,388
47	0,053	0,903	0,013	0,03
48	0,241	0,086	0,007	0,667
49	0,034	0,95	0,005	0,012
50	0,033	0,95	0,005	0,012
51	0,947	0,035	0,008	0,01
52	0,127	0,015	0,004	0,854
53	0,015	0,013	0,965	0,007
54	0,008	0,006	0,981	0,004
55	0,084	0,007	0,005	0,904
56	0,879	0,015	0,058	0,048
57	0,218	0,044	0,004	0,734
58	0,401	0,527	0,029	0,043
59	0,05	0,927	0,015	0,008
60	0,103	0,847	0,037	0,013

Assim como a análise do “Structure”, o aplicativo computacional ‘GenAlex’ também dividiu, por meio da análise de dispersão gráfica PCA (“Principal Coordinate Analysis”), a população de oliveiras em 4 grupos (Figura 5).

A análise de dispersão gráfica PCA (“Principal Coordinate Analysis”), demonstra as relações de similaridade e distância genéticas entre as cultivares. A análise PCA apresenta índices que estão relacionados com o nível de explicação para as relações genéticas existentes. Os resultados obtidos na presente análise apresentam um percentual total de explicação igual a 48,16%, sendo que para a

coordenada 1 (eixo vertical) obtém-se uma explicação de 29,23%, e a coordenada 2 (eixo horizontal) o valor de 18,93%.

Para essa análise admite-se que quanto mais próxima de um dos eixos a cultivar estiver localizada, maior o grau de certeza da sua inclusão no referido grupo.

De acordo com os resultados da análise PCA, observa-se que a maioria dos indivíduos estão dispersos no painel, demonstrando uma grande variabilidade genética entre as cultivares avaliadas, uma informação útil e que pode ser usada em trabalhos de melhoramento genético da oliveira.

Pelo resultado da análise foi possível observar que algumas cultivares apresentaram perfis genéticos idênticos para os 12 marcadores microssátelites utilizados. Portanto, não foram detectadas diferenças genéticas capazes de distinguir os seguintes genótipos: 'JB1', 'Clone 0012', 'Alto D'oro' e 'Mission'; 'Tafari 390' de 'Ascolano 323'; 'Zalmate' de 'Zalmate 0010'; 'Negroa' de 'Galega'; 'Ascolano USA' de 'Santa Catalina'; 'Ropades 398' e de 'Maria da Fé' (acesso EPAMIG Caldas - MG).

De acordo com a Figura 5, a maioria dos indivíduos do grupo 1, caracterizada pela cor vermelha, estão distribuídos ao longo da coordenada 1. As cultivares 'Trouboleg', 'Zalmate 0020' e 'Empeltre' estão próximos entre si, porém distantes dos demais integrantes do grupo. As cultivares 'Salome 488' e 'Chemlalli 003' estão agrupadas junto a indivíduos de outros grupos.

Conforme a análise de dispersão gráfica PCA, a maioria dos indivíduos da população 2, identificada através da cor verde, estão posicionadas acima da coordenada 2 e ao longo da coordenada 1, com algumas cultivares mais próximas e outras um tanto distanciadas dessa coordenada. Nesse grupo algumas cultivares apresentam-se isoladas, agrupadas entre si, porém, outras estão inseridas em grupos distintos (Figura 5).

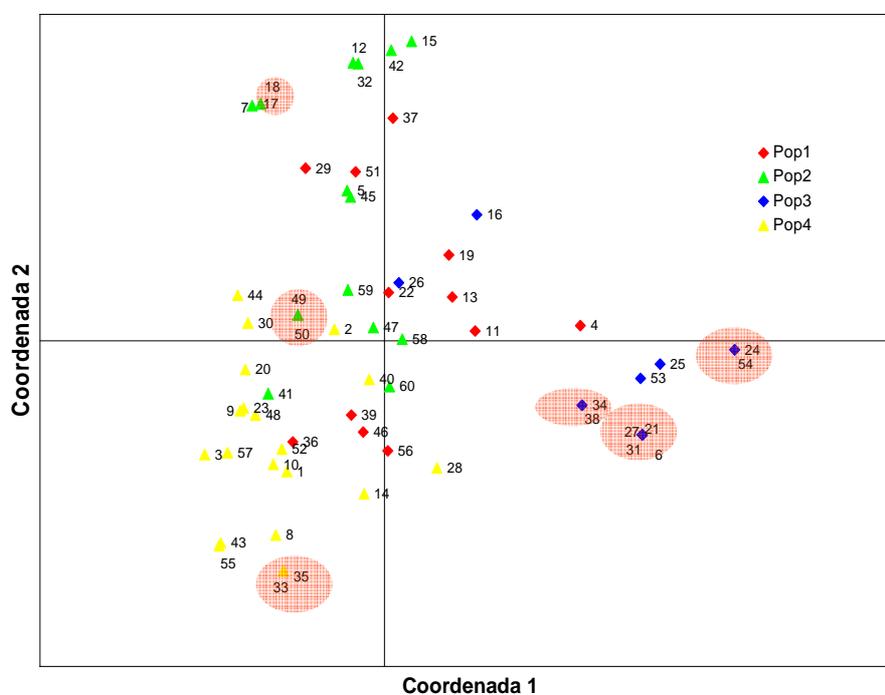


Figura 5 Resultado da análise das coordenadas principais das 60 cultivares de oliveira. Não existe diferença genética entre os genótipos sobrepostos no mesmo círculo em vermelho

Com relação ao grupo 3, representado pela cor azul, grande parte das cultivares que o compõem estão próximas umas das outras e dispostas abaixo da coordenada 2 e à direita da coordenada 1, demonstrando similaridade/proximidade genéticas entre elas. Apenas as ‘Grapolo 541’ e ‘Clone Epamig 0025’ apresentaram comportamento diferenciado das demais, estando localizadas próximas a indivíduos do grupo 1 (Figura 5).

O grupo 4, caracterizado pela cor amarela e pelo maior número de indivíduos, foi o que apresentou a menor dispersão e a maior coesão entre as

suas cultivares constituintes, que concentraram-se abaixo da coordenada 2 e à esquerda da coordenada 1. Porém, algumas cultivares do grupo estão posicionadas de maneira isolada e dispersa, ao longo das coordenadas 1 e 2 (Figura 5).

De uma maneira em geral, o que pode ser observado na Figura 5 é que algumas cultivares apresentaram proximidade de grupos diferentes daquele ao qual foi agrupada. A análise do “Structure” indicou que essas cultivares sofrem influência de diferentes grupos na sua ascendência.

Provavelmente, o valor obtido na análise de PCA de 48,16%, que é considerado baixo para explicar o agrupamento, seja devido às diferentes influências na ascendência das cultivares analisadas.

Para facilitar o estudo dos grupos formados a partir do aplicativo “Structure”, foi realizada uma nova análise de dispersão gráfica PCA dessa vez sem a presença das seguintes cultivares: ‘Picual’, ‘Grapolo 561’, ‘Grapolo 541’, ‘Barnea’, ‘Clone 0025’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 080’, ‘Clone 113’, ‘Salomé 488’, ‘Saiali Magloub’, ‘Empeltre’, ‘Arauco’, ‘Godal de Servilha’, ‘Halhali’, ‘Zalmate 020’, ‘Manzanilha Reina’, ‘Queslati 0035’ e ‘Conservolia’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 0025’, ‘Arauco’ e ‘Conservolia’.

O resultado obtido revela que sem a presença dessas cultivares, observa-se um pequeno aumento na porcentagem de explicação da análise de dispersão (51,65%), sendo que a coordenada 1 apresentou uma explicação de 31,48% e a coordenada 2 um valor de 20,17%. O aumento desses valores ajuda a explicar o agrupamento das cultivares e possibilitou um rearranjo das cultivares que torna melhor e mais simples o resultado obtido (Figura 6).

