

Estabelecimento de um protocolo de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos de *Olea europaea* L., cv. ‘Galega vulgar’

Rita Pires¹, Hélia Cardoso², Augusto Ribeiro³, António Cordeiro⁴ & Augusto Peixe^{5*}

¹IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Largo Marquês de Marialva, Apart. 94, 7002-554 Évora, Portugal, rmpires@uevora.pt

²MED—Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal, hcardoso@uevora.pt

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

⁴Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.) - UEISBRG, Estrada de Gil Vaz – Apartado 6, 7351-901 Elvas, Portugal, antonio.cordeiro@iniav.pt

⁵MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal, * apeixe@uevora.pt

Resumo

Algumas cultivares de oliveiras Portuguesas caracterizam-se pela produção de azeites de alta qualidade, mas apresentam diversos problemas agronómicos de entre os quais se destacam, um vigor excessivo, alta suscetibilidade a stresses bióticos e abióticos e baixa capacidade de enraizamento por estacaria. Isto torna-as fortes candidatas a programas de melhoramento baseados em ferramentas de engenharia genética. O primeiro passo para a implementação destas tecnologias passa pelo desenvolvimento de protocolos que permitam a regeneração de uma planta geneticamente modificada, sendo a embriogénese somática (ES) induzida em tecidos adultos o sistema de eleição. A oliveira, tal como a maioria das espécies lenhosas, apresenta elevada recalcitrância ao estímulo da ES aquando da utilização de material adulto. Assim, o estabelecimento de um protocolo de ES utilizando material juvenil (embriões zigóticos), antecede muitas vezes o estabelecimento de um protocolo eficiente em material adulto. No presente trabalho é descrito um protocolo de ES para a variedade ‘Galega vulgar’, utilizando como explantes iniciais cotilédones e radículas isolados de embriões zigóticos maduros. Os resultados obtidos mostram uma elevada eficiência na formação de *calli* no meio de indução e a obtenção de embriões somáticos no meio de expressão, independentemente do tipo de explante utilizado. Nos *calli* embriogénicos obtidos a partir dos explantes mais reativos, as radículas, foi ainda possível conseguir a expressão de embriogénese cíclica, com um acréscimo significativo das taxas de embriogénese durante as primeiras cinco subculturas, independentemente das condições de cultura testadas.

Palavras-chave: Oliveira; embriões somáticos; embriogénese cíclica; melhoramento; propagação.

Abstract

Some Portuguese olive cultivars are characterized by their high-quality oils, but present several agronomic problems, like the excessive vigour, high susceptibility to biotic and

abiotic stresses and low propagation capacity by cuttings. This makes them strong candidates for breeding programs based on genetic engineering. The first step towards the implementation of these technologies involves the development of protocols that allow the regeneration of a genetically modified plant. Usually, somatic embryogenesis (ES) induced in adult plant tissues is the selected system to assist breeding programs based on genetic engineering approach. The olive tree, as most of the woody plant species, presents high recalcitrance to the stimulus of ES when adult plant material is used as initial explant, which justify the use of juvenile material (zygotic embryos) in the establishment of an efficient ES protocol to further transfer to the adult material. In the present work, an ES protocol is described in cv. 'Galega vulgar' using cotyledons and radicles isolated from mature zygotic embryos as starting material. Acquired results revealed a high efficiency of *calli* formation in the induction medium, as well as the capacity for somatic embryos production on the expression medium, regardless of the explant type used. Using the embryogenic *calli* obtained from the most reactive explants, the radicle, it was also possible to achieve expression of cyclic embryogenesis, with a significant increase in embryogenesis rates being observed during the first 5 subcultures, regardless of the culture conditions tested.

Keywords: Cyclic embryogenesis; Olive; Plant breeding; Propagation; Somatic embryos.

Introdução

A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas passam por um processo de reprogramação a nível molecular, associado a uma série de alterações a nível morfológico e bioquímico, readquirindo as características de uma célula merismática primária, resultando na formação de um embrião somático (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

As tentativas para indução de ES em oliveira foram iniciadas por Rugini (1986, 1988), com a utilização de embriões zigóticos das cultivares 'Frontoio', 'Moraiolo', 'Leccino' e 'Dolce Agogia' como explantes iniciais. Posteriormente, nos trabalhos de Mitrakos et al. (1992), Leva et al. (1995), Trabelsi et al. (2003) e Cerezo et al. (2011), para além de embriões zigóticos, utilizaram-se como explantes iniciais tecidos juvenis provenientes de plântulas *in vitro* e foi possível o estabelecimento de protocolos para novas cultivares.

