



Diversidade genómica e genética intra-varietal em oliveira ‘Galega Vulgar’

Mónica Ramalhosa e Pereira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Mariana da Silva Gomes Mota
Pedro Manuel Vieira Talhinhos

Júri:

Presidente: Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor António Manuel Cordeiro, Investigador auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;

Doutora Maria Teresa Victória Pires Antunes Barradas de Magalhães Carvalho, Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pois sem eles não estaria onde estou, nem seria quem sou.

Aos meus avós, em especial à minha avó Almerinda, autora da pintura da capa. Aos meus primos, Diogo e Gabriel, e ao meu afilhado Tiago, que eu vi crescer e que me fez crescer. À minha família, pelo apoio que me deram.

A todos os meus amigos que me acompanharam neste percurso e que contribuíram para que fosse a pessoa que sou hoje, desde amigas da primária até amigos de mestrado. À minha educadora de infância Sónia, que me acompanha desde pequena, e a todos os professores que contribuíram para a minha formação pessoal e académica.

À professora Mariana Mota que não foi apenas minha orientadora, mas também amiga, pela atenção, preocupação e paciência. Ao professor orientador Pedro Talhinhas, sempre disponível e simpático, pronto a ajudar, obrigado por todo o tempo dedicado.

À Engenheira Luísa Louro e à D^a Nídia pela companhia nas horas de laboratório, pelos almoços e conversas e pelas ajudas no trabalho.

Às minhas companheiras de laboratório, à Nídia, à Zita, à Leonor, à Patrícia e à Filipa e aos companheiros Rodrigo e Martim, por tornarem o ambiente leve e divertido.

Ao Engenheiro Cordeiro e à Engenheira Teresa pelo auxílio na colheita e por tornarem este trabalho possível, e também ao INIAV.

Por fim ao Instituto Superior de Agronomia e a todas as escolas e instituições que tornaram possível o meu percurso académico.

Este trabalho teve apoio financeiro, logístico e institucional do LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem), suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UID/AGR/04129/2013).

Resumo

Em Portugal, a cultivar de oliveira Galega Vulgar é a mais cultivada e a mais apreciada pelas características sensoriais do azeite. Contudo, apresenta diversos obstáculos agronómicos, incluindo dificuldades na propagação vegetativa e difícil aptidão para a cultura em modo super-intensivo, sendo por isso muito importante em termos de programas de melhoramento de plantas. De modo a ultrapassar estas barreiras pretende-se avaliar a variabilidade genómica e genética de um banco de germoplasma constituído por 56 genótipos de 'Galega Vulgar' provenientes de diversas zonas do país, presentes no Pólo de Elvas do INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária).

A variabilidade genómica foi avaliada em todas as amostras através de citometria de fluxo sendo realizadas seis repetições para cada uma. Os valores médios de conteúdo nuclear obtidos para cada amostra variaram entre 3,20 pg/2C e 3,03 pg/2C representando uma variação de 5,31%. Estes resultados foram interpretados como representantes de uma variabilidade citogenómica entre as amostras, sendo que esta toma o seu valor máximo entre as amostras 1482 e 2092.

A variabilidade genética foi avaliada através de marcadores moleculares após a aplicação de 10 "primers", cinco ISSR (9MS, (GAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₄ e (GTGC)₄) e cinco RAPD (OPC-04, OPC-07, OPC-08, OPC-10 e OPC-13) em 10 amostras pré-selecionadas com base nos resultados da avaliação genómica. A percentagem de polimorfismo foi semelhante para os dois tipos de "primers" sendo de 62,03% para os RAPD e 57,14% para os ISSR. O dendrograma gerado pelas matrizes resultantes da avaliação dos géis demonstrou que as amostra mais filogeneticamente diferentes são a 1053 e a 1482.

Em conclusão a diversidade genómica e genética intra-varietal da 'Galega Vulgar' foi provada, sendo que estudos futuros poderão avaliar geneticamente as restantes amostras para descobrir novas dimensões de variabilidade.

Palavras-chave: 'Galega Vulgar', RAPD, ISSR, citometria de fluxo, diversidade.