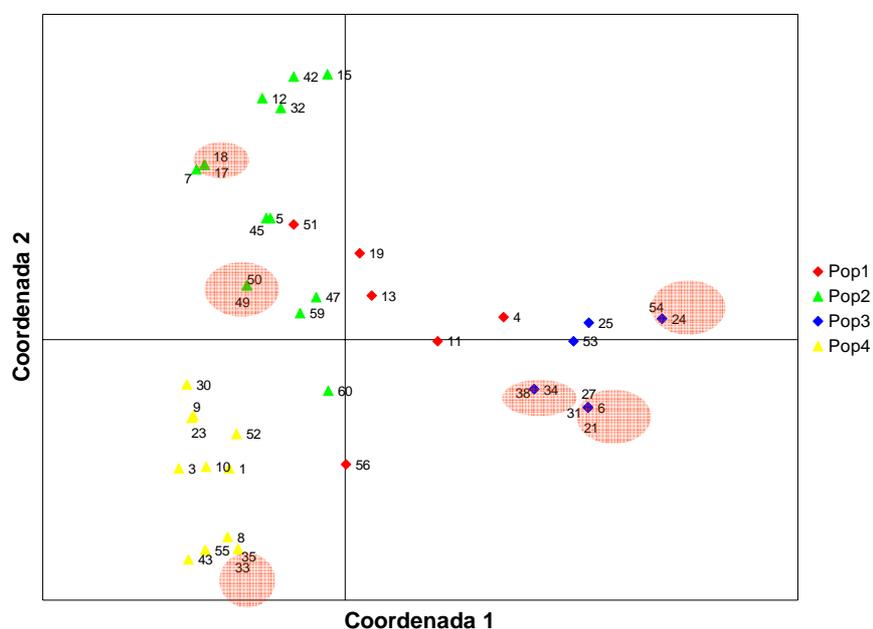


Figura 6 Resultado da Análise das coordenadas principais sem a presença das cultivares ‘Picual’, ‘Grapolo 561’, ‘Grapolo 541’, ‘Barnea’, ‘Clone 0025’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 080’, ‘Clone 113’, ‘Salomé 488’, ‘Saiali Magloub’, ‘Empeltre’, ‘Arauco’, ‘Godal de Servilha’, ‘Halhali’, ‘Zalmate 020’, ‘Manzanilha Reina’, ‘Queslati 0035’ e ‘Conservolia’. Não existe diferença genética entre os genótipos sobrepostos no mesmo círculo em vermelho

A Figura 6 mostra que os indivíduos das populações 3 e 4, caracterizadas pelas cores azul e amarela, respectivamente, mantiveram o comportamento de agrupamento e coesão entre si, assim como o distanciamento da coordenada 1. No caso do grupo 4, um indivíduo foi reposicionado e distanciado da coordenada 2, comportamento que pode ser estendido aos demais indivíduos do grupo, porém em menor amplitude.

Algumas cultivares do grupo 3 também foram recolocadas no plano de dispersão e posicionados acima da coordenada 2. Observa-se que essa população aproximou-se da coordenada 2 (Figura 6).

Os grupos 1 (cor vermelha) e 2 (cor verde) mantiveram o comportamento dispersivo apresentado na Figura 5. No grupo 1, os indivíduos mostraram independência e distanciamento uns dos outros e concentraram-se à direita da coordenada 1 e acima da coordenada 2. As cultivares que formam o grupo 2 foram distanciadas e levemente deslocadas para a esquerda da coordenada 1, mantendo a distribuição ao longo dessa coordenada. No mesmo grupo, com exceção de alguns, observa-se que os a maioria dos indivíduos estão organizados em pequenos agrupamentos (Figura 6).

Assim como as análises do “Structure” e Principal Coordenada Análise (PCA), que dividiram a população de 60 genótipos em quatro grupos, a análise do agrupamento pelo método do vizinho mais próximo com base na matriz de dissimilaridade também dividiu as cultivares em 4 grupos (Figura 7). Esse resultado reforça os resultados anteriores, apesar de se tratar de análises independentes que utilizam parâmetros diferentes para avaliar a população em questão.

Na Figura 7 podemos verificar que, pela análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo as cultivares foram reagrupadas de forma diferente daquela originada a partir do aplicativo computacional ‘Structure’. No entanto, para facilitar a visualização desse novo rearranjo, a identificação dessas cultivares e a caracterização dos grupos está de acordo com o resultado do “Structure”.

Nessa análise, assim como as anteriores, novamente os grupos formados agrupam cultivares de diferentes origens geográficas (Figura 7).

A análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo, a exemplo da análise PCA, também indicou que, após o uso dos 12

microsatélites, as cultivares ‘JB1’, ‘Clone 0012’, ‘Alto D’oro’ não diferem da ‘Mission’; que a ‘Tafahi 390’ é semelhante geneticamente a ‘Ascolano 323’; que as cultivares ‘Zalmate’ de ‘Zalmate 0010’ não diferem entre si; que ‘Negroa’ não difere da ‘Galega’ ; ‘Ascolano USA’ é idêntica geneticamente da ‘Santa Catalina’; ‘Ropades 398’ e de ‘Maria da Fé’ (acesso EPAMIG Caldas MG) apresentam perfis genéticos idênticos. Na árvore fenética formada a partir da análise do método do vizinho mais próximo essas cultivares estão sobrepostas no mesmo ponto. (Figura 7).

A árvore fenética mostra que as cultivares ‘Memeciki 0003’ e ‘Memeciki 0004’ foram agrupadas no mesmo ponto, no entanto possuem perfis alélicos diferentes (Tabela 6). O resultado da análise demonstra a proximidade genética entre as cultivares ‘Manzanilla’ e ‘Manzanila Israeli’.

A distribuição das cultivares na árvore fenética indica a proximidade e distância genética que esses genótipos possuem entre si. Ou seja, há uma correlação direta entre a distribuição das cultivares na árvore fenética (Figura 7) e a distância/proximidade genética existente. Esses dados são importantes para a escolha de progenitores em um programa de melhoramento genético.

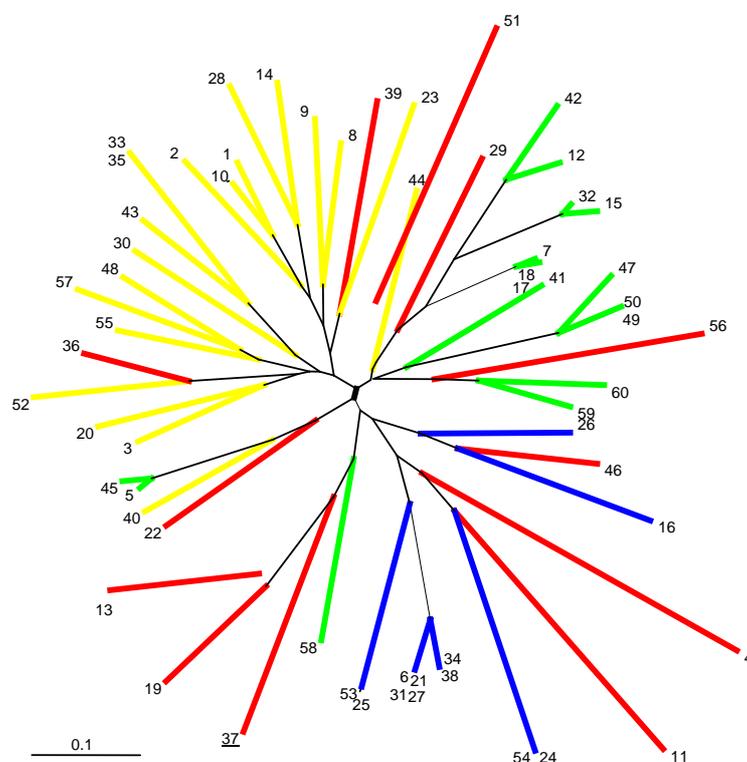


Figura 7 Árvore obtida pelo método do vizinho mais próximo demonstrando as relações genéticas entre 60 cultivares de oliveira. 1 - Manzanilla 393; 2 - Picual; 3 - Cornicabra; 4 - Arbequina; 5 - Manzanilla; 6 - Mission; 7 - Tafahi 391; 8 - Koroneiki; 9 - Koroneiki 0023; 10 - Grapolo 550; 11 - Grapolo 575; 12 - Coratina; 13 - Leccino; 14 - Grapolo 561; 15 - Ascolano 315; 16 - Grapolo 541; 17 - Ascolano USA; 18 - Santa Catalina; 19 - Frantoio; 20 - Barnea ; 21 - Alto D'oro ; 22 - Chemlalli 003; 23 - Chemlalli 0017; 24 - Zalmate 0010; 25 - Memeciki 0003; 26 - Clone 0025; 27 - Clone 0012; 28 - Clone 080; 29 - Clone 113; 30 - Grousse Alberkan 399; 31 - JB1; 32 - JB2; 33 - Maria da Fé; 34 - Negrao; 35 - Ropades 398; 36 - Salome 488; 37 - Saiali Magloub; 38 - Galega; 39 - Empeltre; 40 - Arauco; 41 - Gordal de Sevilha; 42 - Pendolino; 43 - Ascolano 322; 44 - Halhali; 45 - Manzanilla Israeli; 46 - Zalmate 020; 47 - Lechin de Sevilha; 48 - Manzanila Reina; 49 - Ascolano 323; 50 - Tafahi 390; 51 - Arbosana; 52 - Megaritiki; 53 - Memeciki 0004; 54 - Zalmate; 55 - Koroneiki 0007; 56 - Trouboleg; 57 - Queslati 0035; 58 - Conservollia; 59 - Cerignola; 60 - Penafiel

Na sequência, para avaliar os grupos formados a partir do aplicativo “Structure”, foi realizada uma nova análise do agrupamento pelo método do vizinho mais próximo com base na matriz de dissimilaridade sem a presença das cultivares ‘Picual’, ‘Grapolo 561’, ‘Grapolo 541’, ‘Barnea’, ‘Clone 0025’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 080’, ‘Clone 113’, ‘Salomé 488’, ‘Saiali Magloub’, ‘Empeltre’, ‘Arauco’, ‘Godal de Servilha’, ‘Halhali’, ‘Zalmate 020’, ‘Manzanilha Reina’, ‘Queslati 0035’ e ‘Conservolia’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 0025’, ‘Arauco’ e ‘Conservolia’.