Ainda que o recurso a embriões zigóticos como explantes iniciais não seja o ideal, devido à heterogeneidade genética inerente, as extrapolações das informações obtidas nestes estudos podem ser fundamentais para a obtenção de resultados em explantes adultos de genótipos selecionados. De um modo geral, o material adulto de oliveira apresenta um comportamento recalcitrante relativamente à indução de ES, ainda que tenham sido registadas algumas exceções, que confirmam a regra. Disso são exemplo a utilização de folhas adultas em alguns genótipos de zambujeiro (Capelo et al., 2010) e nas cvs. 'Canino', 'Moraiolo' e 'Chetoui' (Rugini & Caricato, 1995; Benelli et al., 2001; Trabelsi et al., 2011), ou a utilização de segmentos de folhas retiradas de plantas instaladas *in vitro*, nas cvs. 'Dahbia' e 'Picual' (Mazri et al., 2013; Toufik et al., 2014).

A cv. 'Galega vulgar' é ainda hoje a cultivar mais representativa do olival Português, caracterizada pela produção de um azeite de qualidade ímpar, mas simultaneamente conhecida por apresentar vários problemas agronómicos, que têm conduzido a um desinteresse por parte dos produtores. De entre estes, salienta-se a

dificuldade de propagação por estacaria semilenhosa, situação que tem diminuindo a sua oferta pelos viveiros. Por estes motivos, esta cultivar é uma forte candidata a trabalho de melhoramento com base na aplicação de novas ferramentas biotecnológicas. O objetivo deste estudo foi dar um primeiro passo nesse sentido, procurando obter um protocolo de ES eficaz, inicialmente a partir de explantes juvenis, na expectativa de que a informação obtida possa ser extrapolada para genótipos adultos selecionados.

Materiais e Métodos

Material vegetal e desinfeção

Frutos maduros da cv. ‘Galega vulgar’ foram recolhidos em árvores pertencentes à Coleção Nacional de Referência de Cultivares de Oliveira, instalada no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), em Elvas, Portugal. Após remoção da polpa as sementes foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C durante um mínimo de 60 dias de modo a promover a quebra da dormência fisiológica do embrião.

Previamente ao estabelecimento do ensaio as sementes foram submetidas a um processo de desinfeção superficial. Para isso, as sementes foram removidas do endocarpo, sendo de seguida colocadas em água estéril onde permaneceram por 42 h. Após este período, foram transferidas para uma solução hidro-alcoólica, com 70% de álcool etílico (v/v), onde permaneceram durante 2 minutos. De seguida realizou-se uma lavagem com água bidestilada estéril e as sementes passaram então para uma solução de hipoclorito de cálcio com 10% de cloro ativo (p/v) e 0,1% de Tween-20, mantendo-se sob agitação durante 20 minutos. Por fim, realizaram-se 3 a 4 lavagens com água bidestilada estéril.

Indução/expressão da embriogénese somática

Para a indução de ES os embriões foram dissecados das sementes com auxílio de uma lupa estereoscópica *Olympus SZ60*. A radícula e os cotilédones foram separados, sendo estes últimos ainda divididos em parte proximal e parte distal, sendo de imediato inoculados em placa de Petri, contendo meio de cultura OMc (Cañas & Benbadis, 1988). A formulação base foi suplementada com 0.5 mg L⁻¹ de 2-isopenteniladenina (2-iP), 5 mg L⁻¹ de ácido índole-3-butírico (AIB) (Orinos & Mitrakos, 1991) e 7 g L⁻¹ de *Agar-Powder* (VWR-Portugal). Os explantes permaneceram no meio de cultura durante 21 dias a 25°C, com um fotoperíodo de 16 h, com uma intensidade luminosa de 40–45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou em ausência de luz. Após 21 dias em meio de indução os explantes foram transferidos para meio de expressão OMc sem a adição de reguladores de crescimento. As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 30 dias os explantes foram transferidos para meio fresco de igual composição.