Abstract

In Portugal the olive cultivar Galega Vulgar is the most cultivated one and the most cherished for its sensory oil properties. However, it does present some agronomic barriers, including vegetative propagation problems and weak super-intensive performance, thus being of high relevance in plant breeding programs. In order to overcome these difficulties, the main goals are to analyse the genomic and genetic variability of a germplasm bank of 56 'Galega Vulgar' genotypes from different areas of Portugal, currently at the INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) Elvas headquarters.

Genomic variability was analysed in every accession through the means of flow cytometry, and for each genotype six samples were prepared and tested. The mean values of nuclear content obtained for each genotype varied between 3,20 pg/2C and 3,03 pg/2C, representing a variation of 5,31%. The interpretation of these results lead to the acknowledgement of genomic variability between the samples, peaking between the 1482 and the 2092 genotypes.

The genetic variability was evaluated through molecular markers, using 10 primers, where five of them were ISSR (9MS, (GAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₄ e (GTGC)₄) and the other five were RAPD (OPC-04, OPC-07, OPC-08, OPC-10 e OPC-13). These primers were applied in 10 genotypes which underwent a pre-selection based on the results of flow cytometry. The polymorphism percentage was similar for both types of primers, taking on the values of 62,03% for RAPD and 57,14% for ISSR. The dendrogram, which was the result of the binary band matrix from agarose electroforesis, revealed that the most distinct genotypes were 1053 and 1482.

In conclusion, the genomic and genetic intra-cultivar diversity of 'Galega Vulgar' was proved, although future studies could lead on genetic evaluations of the remaining genotypes in order to unravel new variability dimensions.

Keywords: 'Galega Vulgar', RAPD, ISSR, flow cytometry, diversity.

Índice

1. Revisão Bibliográfica.....	3
1.1. A oliveira.....	3
1.1.2. A cultivar Galega Vulgar	4
1.2. Método de avaliação de diversidade genética - marcadores moleculares.....	6
1.2.1. “Primers” mais utilizados em <i>Olea europaea</i>	6
1.2.2. RAPD	7
1.2.2.1. Vantagens e desvantagens dos RAPDs.....	7
1.2.3. ISSR	9
1.2.3.1. Vantagens e desvantagens dos ISSRs	11
1.3. Variabilidade inter-cultivar	11
1.4. Variabilidade intra-cultivar da Galega Vulgar.....	13
1.5. Método de avaliação de diversidade citogenómica - citometria de fluxo.....	14
1.5.1. Definição e funcionamento.....	14
1.5.2. A citometria de fluxo nas plantas	17
1.5.3. Vantagens e desvantagens.....	21
1.5.4. A citometria de fluxo e o método de Feulgen em <i>Olea europaea</i>	22
2. Material e métodos.....	25
2.1. Material vegetal	25
2.1.2. Conservação	27
2.1.2.1. Citometria de Fluxo	27
2.1.2.2. Marcadores moleculares.....	27
2.2.1. Citometria de Fluxo	28
2.2.1.1. Recolha de Dados.....	32
2.2.1.2. Tratamento estatístico.....	33
2.2.2. Marcadores moleculares.....	34
2.2.2.1. Extração de DNA	34
2.2.2.2. Avaliação Quantitativa/Qualitativa de DNA.....	36
2.2.2.3. Utilização do “primer” 18S para controlar a viabilidade de amplificação do DNA	36
2.2.2.4. Aplicação de “primers” ISSR/RAPD.....	37

2.2.2.5. Electroforese	38
2.2.2.6. Recolha de Dados.....	39
3. Resultados e discussão	40
3.1. Citometria de fluxo	40
3.1.1. Concentração de Iodeto de Propídio	40
3.1.2. Avaliação de diversidade citogenómica de amostras de oliveira ‘Galega Vulgar’	45
3.1.2.1. Relação com outros resultados já obtidos em oliveira	53
3.2. Marcadores Moleculares	55
3.2.2. Aplicação “primers” RAPD/ISSR.....	55
3.2.2.1. Poder discriminativo RAPD/ISSR	58
3.2.2.2. Avaliação de diversidade genética de amostras de oliveira ‘Galega Vulgar’	60
3.2.2.3. Reprodutibilidade dos resultados.....	62
3.2.2.4. Relação com outros resultados já obtidos em oliveira	64
4. Conclusões.....	65
Anexos	73