Diante do resultado desse novo rearranjo da população (Figura 8) observa-se que a população foi dividida em três grupos e nenhum indivíduo foi inserido em um grupo diferente daquele em que estava inicialmente.

Dessa vez, obtêm-se uma organização dos indivíduos mais parecida com aquela obtida pela análise do “Structure”, com mais união e em alguns casos, com menor distância entre as cultivares que receberam igual classificação (Figura 8).

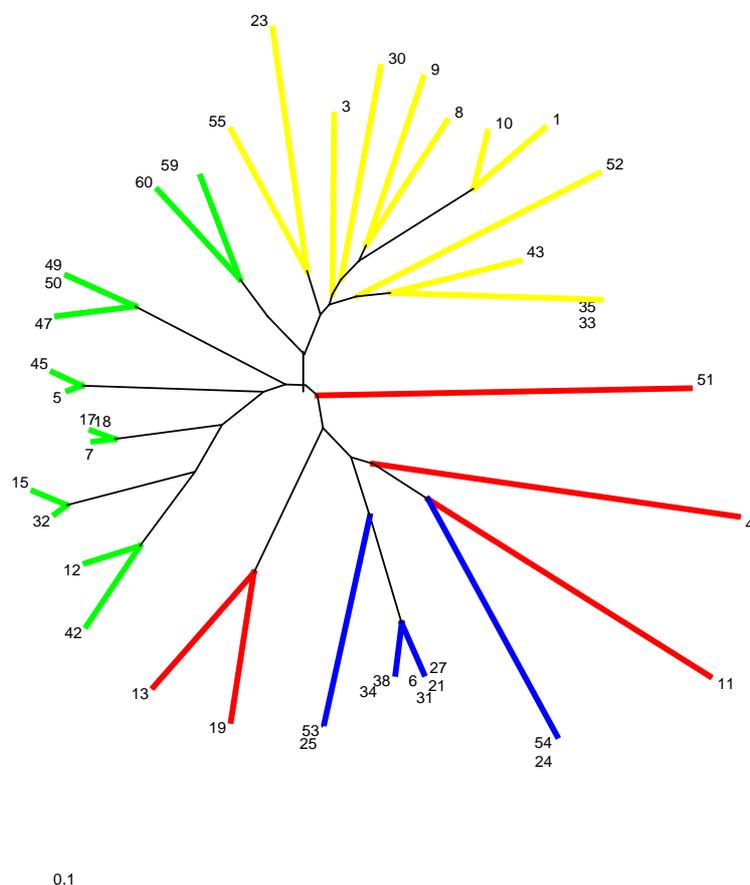


Figura 8 Árvore obtida pelo método do vizinho mais próximo demonstrando as relações genéticas entre 38 cultivares de oliveira. 1 - Manzanilla 393; 3 - Cornicabra; 4 - Arbequina; 5 - Manzanilla; 6 - Mission; 7 - Tafahi 391; 8 - Koroneiki; 9 - Koroneiki 0023; 10 - Grapolo 550; 11 - Grapolo 575; 12 - Coratina; 13 - Leccino; 15 - Ascolano 315; 17 - Ascolano USA; 18 - Santa Catalina; 19 - Frantoio; 21 - Alto D'oro ; 23 - Chemlalli 0017; 24 - Zalmate 0010; 25 - Memeciki 0003; 27 - Clone 0012; 30 - Grousse Alberkan 399; 31 - JB1; 32 - JB2; 33 - Maria da Fé; 34 - Negrao; 35 - Ropades 398; 38 - Galega; 42 - Pendolino; 43 - Ascolano 322; 45 - Manzanilla Israeli; 47 - Lechin de Sevilla; 49 - Ascolano 323; 50 - Tafahi 390; 51 - Arbosana; 52 - Megaritiki; 53 - Memeciki 0004; 54 - Zalmate; 55 - Koroneiki 0007; 56 - Trouboleq; 59 - Cerignola; 60 - Penafiel

Para realizar a análise molecular de variância (AMOVA) dividiu-se a população de 60 genótipos de acordo com o aplicativo “Structure”, a fim de analisar a distribuição da variabilidade dentro e entre os grupos formados. Inicialmente, inicialmente, fez-se a AMOVA com a população completa, ou seja, com 60 cultivares.

Em seguida, para observar o efeito das cultivares que possuem diferentes influências na sua ascendência sobre a variância da população, fez-se uma nova análise com a presença de apenas 38 cultivares. As cultivares ‘Picual’, ‘Grapolo 561’, ‘Grapolo 541’, ‘Barnea’, ‘Clone 0025’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 080’, ‘Clone 113’, ‘Salomé 488’, ‘Saiali Magloub’, ‘Empeltre’, ‘Arauco’, ‘Godal de Servilha’, ‘Halhali’, ‘Zalmate 020’, ‘Manzanilha Reina’, ‘Queslati 0035’ e ‘Conservolia’, ‘Chemlalli 003’, ‘Clone 0025’, ‘Arauco’ e ‘Conservolia’ foram retiradas da análise. O resultado está apresentado na Tabela 5.

Quando a população foi analisada com a presença dos 60 cultivares, a variação dentro dos grupos formados foi de 97%, demonstrando a natureza altamente heterozigótica dessa população, uma vez que tratam-se de cultivares com distintas constituições genéticas e origem geográfica.

No entanto, quando a análise foi feita somente com a presença de 38 cultivares, a variância dentro dos grupos cai para 66%, ou seja houve mais homogeneidade dentro dos agrupamentos. A variação entre os grupos teve um comportamento contrário.

Tabela 5 Análise molecular da variância de uma população de genótipos de oliveira

População com 60 cultivares.					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Variância Estimada	Porcentagem da Variância Molecular
Entre Grupos	3	37,088	12,363	0,267	3%
Dentro dos Grupos	56	471,279	8,416	8,416	97%
Total	59	508,367		8,683	100%

População com 38 cultivares					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Variância Estimada	Porcentagem da Variância Molecular
Entre Grupos	3	118,490	39,497	3,245	34%
Dentro dos Grupos	38	240,510	6,329	6,329	66%
Total	41	359,000		9,574	100%

3.3 Análise dos cultivares sinônimos

Na cultura da oliveira, são comuns os casos em que diferentes nomes são dados para um mesmo genótipo, caracterizando assim a sinonímia, ou que nomes iguais sejam atribuídos para genótipos diferentes, o que é chamado de homonímia.

No presente trabalho foram detectados casos de sinonímia, e posteriormente a utilização dos 12 microssatélites alguns genótipos com diferentes nomes apresentaram perfis alélicos idênticos a outros (Tabela 6).

Na Tabela 6, os casos de sinonímia foram destacados através de diferentes cores. Os indivíduos identificados pela mesma cor pertencem ao mesmo grupo e, portanto, não apresentam diferença genética entre si.

Tabela 6 Nome da cultivar, número de identificação, “peso” dos alelos das cultivares, número de cultivares com o mesmo perfil e grupos formados na análise da população de 60 cultivares de oliveira

Cultivar	Número de identificação	“Peso” dos alelos	Número de cultivares / peso	Grupos
Tafahi 390	50	262255332355281715552466g	2	A
Ascolano 323	49	262255332355281715552466g	0	A
Zalmate	54	5104435112223681255332456g	2	B
Zalmate 0010	24	5104435112223681255332456g	0	B
Galega	38	5104435332324591715372425g	2	C
Negroa	34	5104435332324591715372425g	0	C
JB1	31	5104435332324691715332425g	4	D
Clone 0012	27	5104435332324691715332425g	0	D
Alto D’oro	21	5104435332324691715332425g	0	D
Mission	6	5104435332324691715332425g	0	D
Santa Catalina	18	563315333345283715772436g	2	E
Ascolano USA	17	563315333345283715772436g	0	E
Ropades 398	35	582255330044161656112216g	2	F
Maria da Fé	33	582255330044161656112216g	0	F
Trouboleq	56	004455331314005850772245g	1	1

Tabela 6, continuação

Cultivar	Número de identificação	“Peso” dos alelos	Número de cultivares / peso	Grupos
Cerignola	59	004455333345283715772444g	1	2
Salomé 488	36	152255330045682735772426g	1	3
Clone 0025	26	2103315333344497755332426g	1	4
Zalmate 020	46	222215333334442755332466g	1	5
Gordal de Sevilha	41	252255333345291315672426g	1	6
Grapolo 541	16	253315132334482715332266g	1	7
Chemlalli 003	22	253335332344681215662426g	1	8
Memeciki 004	53	254413332234001750332426g	1	9
Meneciki 003	25	254413332234461715332426g	1	10
Grapolo 561	14	261135330044481256132266g	1	11
Manzanilla Israeli	45	263335332344281725112423g	1	12
Manzanilla	5	263335332344281755112423g	1	13
Pendolino	42	263345332235283715112414g	1	14
Coratina	12	263345332335283755112424g	1	15
Clone 0080	28	281135332244462825132466g	1	16