Embriogénese cíclica

Após as duas subculturas no meio de expressão OMc e com o objetivo de tentar a indução de embriogénese cíclica, os *calli* provenientes de radículas (os explantes que apresentaram as melhores taxas de embriogénese no meio de expressão), foram transferidos para meio ECO (Pérez-Barranco et al., 2007).

A formulação do meio ECO é baseada na formulação do meio OMe (*Embryogenesis Olive Medium*) (Cañas & Benbadis, 1988) e contém ¼ de macronutrientes OM (Rugini, 1984), ¼ micronutrientes MS (Murashige & Skoog,

1962), ½ vitaminas OM, 50 mg L⁻¹ mio-inositol, 20 g L⁻¹ sacarose, 550 mg L⁻¹ de L-glutamina e suplementado com 0.5µM de 2iP, 0.44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0.23 µM de AIB e gelificado com 2,5 g L⁻¹ de *Sigma-Phytigel*.

A resposta foi acompanhada durante oito subculturas, sendo cada subcultura realizada após 30 dias para meio fresco de igual composição. As culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas para a fase de indução/expressão.

Delineamento experimental e análise de dados

No ensaio de indução e expressão embriogênica foram utilizados três tipos de explantes (radículas e cotilédones proximais e distais) e duas condições de fotoperíodo (16 h e 0 h). Os ensaios seguiram um delineamento em fatorial completo, considerando cada placa de Petri (com 10 explantes/placa) uma réplica. Foram registrados os dados relativos às taxas de formação de *calli* e número de embriões formados.

Para o ensaio de embriogênese cíclica, os *calli* desenvolvidos a partir das radículas foram transferidos para meio de cultura ECO e submetidos a dois regimes de fotoperíodo (16 h e 0 h). Este ensaio também seguiu um delineamento em fatorial completo, funcionando cada placa de Petri (7 *calli*/placa) como uma réplica. O número de réplicas variou para cada condição de cultura testada, sendo de 10 réplicas o número mínimo considerado.

Todos os dados foram testados para a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguida de um teste de comparação de médias (Fisher-LSD). As diferenças significantes foram registradas para *p*0.05.

Resultados e Discussão

Indução da embriogênese somática

Nas culturas submetidas a um fotoperíodo de 16 h observou-se uma alteração progressiva da coloração dos explantes, que passaram de branco leitoso a verde e o desenvolvimento de *calli* foi visível sobretudo nas regiões periféricas e zonas de corte do explante (Fig. 1, A, B e C). Os *calli* desenvolvidos na ausência total de luz apresentaram uma estrutura mais friável e uma cor que variou do branco, ao amarelo-escuro (Fig. 1, D, E e F). Em ambos os casos, observou-se com frequência o desenvolvimento de raízes adventícias. Padrões de evolução semelhantes tinham sido reportados por Mazri et al. (2011) na cv. ‘Dahbia’.

A taxa de calogênese, registrada 21 dias após o estabelecimento do ensaio, foi elevada nos três tipos de explantes utilizados. No entanto, explantes originários da parte distal dos cotilédones apresentaram uma taxa de formação de *calli* significativamente inferior (95.3%), quando comparada com os outros dois explantes, 98.9% em radículas e 99.3% em explantes da região proximal dos cotilédones.

Níveis elevados de calogênese foram também reportados por Orino & Mitrakos (1991) e por Rugini & Silvestri (2016) nos trabalhos desenvolvidos com a cultura de explantes provenientes de embriões zigóticos, tanto em *Olea europaea* var. *sylvestris*, como na var. *sativa*. Mitrakos et al. (1992), reportam também uma elevada taxa de calogênese, mas grande variabilidade em função do explante inicial, com as taxas mais elevadas a ser sempre associadas à utilização de radículas como explantes iniciais.