Índice de Figuras

Figura 1 – Folhas, fruto e caroço da cultivar Galega Vulgar.....	5
Figura 2 - Funcionamento do “primer” UDO99-01 para amplificação de marcadores SSR.....	9
Figura 3 – Funcionamento do “primer” (GAC) ₅ para amplificação de marcadores ISSR.....	10
Figura 4 – Sistema fluídico da citometria de fluxo	14
Figura 5 - Histograma de resultados com recorrência à ferramenta de restrição de zona..	16
Figura 6 – Citómetro de fluxo com carrossel	17
Figura 7 - Diagrama do procedimento de preparação de amostras para determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	19
Figura 8 – Parcela do banco de germoplasma de oliveira ‘Galega Vulgar’ na Herdade do Reguengo em Elvas (INIAV).	25
Figura 9 – Fluxograma explicativo dos materiais e métodos de avaliação de variabilidade genómica e genética da ‘Galega Vulgar’	26
Figura 10 – Liofilização das amostras.....	27
Figura 11 – Lançamentos recolhidos e folhas terminais jovens utilizadas para a suspensão de núcleos.	28
Figura 12 – <i>Buxus sempervirens</i> no pátio do edifício principal do ISA em julho de 2018.....	29
Figura 13 - Trituração conjunta de folhas de oliveira ‘Galega Vulgar’ e do padrão de DNA <i>Buxus sempervirens</i> no tampão WPB.....	30
Figura 14 - Gráfico resultante da análise de citometria de fluxo da amostra 2213R_002 com laser verde de 532nm.....	32
Figura 15 - Marcador DNA Ladder 100pb.....	38
Figura 16 - Gráficos resultantes de uma análise de citometria de fluxo da preparação da segunda amostra de folhas de oliveira ‘Galega Vulgar’ com uma concentração de iodeto de propídio de 0,5.....	40
Figura 17 - Gráfico de quantis da variável “%Ungated”	42
Figura 18 – Gráfico de quantis da normal dos dados de “%Ungated”.....	42
Figura 19 – Gráfico resultante da análise de comparações múltiplas de Tukey dos valores de concentração de iodeto de propídio.	43
Figura 20 - Gráficos resultantes da análise da amostra 1061 de ‘Galega Vulgar’ e de buxo em citómetro	45
Figura 21 - Gráfico de quantis do conteúdo nuclear das 57 amostras de ‘Galega Vulgar’.	46
Figura 22 - Gráfico quantis da normal referente à variável conteúdo nuclear.....	49
Figura 23 - Gráfico de densidade da variável de conteúdo nuclear.	49
Figura 24 - Gráfico de resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.....	51
Figura 25 – Observação de gel de agarose em transiluminador de luz ultravioleta de quantificação do DNA genómico relativo às amostras 1 a 17.....	55
Figura 26 - Observação de gel de agarose sobre transiluminador de luz ultravioleta de resultados da aplicação do “primer” 9MS nas amostras 2092, 1322, 1262, 0501, 0011, 1053, 2013, 2182, 2232 e 1482.....	56

Figura 27 - Observação de gel de agarose sobre transiluminador de luz ultravioleta de resultados da aplicação do “primer” OPC-08 nas amostras 2092, 1322, 1262, 0501, 0011, 1053, 2013, 2182, 2232 e 1482.....	57
Figura 28 - Dendrograma resultante da análise das amostras por aplicação de “primers” ISSR e RAPD.....	60
Figura 29 - Dendrograma resultante do cruzamento das matrizes das duas repetições de aplicação de “primers” ISSR e RAPD.	62