Tabela 6, continuação

Cultivar	Número de identificação	“Peso” dos alelos	Número de cultivares / peso	Grupos
Manzanilla 393	1	281135333344495755162466g	1	17
Grapolo 550	10	281155333344491755112466g	1	18
Lechin de Sevilha	47	282455332355281715552426g	1	19
Picual	2	283335332344495725442466g	1	20
Manzanilla Reina	48	292235333344283756662423g	1	21
Conservollia	58	354415332344282356172466g	1	22
Penafiel	60	364455333345001715112424g	1	23
Arbequina	4	4104412222344287722331346g	1	24
Halhali	44	443355333344291615772466g	1	25
Koroneiki 0023	9	461135333344247766772436g	1	26
Megaritiki	52	462255331145682750442416g	1	27
Koroneiki	8	481135333344002756442416g	1	28
Ascolano 322	43	482255333344196756222416g	1	29
Cornicabra	3	482255333344265755772436g	1	30
Grousse Alberkan 399	30	493355333344477755222416g	1	31
Ascolano 315	15	5103315332235283715172436g	1	32

Tabela 6, continuação

Cultivar	Número de identificação	“Peso” dos alelos	Número de cultivares / peso	Grupos
JB2	32	5103315332335283750172436g	1	33
Grapolo 575	11	552213113323291245371346g	1	34
Leccino	13	561145142334281756232434g	1	35
Barnea	20	562235333345122455772436g	1	36
Tafahi 391	7	563315333345283755772436g	1	37
Clone 113	29	573315333300381355672466g	1	38
Arauco	40	581135332344281715472423g	1	39
Fantoio	19	6101114132334282756132434g	1	40
Saiali Magloub	37	663315132234292356172414g	1	41
Empeltre	39	681155332244585825672426g	1	42
Chemlalli 0017	23	681155333345781256670013g	1	43
Queslati 0035	57	692235333345003736672411g	1	44
Arbosana	51	9103314333345291750681324g	1	45
Koroneiki 0007	55	992255333344002556672412g	1	46

Na presente análise, 52 cultivares foram diferenciadas entre as 60 cultivares de oliveiras avaliadas. Dentre as oito cultivares restantes, não houve distinção entre algumas cultivares. São elas: cultivares ‘Santa Catalina’ e ‘Ascolano USA’; cultivares ‘Tafahi 390’ e ‘Ascolano 323’; cultivares ‘Zalmate’ e ‘Zalmate 0010’; cultivares ‘Negroa’ e ‘Galega’; cultivares ‘Ropades 398’ e ‘Maria da Fé’ (acesso EPAMIG Caldas-MG); e cultivares ‘JB1’, ‘Clone 0012’, ‘Alto D’oro’ e ‘Mission’.

Diante dessa situação e para reforçar o resultado das análises realizadas, os indivíduos indicados como semelhantes foram novamente amostrados no campo e foram avaliados caso a caso para confirmar a presença de sinonímia ou se tratava de erros proporcionados por misturas de mudas ou identificação incorreta de genótipos. Para avaliar as cultivares ‘Ascolano USA’, ‘Santa Catalina’, ‘Ropades 398’ e ‘Maria da Fé’, foram utilizadas folhas jovens coletadas de plantas adultas, sendo que cada cultivar foi amostrada em três plantas diferentes identificadas como tais, no Banco de Germoplasma da EPAMIG.

Os perfis genéticos gerados após as avaliações dos géis de poliacrilamida foram convertidos em uma matriz numérica, que foi analisada pelo software “GenAlex 6”, podendo observar que a probabilidade de exclusão considerando todos os marcadores microssatélites foi de 0,943, ou seja, temos uma confiança nos dados de 94,3%, sendo esse um valor adequado que corrobora com a estrutura da análise. A Figura 9 demonstra perfis representativos gerados para alguns dos alelos analisados.

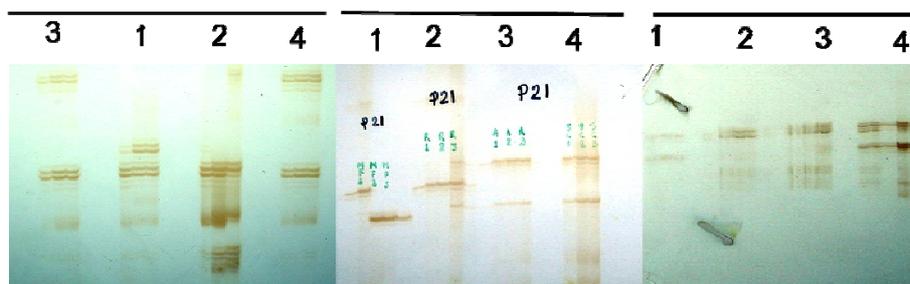


Figura 9 Géis de poliacrilamida resultantes das análises dos iniciadores GAPU 101, UDO 99-009 e GAPU 89. Onde: 1) ‘Maria da Fé’; 2) ‘Ropades 398’; 3) ‘Ascolano USA’; e 4) ‘Santa Catalina’

Os dados dos três indivíduos das cultivares ‘Ascolano USA’ e ‘Santa Catalina’ mostram que se tratam dos mesmos genótipos, ou seja, temos um caso comprovado de sinonímia (nomes diferentes para a mesma cultivar).

No caso da análise das cultivares ‘Maria da Fé’ e ‘Ropades 398’ os resultados mostram que somente um dos três indivíduos que supostamente pertenciam à cultivar ‘Maria da Fé’ apresentou perfil alélico idêntico a dois indivíduos da cultivar ‘Ropades 398’. Os resultados levam a crer que houve um erro de identificação de muda e que as cultivares ‘Maria da Fé’ e ‘Ropades 398’ são cultivares diferentes uma da outra.

Dois dos três indivíduos analisados da cultivar ‘Maria da Fé’ apresentaram perfis alélicos diferentes de todos os outros indivíduos analisados, indicando que se trata de uma cultivar diferenciada das demais.

Quanto à cultivar ‘Ropades 398’, dos três indivíduos analisados, um apresentou perfil genético diferenciado no marcador UDO 99-009. Uma explicação para a variabilidade encontrada pode ser a segregação mendeliana ocasionada pelo cultivo de plantas supostamente oriundas de semente. Outra explicação provável para a fonte de variação genética pode ser a ocorrência de mutações espontâneas e mesmo a produção de mudas vegetativamente a partir de ramos quiméricos. Embora essa ocorrência seja rara, a mesma não pode ser desconsiderada.

4 CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites GAPU 101, GAPU 11 e 17, GAPU 12, GAPU 45, GAPU 89, GAPU 59, GAPU 71A, GAPU 71B, UDO 99-009, UDO 99-019, UDO 99-031 e UDO 99-039 foram eficientes para a caracterização da identidade genética dos acessos de oliveira;

A Probabilidade de Identidade (PI) acumulada apresentada pelos 12 marcadores microssatélites foi $1,51 \times 10^{-10}$, demonstrando uma grande eficiência dos locos utilizados para a diferenciação das cultivares analisadas;

Os marcadores microssatélites GAPU 101, GAPU 11 e 17, GAPU 12, GAPU 45, GAPU 89, GAPU 59, GAPU 71A, GAPU 71B, UDO 99-009, UDO 99-019, UDO 99-031 e UDO 99-039 foram eficientes para a identificação de cultivares sinônimas e possíveis erros de denominação em genótipos de oliveira presentes no Banco de Germoplasma da EPAMIG;

As cultivares ‘Ascolano USA’ e ‘Santa Catalina’; ‘Tafahi 390’ e ‘Ascolano 323’; ‘Zalmate’ e ‘Zalmate 0010’; ‘Negroa’ e ‘Galega’; ‘JB1’, ‘Clone 112’, ‘Alto D’oro’ e ‘Mission’ são cultivares sinônimas de oliveira;

Os marcadores microssatélites foram uma ferramenta eficiente e robusta para definição de grupo heteróticos no universo amostral de oliveira analisada, sendo de grande utilidade para o processo de pré-melhoramento dessa espécie; e

Os acessos de oliveira pertencentes ao Banco de Germoplasma da Epamig constituem uma população de base genética variada, contendo indivíduos com grande diversidade genética.

REFERENCIAS

ALBA, V. et al. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 11–16, 2009.

BALDONI, L. et al. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 24, p. 213–231, 2009.

BESNARD, G. et al. The origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., Oleaceae). **Heredity**, Western, v. 99, p. 608–619, 2007.

CARRIERO, F. et al. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 301–307, 2002.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal Human Genetic**, Boston, v. 19, p. 233–257, 1967.

CHAFARI, J. et al. Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 55, p. 893–900, 2008.

