



Indução e manutenção de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Olea europaea* L., cv. 'Galega vulgar'

IX Simpósio Nacional de Olivicultura, Oeiras, 25 - 27 Novembro 2021



Rita Pires¹, Hélia Cardoso², Augusto Ribeiro³, António Cordeiro⁴ & Augusto Peixe⁵

¹IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora (rnpires@uevora.pt)

²MED—Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, IIFA, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora.

³DespertaFolia Lda., Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal.

⁴Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.) - UEISBRG, Estrada de Gil Vaz – Ap. 6, 7351-901 Elvas.

⁵MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora.

Cofinanciamento:



Resumo

Barras nas figuras: 0.5 µm

A embriogénese somática (ES) pode ser descrita como uma técnica de regeneração de plantas *in vitro* que envolve a formação de estruturas semelhantes a embriões zigóticos não requerendo o processo de fertilização.

Para além de se apresentar como um sistema eficiente de propagação clonal, a regeneração de plantas por ES, por permitir obter plantas a partir de uma célula única, apresenta-se também como a técnica mais apropriada para auxiliar os programas de melhoramento envolvendo transformação genética e mutagenese.

Em oliveira (*Olea europaea* L.), a ES não tem sido amplamente utilizada para propagação de plantas e poucas foram as cultivares estabelecidas *in vitro* com resposta embriogénica eficiente. Para além disto, a obtenção de embriões somáticos a partir de material adulto tem-se apresentado difícil.

Considerando o interesse no estabelecimento de um protocolo de ES que possa ser utilizado não apenas para propagação clonal de cvs. Portuguesas de elite, mas também em trabalhos de transformação genética, tem vindo a ser desenvolvido um trabalho de investigação focado no estabelecimento de um protocolo de ES para a cv. 'Galega vulgar'.

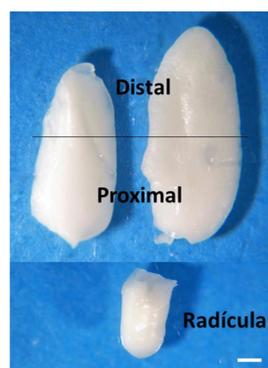
Metodologia



Sementes obtidas de frutos maduros de 'Galega vulgar' foram submetidas a um processo de desinfeção tal como descrito por Pires *et al.* (2020) e posteriormente foi removido o embrião zigótico utilizado como explante inicial para indução da ES.

1. Indução

Meio OMc*1
5 µM 2iP + 25 µM AIB



21 DIAS

2. Expressão

Meio OMc*1
Sem reguladores



30 DIAS

3. ES repetitiva

Meio ECO*2
0.5µM 2iP + 0.44 µM BA + 0.23 µM AIB



CONDIÇÕES DE CULTURA: 0h e 16h fotoperíodo; 25°C de temperatura constante.

*1 *Olive medium* com macronutrientes Bourgun e Nitch - Orinos e Mitrakos (1991); *2 *Olive cyclic embryogenesis* - Pérez Barranco *et al.* (2007).

Resultados

Barras nas figuras: 0.5 µm

1. Indução - Aquisição da Competência Embriogénica

A formação de *calli* em meio de indução OMc – fase de indução – foi elevada em todos os explantes (Fig. 1), com um mínimo de 95.3% nos cotilédones distais. Não foram identificadas diferenças significativas associadas ao efeito luz.



Figura 1: Formação de *calli* à luz. (A) Radícula, (B) cotilédone proximal e (C) cotilédone distal. Em alguns casos (A) e (B) verificou-se o desenvolvimento simultâneo de raízes adventícias.

2. Expressão – Rediferenciação Celular

Seguindo o proposto por Orinos e Mitrakos (1991), ao fim de 30 dias em meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento registaram-se os primeiros embriões somáticos (Fig. 2) exibindo diferenças ao nível da coloração dependendo da disponibilidade de luz.

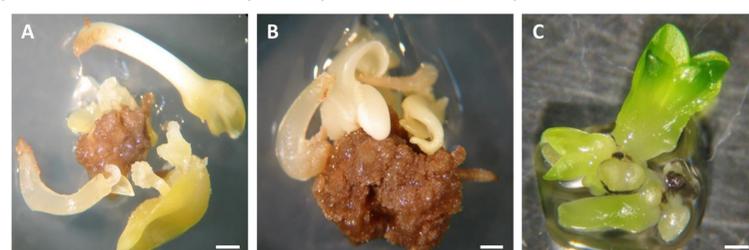


Figura 2: Embriões somáticos formados em todos os explantes em cultura. (A) e (B) na condição escuro e (C) na condição luz.

3. Embriogénese Somática Repetitiva/Cíclica

Foi conseguida **embriogénese repetitiva/cíclica** em ambas as condições de fotoperíodo testadas com a transferência dos *calli* embriogénicos para meio ECO (Fig. 3), de acordo com o proposto por Pérez Barranco *et al.* (2007).



Figura 3: Embriogénese somática repetitiva/cíclica em meio de cultura ECO ao fim de 30 dias.

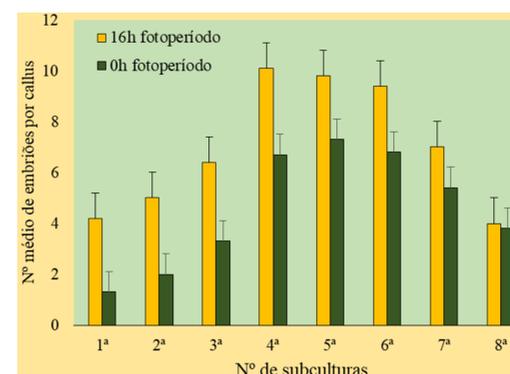


Figura 4: Número médio de embriões nas duas condições de cultura testadas durante as várias subculturas.

O número de embriões aumentou significativamente na condição de 16h de fotoperíodo (Fig. 4).

O número máximo de embriões foi conseguido entre a 4ª e 5ª subculturas.

Conclusões

Ao contrário de várias cultivares de oliveira que se mostram recalcitrantes ao processo de ES, mesmo em material juvenil, a cultivar 'Galega vulgar' demonstrou ser recetiva a esta técnica. Considerando os resultados obtidos antevê-se uma perspetiva animadora para o estabelecimento de um protocolo eficiente de ES em material adulto, o que permitirá a elaboração de projetos de investigação tendo em vista à transformação genética e à multiplicação clonal de cultivares de oliveira consideradas de elite.

Agradecimentos

Trabalho financiado pelo Programa Operacional Regional do Alentejo 2020, Operação - ALT20-03-0246-FEDER-000058 "GESCERTOLIVE", cofinanciado pelo FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional e por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, Projeto UIDB/05183/2020.

Referências

Orinos, T., Mitrakos, K. (1991). *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 27, 183–187.
Pérez-Barranco, G., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. (2007). *Acta Hortic.*, 473–477.
Pires, R., Cardoso, H., Ribeiro, A., Peixe, A., Cordeiro, A. (2020). *Plants*, 9, 758.