Índice de Quadros

Quadro 1 - Taxonomia da oliveira.....	3
Quadro 2 – Fluorocromos utilizados em citometria de fluxo nas plantas: modo de ligação, comprimentos de onda de ativação e emissão.....	20
Quadro 3 – Padrões de referência de DNA disponíveis, fornecidos pelo Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, pertencente ao Institute of Experimental Botany, em Olomouc, na República Checa.	21
Quadro 4 - Composição de tampões utilizados em citometria de fluxo.....	30
Quadro 5 – Sequências dos “primers” 18S “forward” e “reverse”.....	36
Quadro 6 - Médias dos resultados obtidos através de leitura de núcleos de ‘Galega Vulgar’ com diferentes concentrações de iodeto de propídio em citometria de fluxo.....	41
Quadro 7 – Resultados de citometria de fluxo referentes à amostra 1061.	46
Quadro 8 – Valores médios do conteúdo nuclear e do coeficiente de variação das amostras..	47
Quadro 9 – Resultados do teste de Tukey ($\alpha = 0.05$, $n=6$).	51

Introdução

A cultivar Galega Vulgar, pertencente à subespécie *europaea* de *Olea europaea* L., representa 80% dos olivais portugueses e é a cultivar mais utilizada para a produção de azeite, sendo muito apreciada pelos consumidores portugueses. No entanto, a sua produção apresenta alguns obstáculos, havendo problemas na propagação vegetativa e na aptidão da cultura para o modo super-intensivo. É, portanto, uma cultivar muito interessante e desafiante em termos de programas de melhoramento. Neste contexto, torna-se muito relevante conhecer a diversidade do germoplasma para que futuramente se possa seleccionar os melhores progenitores para melhoramento de plantas.

A diversidade genética da cultivar está amostrada por meio de uma coleção de germoplasma na Herdade do Reguengo, pertencente ao Pólo de Elvas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), que possui genótipos de várias zonas agro-ecológicas de Portugal. Esta coleção encontra-se em fase de caracterização e poderá possuir novas características a ser utilizadas no melhoramento desta cultivar, por forma a melhorar rendimentos, qualidade e/ou alargar o espectro de condições de produção, e resolver os problemas mencionados anteriormente de propagação vegetativa e relacionados com a produção em modo super-intensivo. Com o objetivo de contribuir para a caracterização da referida coleção, este trabalho procurará avaliar as diferenças genéticas entre os diferentes genótipos de 'Galega Vulgar'. Esta avaliação será conduzida em duas direcções, numa vertente dita de variabilidade genómica, e noutra vertente dita de variabilidade genética.

Para caracterizar a variabilidade genómica, verificando se há diferenças no tamanho do genoma, ir-se-á estimar o conteúdo de DNA nuclear de cada amostra através da citometria de fluxo. Este método permitirá também identificar qualquer tipo de poliploidia. Até à data, nenhum estudo relatou poliploidia na subespécie *europaea*.

Para avaliar a variabilidade genética, recorrer-se-á à utilização de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares representam uma ferramenta essencial para a identificação de variabilidade genética, uma vez que não são influenciados pelo fator ambiental. A sua utilização permite caracterizar, mapear e diferenciar genótipos, permitindo identificar alterações genéticas que poderão resultar em novas características.

Gemas *et al.* (2004) utilizaram vários "primers" ISSR e RAPD para estudar a variabilidade genética da cultivar e demonstraram que esta ainda se encontra na fase inicial de domesticação, havendo margem para variabilidade intra-varietal. Figueiredo *et al.* (2013) estudaram a diversidade genética de 75 amostras de 'Galega Vulgar' provenientes de todo o país com RAPDs, assim como Gemas *et al.* (2000) que analisaram 27 amostras de 'Galega Vulgar'. Contudo, a avaliação genómica de uma grande amostragem de vários genótipos da cultivar 'Galega Vulgar' nunca foi antes realizada.

Devido à natureza das amostras da espécie em questão, a extração de DNA nem sempre é fácil, e os extratos obtidos nem sempre passíveis de posterior manipulação enzimática. Com isto pretende-se também otimizar os métodos de extração de DNA da oliveira.