CIPRIANI, G. et al. Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 223–228, 2002.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biological Report**, New York, v. 4, p. 299–306, 2001.

DIAZ, A. et al. Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 2, p. 165–175, 2006.

DOVERI, S. et al. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, p. 367–373, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics**, Oxford, v. 1, p. 47-50, 2005.

GANINO, T. et al. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 54, p. 1531–1540, 2007.

GIL, F. S. et al. Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 1275–1277, 2006.

GLAUBITZ, J. C. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p. 309-310, 2004.

GOMES, S. et al. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. **Plant Molecular Biological Report**, New York, v. 27, p. 365–373, 2009.

HANNACHI, H. et al. Oleaster (var. *sylvestris*) and subsp. *cuspidata* are suitable genetic resources for improvement of the olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 56, p. 393–403, 2009.

LIU, K. J.; MUSE, S. V. Power marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

MARTINS LOPES, P. et al. Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. ‘Cobrancosa’ by molecular markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 82–89, 2009.

MOOKERJEE, S. et al. Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 1174–1182, 2005.

MUZZALUPO, I. et al. Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers. **Advanced Horticultural Science**, Florença, v. 22, p. 142–148, 2008.

MUZZALUPO, I.; PELLEGRINO, M.; PERRI, E. Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. **European Food Research and Technology**. Bad Feilnbach, v. 224, p. 469-475, 2007.

OMRANI-SABBAGHI, A. et al. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 439–447, 2007.

PASQUALONE, A. et al. Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 3857-3862, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288-295, 2006.

POLJUHA, D. et al. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, p. 223–230, 2008.

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

RALLO, P.; DORADO, G.; MARTIN, A. Application of microsatellite markers in olive breeding. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 586, p. 60–62, 2000.

RAPOPORT, H. F. Botánica y morfología. In: BARRANCP, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR R, R. L. (Ed.). **El cultivo del olivo**. 2. ed. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía; Madrid: Mundi-Prensa, 1998. p. 35–36.

RONY, C. et al. Molecular characterization of Lebanese olive germplasm. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 5, p.109–115, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. ‘The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406–425, 1987.

SARRI, V. et al. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 1606–1615, 2006.

TAAMALLI, W. et al. Agronomic and molecular analyses for the characterization of accessions in Tunisian olive germplasm collections. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 9, n. 5, p. 468–481, 2006.

WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 249–256, 2001.

APÊNDICE

Número de alelos exclusivos detectados por cada marcador e em cada população

Loco	Alelos	Populações				Alelos exclusivos
		1	2	3	4	
GAPU 101	1	0,0455	0	0	0	A
GAPU 101	2	0,1364	0,2667	0,1667	0,15	
GAPU 101	3	0	0,0667	0	0	B
GAPU 101	4	0,0455	0	0	0,2	
GAPU 101	5	0,2727	0,2333	0,4583	0,1	
GAPU 101	6	0,2273	0,3333	0	0,15	
GAPU 101	7	0,0455	0	0	0	A
GAPU 101	8	0,0455	0,0333	0	0,275	
GAPU 101	9	0,0455	0	0	0,125	
GAPU 101	10	0,1364	0,0667	0,375	0	
GAPU 59	1	0,25	0	0	0,4	
GAPU 59	2	0,25	0,2188	0	0,45	
GAPU 59	3	0,3333	0,5625	0,1667	0,15	
GAPU 59	4	0,1667	0,2188	0,8333	0	
GAPU 11 e 17	1	0,2917	0,1875	0,1667	0	
GAPU 11 e 17	2	0,0417	0	0	0	A
GAPU 11 e 17	3	0,0833	0,0625	0,4167	0,25	
GAPU 11 e 17	4	0,125	0,0625	0	0	
GAPU 11 e 17	5	0,4583	0,6875	0,4167	0,75	
GAPU 12	1	0,2083	0	0,2083	0	
GAPU 12	2	0,0833	0	0	0	A
GAPU 12	3	0,6667	1	0,7917	1	
GAPU 12	4	0,0417	0	0	0	A

continuação

Loco	Alelos	Populações				Alelos exclusivos
		1	2	3	4	
UDO 99-009	1	0,0455	0	0	0,0588	
UDO 99-009	2	0,3636	0,375	0,625	0,1176	
UDO 99-009	3	0,5909	0,625	0,375	0,8235	
UDO99-019	1	0,0455	0	0	0	A
UDO 99-019	2	0,0455	0	0,3333	0	
UDO 99-019	3	0,2273	0,125	0,2083	0	
UDO 99-019	4	0,5909	0,375	0,4583	0,9	
UDO 99-019	5	0,0909	0,5	0	0,1	
UDO 99-031	1	0	0	0	0,1176	D
UDO 99-031	2	0,2727	0,5	0	0,1765	
UDO 99-031	3	0,0455	0	0	0	A
UDO 99-031	4	0,0909	0	0,1364	0,2059	
UDO 99-031	5	0,0455	0	0,0909	0	
UDO 99-031	6	0,0909	0	0,3182	0,1471	
UDO 99-031	7	0	0	0	0,0588	D
UDO 99-031	8	0,3182	0,4667	0,1364	0,1471	
UDO 99-031	9	0,1364	0,0333	0,3182	0,1471	
UDO 99-039	1	0,2083	0,2188	0,4167	0,175	

continuação

Loco	Alelos	Populações				Alelos exclusivos
		1	2	3	4	
UDO 99-039	2	0,25	0,0312	0,125	0,175	
UDO 99-039	3	0,0833	0,3125	0	0,05	
UDO 99-039	4	0	0	0	0,025	D
UDO 99-039	5	0,0833	0	0	0,1	
UDO 99-039	6	0	0	0	0,1	D
UDO 99-039	7	0,2917	0,4375	0,4583	0,35	
UDO 99-039	8	0,0833	0	0	0,025	
GAPU 45	1	0,05	0,3333	0,3636	0,0526	
GAPU 45	2	0,15	0,0333	0	0,0526	
GAPU 45	3	0,05	0	0	0,0263	
GAPU 45	4	0,05	0	0	0	A
GAPU 45	5	0,55	0,6	0,6364	0,5789	
GAPU 45	6	0,15	0,0333	0	0,2895	
GAPU 71A	1	0,0833	0,4062	0	0,225	
GAPU 71A	2	0,0417	0	0	0,1	
GAPU 71A	3	0,2917	0	0,9167	0,05	
GAPU 71A	4	0	0	0	0,175	D
GAPU 71A	5	0	0,1875	0	0	B
GAPU 71A	6	0,2083	0,0312	0	0,15	
GAPU 71A	7	0,3333	0,375	0,0833	0,3	
GAPU 71A	8	0,0417	0	0	0	A
GAPU 71B	1	0,125	0	0	0	A
GAPU 71B	2	0,4167	0,5	0,5417	0,5789	
GAPU 71B	3	0,125	0	0	0	A

continuação

Loco	Alelos	Alelos exclusivos			
		1	2	3	4
GAPU 71B	4	0,3333	0,5	0,4583	0,4211
GAPU 89	1	0,0417	0,0312	0	0,25
GAPU 89	2	0,1667	0,1875	0,375	0,075
GAPU 89	3	0,0833	0,2188	0	0,15
GAPU 89	4	0,2917	0,1562	0	0
GAPU 89	5	0,0417	0	0,3333	0
GAPU 89	6	0,375	0,4062	0,2917	0,525

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE UMA CULTIVAR DE OLIVEIRA

RESUMO

Ainda existem controvérsias sobre a forma predominante de propagação sexuada da oliveira. Estudos indicam que durante a autopolinização de plantas de oliveira os tubos polínicos não são capazes de crescer através do pistilo e atingir o óvulo para que ocorra fecundação, diferentemente de tubos polínicos resultantes da polinização cruzada, indicando um sistema de autoincompatibilidade. Há também relatos indicando a existência de autoincompatibilidade e incompatibilidade cruzada para a espécie. O objetivo deste estudo foi comprovar através do uso de marcadores microsatélites a identidade genética de oitos acessos de oliveira supostamente pertencentes a cultivar 'Arbequina' utilizando um acesso de 'Arbequina' pertencente ao Banco de Germoplasma da EPAMIG como material padrão. Nesse estudo, foram empregados 9 marcadores SSR: GAPU 101, GAPU 59, UDO 99-009, UDO 99-019, UDO 99-036, UDO 99-039, GAPU 45, GAPU 71A, GAPU 71B e GAPU 89. A comprovação da fidelidade genética foi realizada pelo aplicativo "GenAlex 6". Os resultados obtidos indicam com uma Probabilidade de Identidade (PI) acumulada de $2,9 \times 10^{-3}$ e uma Probabilidade de Exclusão igual 0,86 que os materiais analisados realmente pertencem a cultivar 'Arbequina'.