Expressão da embriogênese somática

Trinta dias após a passagem dos *calli* para meio de expressão (OMc sem reguladores de crescimento), foi possível observar a formação dos primeiros embriões

somáticos (Fig. 2B, C, D). Os intervalos de confiança obtidos pela análise de comparação de médias, para a interação tipo de explante e condições de cultura (Fig. 2A) mostram diferenças significativas entre a quantidade de embriões obtidos em função do explante utilizado e as condições de cultura. Os *calli* provenientes de radículas apresentam melhores taxas de embriogénese quando comparados com os provenientes de cotilédones, independentemente das condições de cultura (fotoperíodo 16h ou escuro). Por sua vez, quando se comparam entre si os resultados obtidos nos explantes com origem nos cotilédones (distal e proximal), verificaram-se diferenças significativas entre o comportamento dos cotilédones distais em função das condições de cultura, com um maior número de embriões registado na condição 0 h fotoperíodo.

Rugini (1988) e Rugini & Caricato (1995), referiram que a presença de luz pode inibir a ES e reportaram melhores resultados quando as culturas eram mantidas no escuro. Num outro estudo, realizado por Shibli et al. (2001), utilizando a cv. ‘Nabali’, a obtenção de embriões somáticos foi registada apenas em condições de baixa intensidade luminosa.

Estabelecimento de embriogénese cíclica

Após a segunda subcultura em meio de expressão, os *calli* começaram a perder capacidade regenerativa e a tornar-se necrosados, independentemente do explante e das condições de cultura, comportamento já anteriormente referido por Cerezo et al. (2011).

Os *calli* provenientes dos explantes com melhor resposta do meio de expressão, as radículas, foram então transferidos para meio de embriogénese cíclica (meio ECO) e os resultados obtidos relativamente à capacidade embriogénica dos *calli*, podem ser observados na figura 3A. Verifica-se que, logo na primeira subcultura, os *calli* recuperaram a capacidade de crescimento e de formação de embriões, não existindo resposta diferenciada em relação ao tipo de explante e às condições de cultura. Na segunda subcultura, os *calli* continuaram a proliferar e a produzir embriões somáticos. A quantificação da produção de embriões somáticos foi acompanhada até à oitava subcultura, tendo-se verificado um aumento progressivo até à quarta/quinta subcultura, tanto nas culturas submetidas a um fotoperíodo de 16 h como nas mantidas em ausência de luz. No entanto, neste caso, ao contrário do que aconteceu durante a fase de expressão, o número de embriões formados por embriogénese cíclica foi sempre superior em 16 h de fotoperíodo comparativamente à condição de ausência total de luz. A partir da 5ª subcultura, foi possível observar um declínio significativo na capacidade embriogénica dos *calli*.

A disponibilidade de material para transformação é um dos aspetos mais importantes nos programas de melhoramento baseados em ferramentas de engenharia genética. Neste contexto, a existência de culturas embriogénicas com capacidade para proliferarem indefinidamente por embriogénese cíclica representa uma grande vantagem (Capelo et al., 2010). No entanto, um declínio da capacidade embriogénica dos *calli* ao longo de várias subculturas foi previamente relatado por Bhojwani & Razdan (1996). Num estudo mais recente, Bradaï et al. (2016) relacionam as culturas mantidas por longos períodos de tempo com altas taxas de multiplicação celular (crescimento de *calli*) e baixas taxas de diferenciação (reduzido número de embriões).

Conclusões

Foi estabelecido um protocolo para indução de ES a partir de embriões zigóticos maduros na espécie *Olea europaea* cv. ‘Galega vulgar’. Os explantes que apresentaram maior percentagem de calogénese foram os cotilédones proximais e as radículas. A

obtenção de embriões somáticos foi conseguida com recurso ao meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento e a transferência dos *calli* embriogénicos para meio ECO permitiu a o rejuvenescimento dos *calli* e o estabelecimento de ES cíclica. Importa agora avaliar a viabilidade de extrapolação deste protocolo para outras cultivares e especialmente para a utilização de material adulto, de modo a possibilitar a elaboração de projetos de melhoramento com a inclusão de novas ferramentas de engenharia genética, ou a multiplicação clonal em larga escala de cultivares de oliveiras Portuguesas de elite.

Agradecimentos

Programa Operacional Regional do Alentejo 2020, Operação - ALT20-03-0145-FEDER-000014 “OLEAVALOR”, cofinanciado pelo FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional e Fundos Nacionais e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através de fundos nacionais no âmbito do Projeto UIDB/05183/2020.