Neste contexto, os objetivos desta dissertação são:

- a) Avaliação do conteúdo nuclear de 56 genótipos da coleção de germoplasma de 'Galega Vulgar' sita na Herdade do Reguengo, em Elvas;
- b) Avaliação da diversidade genética dos referidos 56 genótipos de 'Galega Vulgar' após análise de marcadores moleculares obtidos com diversos "primers" RAPD e ISSR.

1.Revisão Bibliográfica

1.1. A oliveira

A oliveira tem como nome científico *Olea europaea* (quadro 1). O nome do género, *Olea*, provém do latim de oliveira, e o epíteto específico, *europaea*, foi sugerido por Lineu (1764), fazendo referência à sua zona de origem, considerando-a típica do mediterrâneo (Various authors, 1882 *cit in* Bartolini and Petruccelli, 2002; Percy and Newberry, 1937 *cit in* Bartolini and Petruccelli, 2002). A oliveira é a única espécie do género *Olea* que se encontra na zona do mediterrâneo (Zohary, Hopf, 1994 *cit in* Bartolini and Petruccelli, 2002).

Quadro 1 - Taxonomia da oliveira (adaptado de Cronquist, 1981 *cit in* Bartolini and Petruccelli, 2002).

Classe	Magnoliopsida
Subclasse VI	Asteridae
Ordem	Scrophulariales
Família	Oleaceae
Subfamília	Oleoideae
Tribo	Oleceae
Género	<i>Olea</i> L.
Espécie	<i>Olea europaea</i> L.
Subespécies	<i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>sativa</i> Hoffm. et Link (= <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>europaea</i>) <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>oleaster</i> Hoffm. et Link (= <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>sylvestris</i>)

Esta espécie faz parte da civilização mediterrânea há muito tempo, tendo sido domesticada há 6000 anos na costa Este do Mar Mediterrâneo (Zohary and Spiegel, 1975 *cit in* Martins-Lopes, 2007).

É uma cultura de grande importância e representa, em conjunto com a videira, a cultura permanente mais antiga da alimentação humana. O seu melhoramento genético começou no Crescente Fértil onde as populações selecionavam os melhores fenótipos; esta seleção, que se prolongou ao longo dos anos e por toda a bacia do mediterrâneo, permitiu transformar a oliveira selvagem nas atuais oliveiras cultivadas (Böhm, 2013).

Hoje em dia a oliveira é cultivada maioritariamente para a produção de azeite, mas também para a produção de frutos. Nos países do mediterrâneo há cerca de sete milhões de hectares de olivais; o valor nutricional do azeite e as vantagens para a saúde que proporciona leva a um aumento da procura de mercado e, conseqüentemente, a um aumento do número de olivais. Devido ao aumento da procura, os olivais antigos, constituídos por diferentes cultivares, são modernizados, sendo o número de cultivares reduzido para uma ou duas. Isto leva a que haja uma diminuição drástica na diversidade genética da oliveira, uma vez que a

produção é concentrada apenas em poucas cultivares, ameaçando a sobrevivência das restantes que não são utilizadas (Khadari *et al.*, 2003).

A espécie *Olea europaea* inclui as subespécies *Olea europaea* ssp. *sativa* (forma cultivada), também conhecida como *Olea europaea* ssp. *europaea*, e *Olea europaea* ssp. *sylvestris* (forma selvagem) ou *Olea europaea* ssp. *oleaster*, cujo nome comum é zambujeiro (Böhm, 2013).

Em 1950, Morettini afirmava que era possível encontrar o zambujeiro em todas as zonas costeiras da Europa meridional, da Ásia ocidental e da África setentrional. E que, devido a este facto, poderia admitir-se que os povos teriam feito azeite a partir dos frutos destes zambujeiros, realizando assim uma propagação artificial e um melhoramento por seleção das melhores plantas.

Apesar de ser uma espécie importante na origem das espécies cultivadas, hoje em dia, o seu valor prático, à exceção das folhas que têm interesse medicinal, é baixo. Tem, por outro lado uma importância na conservação genética, uma vez que é heterozigótico, ajuda a conservar genes de indivíduos locais (Böhm, 2013).