ABSTRACT

With respect to the olive, there is still controversy about how sexual reproduction works for this specie. Studies indicate that during the pollination of olive plants, the pollen tubes are unable to grow through the pistil and reach the egg for fertilization events, unlike pollen tubes resulting from cross-pollination, indicating a system of self-incompatibility. There are also reports indicating the existence of self-incompatibility and cross-species incompatibility. The aim of this study was evaluate the genetic identity of accessions of eight olive genotypes apparently belonging to the cultivar 'Arbequina' by using microsatellite markers. For this purpose, we used an 'Arbequina' accession from the EPAMIG Olive Germplasm Bank as standard genotype. In this study, nine SSR markers were evaluated: GAPU 101, GAPU 59, UDO 99-009, UDO 99-019, UDO 99-036, UDO 99-039, GAPU 45, GAPU 71A, GAPU 71B, and GAPU 89. Evidence of genetic fidelity was performed by the application "GenAlex 6". The results indicate with an accumulated probability of identity (PI) of 2.9×10^{-3} and a probability of exclusion of 0.86 that the genetic identity of all evaluated materials are similar to the 'Arbequina' standard cultivar.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Olea* L. (*Oleaceae*) é constituído por aproximadamente 30 espécies que se encontram distribuídas pela Europa, Ásia e África, América e Oceania. A oliveira (*Olea europaea* L.), a mais conhecida e importante espécie do gênero, é nativa da Bacia do Mediterrâneo e inclui várias cultivares economicamente importantes e genótipos selvagens (LOUREIRO et al., 2007). As cultivares de oliveira apresentam ampla variação do teor de óleo, tamanho dos frutos, forma da copa e diferentes níveis de adaptação às condições ambientais locais (CORDEIRO et al., 2008).

A preservação da grande variabilidade genética da oliveira pode ser explicada pelo reduzido impacto da erosão genética e a baixa pressão de programas de melhoramento para esta espécie. Com os avanços nos estudos e técnicas utilizados na taxonomia e reprodução vegetal, tem sido possível conhecer melhor as cultivares de oliveira (GANINO et al., 2007). A origem e a distribuição geográfica da variabilidade da oliveira cultivada é objeto de vários estudos. De acordo com Essadki et al. (2006), as cultivares de oliveira foram distribuídas por inúmeras e sucessivas migrações humanas em toda a bacia do Mediterrâneo, especialmente do Oriente para o Ocidente. Supõe-se que a maioria das cultivares modernas foram obtidas a partir do cruzamento das cultivares antigas ou pelo seu cruzamento com plantas silvestres, seguido pela seleção local (CORDEIRO et al., 2008). Para Essadki et al. (2006) as cultivares de oliveira são resultantes da propagação vegetativa de indivíduos superiores os quais foram selecionados de maneira empírica pelos olivicultores.

Inicialmente, a identificação dos genótipos de oliveira era baseada em características e diferenças morfológicas existentes entre as cultivares. No entanto, como a maioria dos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são fortemente influenciados por fatores ambientais e fenologia da planta, esses métodos apresentam resultados variáveis e passíveis de avaliações subjetivas. No caso específico da oliveira, a grande diversidade e

a proximidade genética entre muitas das cultivares resultantes da domesticação local, levam a confusão e erros na denominação das mesmas não apresentando-se raros os casos de homonímia e sinonímia (ESSADKI et al., 2006). Atualmente, métodos baseados em marcadores de DNA vêm sendo utilizados com grande eficiência e precisão nos estudos de identificação genética de cultivares, estabelecimento de filogenias e mapeamento de genomas de plantas, com resultados que não são influenciados pelas condições ambientais e pelo estado fenológico da planta.

No contexto mundial, o Brasil se posiciona entre os maiores importadores dos produtos de oliveira (*Olea europaea* L.). Argentina, Peru, Chile, Espanha e Portugal são os maiores fornecedores destes produtos para o Brasil (FAGUNDES, 2004). Cerca de 95% da produção mundial da cultura concentra-se na Espanha, Itália, Grécia, Portugal, Turquia e Síria (GOMES et al., 2009).

Os problemas de identificação de genótipos, a ampla diversidade, a ausência de programas de certificação de mudas, a inexistência de uma legislação específica para a propagação da cultura e a possibilidade da perpetuação de caracteres desejáveis através da propagação assexuada contribuíram para o atual cenário da olivicultura brasileira. No País, ainda não se conhece a identidade e origem genéticas de grande parte das cultivares que foram introduzidas e que estão sendo cultivadas, assim como a comprovação dos parentais (“pedigree”) de genótipos resultantes de programas de melhoramento nacionais.

No Brasil, uma das cultivares de oliveira mais plantada é de origem espanhola denominada ‘Arbequina’, conhecida pela sua precocidade, aptidão para produção de azeite e alta produção. Na Espanha, a cultivar ‘Arbequina’ também é uma das mais cultivadas devido as suas características de vigor vegetativo, precocidade, alto rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças e ainda, é considerada uma das 24 cultivares espanholas ditas como principais, por sua dominância em algumas das regiões e por ser a base genética de pomares comerciais (DEL RIO;

CABALLERO, 2006; OLIVEIRA et al., 2003). De acordo com Vossen (2007), a ‘Arbequina’ é um genótipo autoincompatível, amplamente cultivado nos países produtores, inclusive em pomares com altas densidades, possui grande resistência ao frio, frutos pequenos, com 22 a 27% de óleo e baixo teor de polifenóis.

A Coordenadoria de Assistência Técnica Integral do Estado de São Paulo (CATI) possui uma coleção de cultivares de oliveira, incluindo acessos de ‘Arbequina’. O objetivo desse trabalho foi verificar, com o uso de marcadores microssatélites, a identidade genética de oito genótipos de oliveira supostamente pertencentes à cultivar ‘Arbequina’.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Neste estudo foram utilizadas e analisadas 8 plantas de oliveira supostamente pertencentes a cultivar 'Arbequina', que são cultivadas na coleção de germoplasma de oliveira da CATI localizada em São Bento do Sapucaí, São Paulo. De cada planta adulta, foram retiradas duas amostras que consistiram de brotações novas. Para comprovar a identidade genética desses oito acessos, foi utilizada como controle positivo uma amostra de tecido foliar da planta denominada oliveira da cultivar 'Arbequina' mantida no Banco de Germoplasma de Oliveira da EPAMIG, localizado na Fazenda Experimental no município de Maria da Fé, Sul do Estado de Minas Gerais.

2.2 Extração de DNA

As folhas retiradas foram colocadas em um saco plástico devidamente identificado com o número da planta amostrada seguido pelo número da amostra. Para o transporte das amostras até o laboratório, os sacos plásticos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo. No laboratório, as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1990) incluindo pequenas modificações. De cada amostra foram utilizados, aproximadamente 0,5 g de tecido foliar, que foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, CTAB 2% (p/v), PVP 0,1% (p/v), mercaptoetanol 0,2% (v/v)), os extratos foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL e incubados a 65 °C durante 1 hora em banho-maria, com agitação suave e constante. Passado esse tempo, foram adicionados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitados gentilmente durante 5 minutos. Em seguida o

extrato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos e a fase aquosa do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitados gentilmente durante 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e adicionado 1 mL de isopropanol gelado e 100 μ L de acetato de amônia (7,5 M) e novamente foram levemente agitados. As amostras foram incubadas a -20 °C “overnight” e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos para a formação dos “pellets” de DNA, que foram então lavadas 3 vezes com etanol 70%, secas a temperatura ambiente e logo em seguida, ressuspensas em 200 μ L de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 1mM]. Finalmente, foram tratadas com RNase-A e incubadas a 37 °C por 1 hora.

As amostras de DNA foram visualizadas em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo (0,2 μ g/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] sob luz UV para verificar a integridade do DNA genômico extraído (Figura 1). A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorvâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

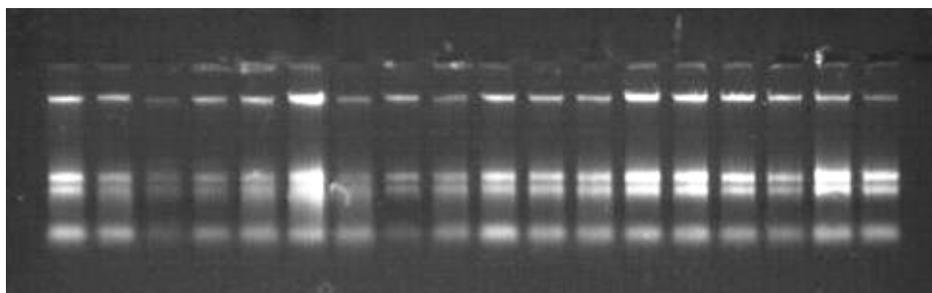


Figura 1 Foto de gel de agarose com amostras do DNA total antes do tratamento de digestão de RNase extraído das plantas de oliveira supostamente da cultivar ‘Arbequina’