Referências

- Benelli, C., Fabbri, A., Grassi, S., Lambardi, M. & Rugini, E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76:112-119.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Plant tissue culture: Theory and Practice, a Revised Edition. In: S. S.Bhojwani and M. K. Razdan (eds.), *Studies in Plant Science*, Vol. 5, New York.
- Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F. & Sánchez-Romero, C. 2016. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Scientia Horticulturae* 213:208-215.
- Cañas, L.A. & Benbadis, A. 1988. In vitro plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L). *Plant Science* 54: 65–74.
- Capelo, A.M., Silva, S., Brito, G. & Santos, C. 2010. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:237–242.
- Cerezo, S., Mercado, J. A. & Pliego-Alfaro, F. 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in Olive. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 106: 337-344.
- Leva, A., Muleo, R. & Petrucelli, R. 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 70:417-421.
- Mazri, M. A., Elbakkali, A., Belkou, M. & Belkoura, I. 2011. Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (82), pp. 19089-19095.
- Mazri, M.A., Belkoura, I., Pliego-Alfaro, F. & Belkoura, M. 2013. Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae* 159:88–95.
- Mitrakos, K., Alexaki, A. & Papadimitriou, P. 1992. Dependence of Olive Morphogenesis on Callus Origin and Age. *Journal of Plant Physiology* 139:269–273.
- Murashige, T. & Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 1:437-496.

- Orinos, Th. & Mitrakos, K. 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 27:183–187.
- Pérez-Barranco, G., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. & Sánchez-Romero, C. 2007. Genetic Transformation of Olive Somatic Embryos through Biolistics. *Acta Hort* 473 – 477.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:285–301.
- Rugini, E. 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24:123–134,
- Rugini & Tarini. 1986. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Moet Hennessy (ed) *Proceeding conference fruit tree biotechnology*, p.62, Paris, France.
- Rugini, E. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14:07-214.
- Rugini, E. & Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) ‘Canino’ and ‘Moraiolo’. *Plant Cell Reports* 14:257-260.
- Rugini, E. & Silvestri, C. 2016. Somatic Embryogenesis in Olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sativa* and var. *sylvestris*). In Germanà, Maria Antonietta – “In vitro Embryogenesis in Higher Plants, *Methods in Molecular Biology*” pp. 341-349.
- Shibli, R. A., Shatnawi, M., Abu-Ein & Al-Juboory, K. H. 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of Nabali Olive (*Olea europea* L.). *Scientia Horticulturae* 88:243-256.
- Trabelsi, E.B., Bouzid, S., Bouzid, M., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Benabdallah, A. & Ghezal, R. 2003. In-vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *Journal Plant Biology* 46:173–180.
- Trabelsi, E.B., Naija, S., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Msellem, M., Ghezal, R. & Bouzid, S. 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) ‘Chetoui.’ *Acta Physiol Plant* 33:319–324.
- Toufik, I., Guenoun, F. & Belkoura, I. 2014. Embryogenesis expression from somatic explants of olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual. *Moroccan Journal of Biology* 11:25.

Figuras



Figura 1 – Explantes após 21 dias em fase de indução em meio OMc suplementado com 0.5 mg l^{-1} de 2-iP e 5 mg l^{-1} de AIB. Formação de *calli* nos dois regimes de luz estudados. Radículas, cotilédones proximais e distais com 16 h fotoperíodo (A, B e C, respectivamente) e com 0 h fotoperíodo (D, E e F, respectivamente). Barras: 1 cm.