O zambujeiro tem propagação natural por semente, através de diversas aves como tordos, melros ou estorninhos. Apresenta ainda uma grande variabilidade morfológica por ser altamente heterozigótico, o que é intensificado pela sua dispersão natural (Böhm, 2013).

Esta subespécie é facilmente confundível, *in situ*, com *Olea oleaster*, que resulta de sementes de *Olea europaea* ssp. *europaea*. Por se propagar apenas vegetativamente, a subespécie *europaea* volta à sua forma selvagem quando semeada (Zohary and Hopf, 2000 *cit in* Böhm, 2013).

As subespécies de *Olea europaea* e as espécies de *Olea* podem ser divididas em três pólos genéticos. As variedades *sylvestris* e *sativa* pertencem ao pólo Mediterrâneo. O segundo pólo, da zona de África e Macaronésia, é constituído pelas variedades: *cerasiformis* (tetraplóide), *maroccana* (hexaplóide), *guanchica* (diplóide), *lamperrini* (diplóide) e *cuspidata*. O terceiro pólo é constituído por *O. exasperata*, *O. capensis* ssp. *macrocarpa* e ssp. *capensis*, *O. woodiana* e *O. lancea*. (Rugini *et al.*, 2011).

1.1.2. A cultivar Galega Vulgar

A cultivar Galega Vulgar é antiga (Cordeiro *et al.*, 2008) e representa 80% dos olivais portugueses, sendo a cultivar mais utilizada para a produção de azeite em Portugal (Lopes *et al.*, 2004). Em conjunto com a cultivar Cobrançosa, a 'Galega Vulgar' é dominante em algumas regiões olivícolas (Böhm, 2013).

É ainda utilizada na produção de azeitonas para conserva em negro. Atualmente está disseminada na Beira Interior, no Ribatejo, Alentejo, Algarve e em Espanha, nomeadamente em Huelva e na Extremadura. Tem como sinónimas ‘Galega’, ‘Galega meuda’, ‘Molar’ e ‘Negrucha’ (Cordeiro *et al.*, 2010).

Esta cultivar é de grande rusticidade, muito produtiva e de grande alternância. Entra em produção precocemente produzindo azeitonas de peso baixo (inferior a dois gramas) com endocarpo de peso médio (entre 0,3 e 0,45 gramas) e com baixa relação polpa/caroço (figura 1). Na zona de Elvas, o início da plena floração dá-se a dez de maio e tem uma duração média de 19 dias, sendo a maturação dos frutos média e muito escalonada. Os frutos produzidos têm uma elevada resistência ao desprendimento, havendo uma queda acentuada quando a maturação chega ao fim. É uma cultivar pouco apropriada à colheita mecânica com vibrador (Cordeiro *et al.*, 2010).

A grande desvantagem da cultivar é a sua baixa capacidade de propagação por estaca semi-lenhosa. É também muito susceptível à gafa (*Colletotrichum* spp.), havendo uma alta incidência de tuberculose (*Pseudomonas savastanoi*), de mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*), cochonilha e fumagina. Por outro lado, é resistente a *Verticillium*, e sofre baixa incidência de olho de pavão (*Spilocaea oleaginea*). As árvores são sensíveis ao frio, à salinidade e ao calcário ativo, mas são tolerantes à seca (Cordeiro *et al.*, 2010).

Na sua produção, há um baixo rendimento em azeite (inferior a 18%) que é pobre em ácido linoleico, de qualidade regular e de elevada estabilidade. Esta cultivar está incluída na Denominação de Origem Protegida (DOP) “Azeites de Beira Alta”, “Azeites Beira Baixa”, “Azeites Ribatejo”, “Azeites Alentejo Interior” e “Azeites de Moura” (Cordeiro *et al.*, 2010).



Figura 1 – Folhas, fruto e caroço da cultivar Galega Vulgar (Cordeiro *et al.*, 2010).

1.2. Método de avaliação de diversidade genética - marcadores moleculares

Os marcadores moleculares de DNA, por não serem afetados pelas condições ambientais representam uma ferramenta muito importante no estudo da diversidade genética de uma população e da sua filogenia, fornecendo resultados fidedignos. Este estudo é crucial para acompanhar a evolução genética de uma dada espécie e identificar características de interesse económico. Um marcador que esteja relacionado a uma dada característica irá ser essencial para prever a sua heritabilidade. Esta é uma das características mais importantes dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas (Srivastava and Narula, 2005).