2.3 Análises com marcadores microssatélites

Foram usados 9 (nove) marcadores microssatélites previamente desenvolvidos e validados para a espécie *Olea europaea* L. Os marcadores utilizados foram: GAPU 101, GAPU 59, GAPU 89 (CARRIERO et al., 2002), GAPU 71A, GAPU 71B (CHAFARI et al., 2008), UDO 99-009, UDO 99-019, UDO 99-036 e UDO 99-039 (CIPRIANI et al., 2002). O número de identificação utilizado no trabalho, o nome dos microssatélites, referências bibliográficas utilizadas e tamanho esperado estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Nome dos iniciadores microssatélites, suas sequências, referências bibliográficas e tamanho esperado dos alelos (pares de base)

Iniciadores	Sequência	Referência	Tamanho dos alelos
<i>Forward</i> GAPU 101	CATGAAAGGAGGGGGACATA	Carriero et al (2002)	264
<i>Reverse</i> GAPU 101	GGCACTTGTTGTGCAGATTG		
<i>Forward</i> GAPU 59	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	Chafari et al. (2008)	207-222
<i>Reverse</i> GAPU 59	CAAAGGTGCACTTTCTCTCG		
<i>Forward</i> UDO 99-009	TTGATTTACATTGCTGACCA	Cipriani et al. (2002)	119
<i>Reverse</i> UDO 99-009	CATAGGGAAGAGCTGCAAGG		
<i>Forward</i> UDO 99-019	TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG	Cipriani et al. (2002)	165
<i>Reverse</i> UDO 99-019	GGCCTGATCATCGATACCTC		
<i>Forward</i> UDO 99-036	AACACTGTGCCACCTCAACA	Chafari et al. (2008)	141--153
<i>Reverse</i> UDO 99-036	GAACCCAACCCCATCTTAC		
<i>Forward</i> UDO 99-039	AATTACCATGGGCAGAGGAG	Cipriani et al. (2002)	170
<i>Reverse</i> UDO 99-039	CCCCAAAAGCTCCATTATTGT		
<i>Forward</i> GAPU 71 A	GATCATTTAAAATATTAGAGA GAGAGA	Chafari et al. (2008)	209-259
<i>Reverse</i> GAPU 71 A	TCCATCCATGCTGAACTT		

Tabela 1, continuação

Iniciadores	Sequência	Referência	Tamanho dos alelos
<i>Forward</i> GAPU 71 B	GATCAAAGGAAGAAGGGGAT	Chafari et al. (2008)	118-144
<i>Reverse</i> GAPU 71B	ACAACAAATCCGTACGCTTG		
<i>Forward</i> GAPU 89	GATCATTCCACACACGAGAG	Carriero et al. (2002)	215
<i>Reverse</i> GAPU 89	AACACATGCCACAAACTGA		

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30 μL , contendo 50 ng de DNA, 6 μL de tampão de reação 5X, 1,5 mM de MgCl_2 , 200 μM DNTPs, 0,5 μM cada iniciador e 0,75 U Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) programado para um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95 $^\circ\text{C}$. Em seguida foi utilizado um sistema “touchdown” para amplificação. Para os marcadores GAPU 101, GAPU 59, UDO 99-009, UDO 99-019, GAPU 71A, GAPU 71B e GAPU 89 utilizaram-se as seguintes temperaturas e números de ciclos: 45 ciclos - Desnaturação 95 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto, anelamento dos iniciadores (temperatura variando de 62 a 58 $^\circ\text{C}$, durante os 5 primeiros ciclos e 57 $^\circ\text{C}$ para os demais ciclos) por 50 segundos, extensão dos iniciadores 72 $^\circ\text{C}$ por 50 segundos.

Nos marcadores UDO99-036 e UDO99-039 foram utilizados 45 ciclos: Desnaturação 95 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto, anelamento dos iniciadores (temperatura variando de 65 a 56 $^\circ\text{C}$, durante os 10 primeiros ciclos e 55 $^\circ\text{C}$ para os demais ciclos) por 50 segundos, extensão dos iniciadores 72 $^\circ\text{C}$ por 50 segundos. Para todas as reações, foi realizado um passo de extensão final a 72 $^\circ\text{C}$ por 4 minutos.

Para confirmar a qualidade final dos produtos das reações de amplificação, alíquotas de 5 μL das amostras foram submetidas à

eletroforese em gel de agarose 0,7% imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM], corado com brometo de etídeo (0,2 µg/mL) e visualizado em luz UV.

2.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

Uma vez confirmado o sucesso das reações de amplificação em géis de agarose a 0,7%, foi utilizado o volume de 6 µL do produto da reação, acrescido de 3 µL de tampão de corrida, no processo de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, numa potência de 60 W por tempo variável de acordo com o tamanho esperado dos alelos.

Após a corrida os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Creste et al. (2001). Inicialmente o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultra-pura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico 1,5%. Passou então por nova lavagem e foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 µL de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos. Finalmente o gel foi imerso em solução de parada composta de ácido acético (1,5%) durante 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sobre mesa agitadora e em capela de exaustão. Depois de seco em temperatura ambiente o gel foi fotografado sobre negatoscópio.

2.5 Análises dos dados

A partir dos perfis alélicos gerados com os 9 locos microssatélites para as 8 plantas de oliveira, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada locos foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos no locos. Utilizando o aplicativo computacional “GenAlex 6”

(PEAKALL; SMOUSE, 2006) foram estimados os seguintes parâmetros: Probabilidade de Identidade acumulada e Probabilidade de Exclusão (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da eletroforese em gel desnaturante, é possível observar que os perfis de bandas gerados com as oito amostras avaliadas coincidem com o padrão de bandas da planta controle, demonstrando que os acessos de oliveira testados realmente pertencem ao mesmo genótipo da cultivar ‘Arbequina’, e que provavelmente trata-se de plantas oriundas de propagação vegetativa.

Alguns trabalhos relatados na literatura também confirmam a viabilidade no uso de marcadores moleculares para a identificação genética e avaliação de polinização cruzada em oliveira. Mookerjee et al. (2005) ao analisarem a paternidade através do uso de 8 marcadores do tipo microssatélite, enfatizaram a eficiência da metodologia para determinar a frequência e a porcentagem da contribuição de doadores de pólen na fecundação de plantas matrizes em um pomar misto de oliveira. Nesse trabalho, os autores observaram que para as 13 cultivares avaliadas, raramente foi observado autofecundação. Diaz et al. (2006) avaliaram a autoincompatibilidade testando sementes obtidas de plantas matrizes das cultivares ‘Picual’ e ‘Arbequina’ utilizando 4 marcadores microssatélites e concluíram que essas cultivares são auto-incompatíveis. Guerin e Sedgley (2007) confirmaram a ocorrência da autoincompatibilidade e da incompatibilidade cruzada em oliveira ao analisarem, com o uso de marcadores microssatélites, a polinização cruzada e a autopolinização em oliveiras cultivadas em dois locais distintos.

Com o uso dos 9 locos, o resultado da análise feita com o aplicativo “GenAlex” v. 6 mostrou que a probabilidade de identidade acumulada obtida foi de $2,9 \times 10^{-3}$ (Figura 2), o que corresponde a um potencial, do ponto de vista estatístico, de distinção de cerca de 2.900 cultivares. Ou seja, a probabilidade de se encontrar um genótipo idêntico é de 1 em cada 2.900 variedades. Alguns autores consideram que o número de cultivares de oliveira varia entre 1.600 a 2.500 (ANTHELME; ABDOULKADER;

BESNARD, 2008; CHAFARI et al., 2008; CORDEIRO et al., 2008; DIAZ et al., 2006; GRATI-KAMOUN et al., 2006; NATALI et al., 2007; OSKAYA et al., 2006). Diante dessa informação e considerando o valor de Probabilidade de Identidade (PI) obtido, podem-se considerar como pertencentes a cultivar 'Arbequina' as amostras analisadas no presente trabalho.

O parâmetro PI está relacionado à probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente possuir perfil genético idêntico e serem diferentes. Cabral (2008) em um trabalho de caracterização molecular de nogueiras no qual utilizou 10 marcadores microssatélites obteve um PI acumulado de $2,27 \times 10^{-4}$. Schuck et al. (2009) obtiveram o valor de 2.13×10^{-12} em um trabalho de caracterização molecular de videiras. Hvarleva et al. (2007) obtiveram o valor de $5,46 \times 10^{-1}$ para a probabilidade de identidade acumulada em um estudo de caracterização de girassóis. Segundo os autores, o alto valor de PI obtido deve-se ao baixo número de alelos gerados por marcadores, bem como à desigualdade na distribuição das frequências alélicas por loco.

Outra variável analisada nesse estudo foi a Probabilidade de Exclusão (PE). O valor encontrado da probabilidade de exclusão acumulada foi de 0,86. (Figura 3). Esse parâmetro, cujo valor pode variar de 0 a 1,0, demonstra a probabilidade de um indivíduo específico não ter contribuído com o material genético encontrado em outro indivíduo. Tanto a PI como a PE indicam se duas amostras possuem ou não o mesmo genótipo (VIEIRA et al., 2009).