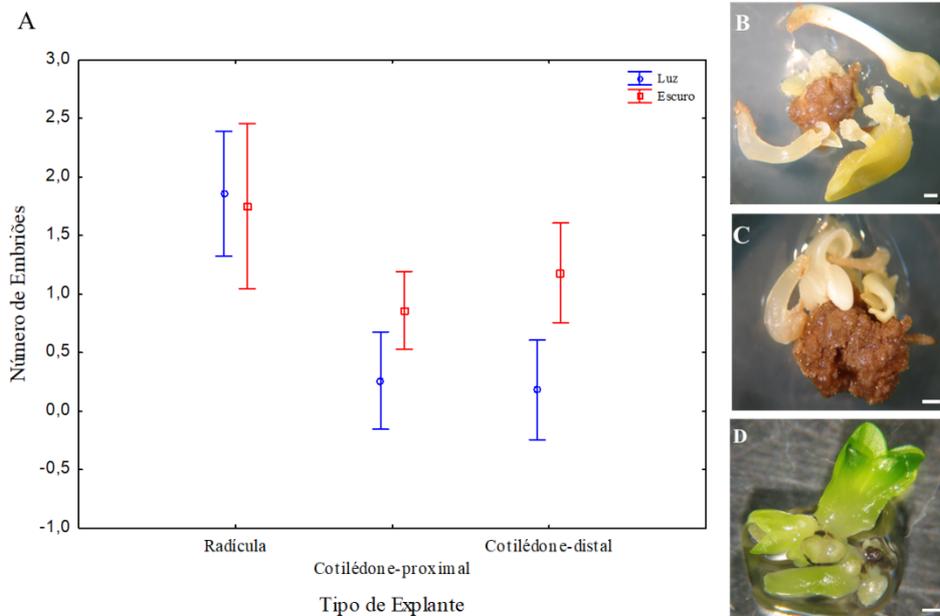


Figura 2 - (A) Número de embriões formados em meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento ao final de 30 dias, em função do tipo de explante e das condições de cultura (LSD 95%); Embriões formados a partir de radícula (B), cotilédone proximal (C) e cotilédone distal (D). Barras: 1 cm.

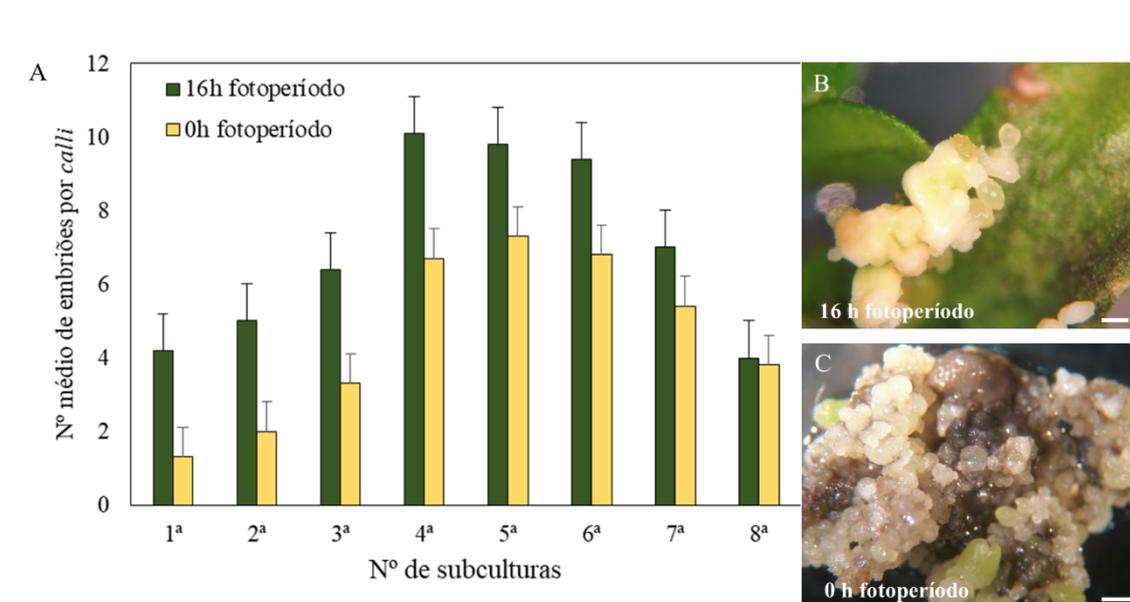


Figura 3 – (A) Número médio de embriões obtidos durante oito subculturas em meio ECO, nas duas condições estudadas; (B) Aspetto da embriogênese somática em *calli* submetido a 16 h de fotoperíodo; (C) Aspetto da embriogênese somática em *calli* mantido em ausência de luz. Barras: 1 cm.