1.2.1. “Primers” mais utilizados em *Olea europaea*

O desenvolvimento de colecções principais (‘core collections’), que representam a diversidade genética de uma espécie, tem sido baseado em dados fenotípicos e dados de passaporte (geográficos, genéticos e agronómicos). Contudo, “primers” como RAPDs, AFLPs, SSRs e SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) estão a ser cada vez mais utilizados, em combinação, ou não, com características fenotípicas (Belaj *et al.*, 2012).

Os microssatélites tem-se vindo a tornar numa ferramenta popular na análise genética de plantas. Graças às suas vantagens de utilização, os SSR representam uns dos “primers” mais escolhidos no estudo de genética de populações e em DNA ‘fingerprinting’ de indivíduos (Rafalski *et al.*, 1996 in Cipriani *et al.*, 2002).

Para caracterizar e descrever o germoplasma da oliveira têm sido utilizadas ao longo do tempo características morfológicas e biométricas, apenas ‘recentemente’ foram aplicados “primers” como RAPDs, AFLPs e ISSR na caracterização de cultivares de oliveira (Cipriani *et al.*, 2002).

Em oliveira os RAPDs têm sido utilizados na caracterização de cultivares (Mekuria *et al.*, 1999; Belaj *et al.*, 2001; Besnard *et al.*, 2001; Sanz-Cortés *et al.*, 2001; Codeiro *et al.*, 2008). Os ISSR também são utilizados para determinar relações filogenéticas em *Olea europaea* (Terzopoulos *et al.*, 2005; Vargas and Kadereit, 2001).

A utilização em conjunto de “primers” RAPD e ISSR permite uma maior cobertura do genoma uma vez que os RAPDs estão possivelmente associados a loci de importância funcional (Penner, 1996 in Gemas *et al.*, 2004) e os ISSR amplificam regiões não codificantes altamente variáveis (Esselman *et al.*, 1999).

Os RAPDs e ISSR são técnicas que permitem caracterizar zonas de ‘multi-locus’ que permitem distinguir cultivares e clones, e são utilizadas em vários tipos de estudos de diversidade genética (Karp *et al.*, 1997).

1.2.2. RAPD

Os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) são marcadores moleculares dominantes baseados na técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Na utilização de RAPDs, a amplificação de DNA é feita recorrendo a “primers” de sequências aleatórias que se ligam ao DNA correspondente à temperatura de 36°C. Estes “primers” detetam polimorfismos que funcionam como marcadores genéticos, permitindo mapear geneticamente uma espécie. Com isto, não é necessário conhecer sequências específicas de nucleótidos para aplicar estes marcadores (Williams *et al.*, 1990).

Os “primers” possuem normalmente um tamanho de 10 pares de bases e servem para sintetizar fragmentos em ambas as direções (forward e reverse). Podem amplificar até 10 sítios diferentes no genoma, em simultâneo. Os produtos amplificados têm um tamanho de 0,5 a 5 kb e podem ser separados através de eletroforese (gel de agarose) (Kewasat and Kumar, 2009).

As diferenças nos perfis de um marcador de RAPD em eletroforese vão variar consoante a presença ou ausência de bandas associadas a diferentes sítios de ligação dos “primers” existentes no genoma analisado (Srivastava and Narula, 2005).

A sua primeira aplicação foi feita em 1990 por Williams *et al.*, que afirmaram serem ideais para mapeamento genético, melhoramento de plantas e animais e DNA fingerprinting. São especialmente úteis no estudo genético de populações

Estes marcadores são utilizados para estudar a estabilidade genética de uma população, para diferenciar indivíduos e mapear padrões de heritabilidade (Srivastava and Narula, 2005).