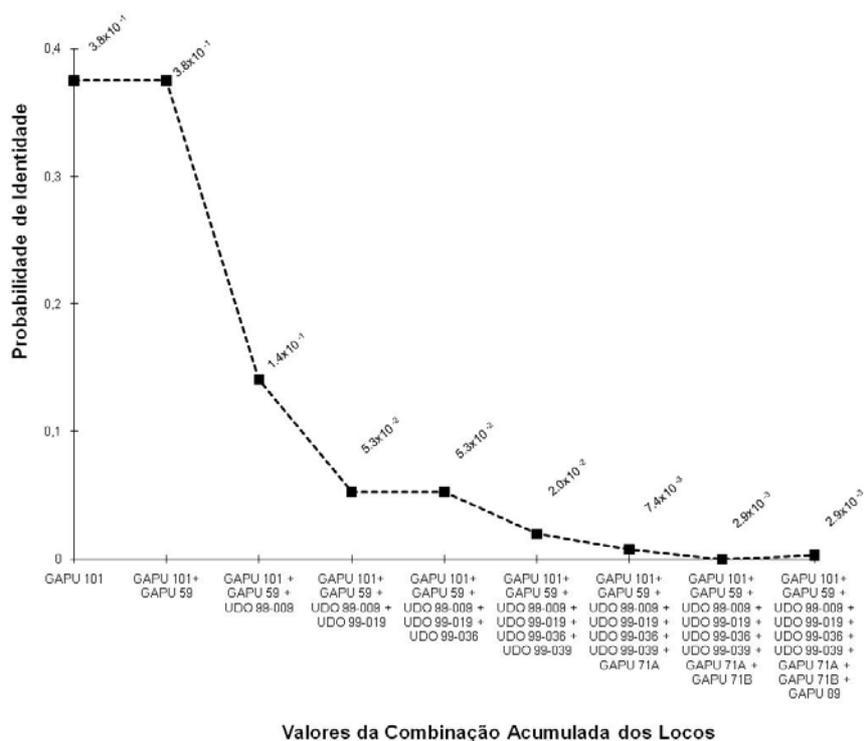


Figura 2 Variação da Probabilidade de identidade (PI) de acordo com o acúmulo do valor PI de cada loco

Oliveira, Vieira e Schuster (2010) em um trabalho de construção de um banco de dados moleculares para identificação de cultivares de soja no Brasil obtiveram um PE igual a 0,99, mesmo valor que Salzer et al. (2009) obtiveram em um estudo de caracterização molecular de pinheiro (*Pinus cembra* L.).

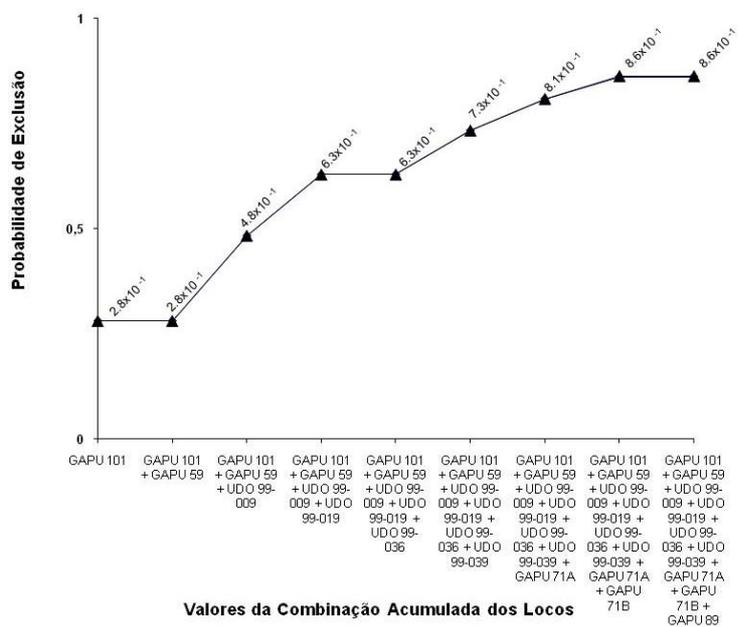


Figura 3 Variação da Probabilidade de Exclusão (PE) de acordo com o acúmulo do valor PI de cada loco

4 CONCLUSÃO

Os oito acessos de oliveira pertencentes a CATI e avaliados pelos marcadores microssatélites são geneticamente similares a cultivar ‘Arbequina’ para os marcadores avaliados;

O emprego de 9 marcadores microssatélites foi suficiente para realizar a identificação genética dos oito acessos de oliveira analisados; e

A metodologia empregada nesse estudo demonstrou que os marcadores microssatélites podem ser utilizados em trabalhos de rotina para identificação genética de plantas matrizes e em programas de certificação de mudas de oliveira.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, pode-se constatar que com o trabalho realizado foi possível gerar importantes informações a respeito da coleção de germoplasma de oliveira da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, uma das maiores e mais antiga existente no Brasil, assim como dos materiais propagativos fornecidos pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada - CATI.

Verificou-se que marcadores moleculares microssatélites possuem grande eficiência na diferenciação dos genótipos e que o universo de 60 acessos amostrados possui genótipos com grande dissimilaridade genética entre eles, genótipos geneticamente muito próximos e indivíduos comprovadamente identificados como sinônimos de outros genótipos, o que pode ser um possível indicativo de problemas de manejo de material propagativo (mudas) e da informação acerca das plantas mantidas no campo. Porém, comprovou-se também ampla diversidade das cultivares e possíveis grupos heteróticos.

Por outro lado, os microssatélites foram precisos e acurados na confirmação da identidade genética dos materiais de oliveira provenientes da CATI, confirmando sua similaridade com a cultivar 'Aberquina'.

O presente trabalho garante robustez nos resultados e independência de fatores ambientais durante a caracterização de cultivares de oliveira.

Concluindo, é importante ressaltar que os resultados gerados são apenas o início de um longo trabalho de pesquisa, destinado a essa cultura de cultivo tão recente no Brasil, servindo como importante pilar para futuros programas de melhoramento genético, destinados a otimizar o cultivo e produção da oliveira nas condições nacionais, assim como na promoção do correto manejo e conservação dos recursos genéticos de oliveira disponíveis em bancos de germoplasma e na possibilidade de proteção intelectual de novas cultivares com descritores mais precisos e incontestáveis.

REFERÊNCIAS

- ANTHELME, F.; ABDOULKADER, A.; BESNARD, G. Distribution, shape and clonal growth of the rare endemic tree *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (*Oleaceae*) in the Saharan mountains of Niger. **Plant Ecology**, Murdoch, v. 198, p. 73–87, 2008.
- CABRAL, E. M. F. M. **Caracterização molecular de variedades de Nogueira (*Juglans regia* L.) portuguesas**. 130 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade) - Universidade do Porto, Porto, 2008.
- CARRIERO, F. et al. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 301–307, 2002.
- CHAFARI, J. et al. Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 55, p. 893–900, 2008.
- CIPRIANI, G. et al. Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 223–228, 2002.
- CORDEIRO, A. I. et al. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. **BIOLOGIA PLANTARUM**, Heidelberg, v. 52, n. 4, p. 642-647, 2008.
- DIAZ, A. et al. Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olive assessed by SSR markers. **Journal on the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 2, p. 181-301, Mar. 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p. 13-15, 1990.

ESSADKI, M. et al. ISSR variation in olive-tree cultivars from Morocco and other western countries of the Mediterranean Basin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 53, p. 475–482, 2006.

FAGUNDES, V. Oliveiras: Epamig aposta no potencial da azeitona e do puro azeite de Minas. **Minas Faz Ciência**, Belo Horizonte, n. 19, p. 16-20, 2004.

GANINO, T. et al. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 54, p. 1531–1540, 2007.

GOMES, S. et al. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. **Plant Molecular Biological Report**, New York, v. 27, p. 365–373, 2009.

GRATI-KAMOUN, N. et al. Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 53, p. 265–275, 2006.

GUERIN, J.; SEDGLEY, M. Cross-pollination in olive cultivars. In: **RURAL Industries Research and Development Corporation**. Kingston: ACT, 2007. 51 p.

HVARLEVA, T. et al. Characterization of bulgarian sunflower cultivars and inbred lines with microsatellite markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 21, p. 408-412, 2007.

LOUREIRO, J. et al. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 54, p. 21–25, 2007.

MOOKERJEE, S. et al. Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 1174–1182, 2005.

NATALI, L. et al. Isolation of *Ty1*-copia putative LTR sequences and their use as a tool to analyse genetic diversity in *Olea europaea*. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 19, p. 255–265, 2007.

OLIVEIRA, A. F. et al. Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 332-338, 2003.

OLIVEIRA, M. B.; VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I. Construction of a molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 705-720, 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288-295, 2006.

SALZER, K. et al. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 858-861, 2009.

SCHUCK, M. R. et al. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 487-495, 2009.

VIEIRA, E. S. N. et al. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1460-1466, 2009.

VOSSSEN, P. Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. **Hortscience**, Alexandria, v. 42, n. 5, p. 1093–1100, 2007.

WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 249-256, 2001.