Por detetarem polimorfismos permitem identificar e isolar rapidamente fragmentos de DNA específicos de certos cromossomas. Também são utilizados para detetar zonas do genoma que sofreram mutações de deleção ou adição. Uma vez que a informação genética de cada marcador é muito pequena, estes só se tornam úteis na identificação de genótipos quando são utilizados em largas quantidades (Williams *et al.* 1990).

São também importantes quando uma determinada espécie não possui marcadores fenotípicos em quantidades suficientes para descrever o seu genoma e fornecer informação necessária para o estudo em causa (Williams *et al.* 1990).

1.2.2.1. Vantagens e desvantagens dos RAPDs

Vantagens

Os RAPDs possuem várias vantagens em relação a outros métodos sendo uma delas a alta aplicabilidade dos “primers” a várias espécies diferentes. O facto de não ser necessário

realizar trabalho preliminar à aplicação dos “primers” como o isolamento de sondas ou sequenciamento de nucleótidos representa um fator vantajoso (Williams *et al.* 1990).

Uma vez que os “primers” estão disponíveis comercialmente, não é normalmente necessário obter dados de sequências para o desenho de “primers” (Kewasat and Kumar, 2009).

A técnica de aplicação de RAPDs é simples e barata, e não envolve a utilização de isótopos radioativos. Pode ser utilizada para analisar grandes números de amostras ao mesmo tempo (Paran and Michelmore, 1992).

Estes marcadores possuem um alto nível de abundância no genoma e um nível médio de polimorfismo, estando distribuídos aleatoriamente. A intensidade laboratorial para a sua aplicação é baixa, assim como os seus custos de operação e o tempo consumido. Os custos de desenvolvimento podem ser baixos a médios e a exigência técnica para os utilizar é baixa. São necessárias poucas quantidades de DNA para a sua aplicação, cerca de 5 a 50ng por reação (Kewasat and Kumar, 2009).

Cada marcador RAPD representa uma “Sequence Tagged Site” (STS) (sequências curtas de DNA que ocorrem apenas uma vez em todo o genoma (Olson *et al.* 1989)) o que facilita a troca de informações entre investigadores que realizam estudos relacionados com o mapeamento genético (Williams *et al.* 1990).

A vantagem mais importante é o modo automatizado com que podem ser determinados vários genótipos. Os mapas genéticos feitos com recurso a marcadores RAPD são construídos com mais eficiência e com uma maior densidade de marcadores do que se fossem utilizados RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) ou outros métodos baseados em PCR (Williams *et al.* 1990).

Desvantagens

Uma das limitações é a baixa reprodutibilidade quando a temperatura de emparelhamento é baixa. Contudo a utilidade de um marcador pode ser melhorada sequenciando partes terminais e desenhando “primers” mais longos (Paran and Michelmore, 1992 *cit in* Varshney *et al.*, 2007). A baixa reprodutibilidade é causada também pela alta sensibilidade às condições de reação, sendo necessário aplicar procedimentos experimentais altamente estandardizados. Com isto, resultados obtidos com RAPDs por diferentes laboratórios, em espécies semelhantes, não são sempre comparáveis (Kewasat and Kumar, 2009).

Os estudos efetuados com marcadores RAPD requerem DNA com alto peso molecular, purificado e é necessário ter em atenção potenciais contaminações uma vez que estes

“primers” poderão amplificar DNA de uma grande variedade de organismos, alterando os resultados (Kewasat and Kumar, 2009).

Não possui especificidade em relação a locus, por isso as bandas resultantes não podem ser interpretadas em termos de alelos e de loci, uma vez que os marcadores são dominantes. Fragmentos de DNA com o mesmo tamanho podem não ser homólogos (Kewasat and Kumar, 2009).

1.2.3. ISSR

Inter-Simple Sequence Repeats estão relacionadas com a amplificação de segmentos de DNA que estão entre duas regiões semelhantes de DNA repetitivo, os microssatélites, também conhecidos por SSR, que se encontram em zonas opostas na cadeia dupla (uma zona 3' → 5' e outra 5' → 3'). Estes dois microssatélites têm de estar a uma distância que seja possível de ser amplificada. Neste caso os “primers” serão as SSRs que serão aplicadas em PCR, com o objetivo de amplificar ISSRs de diferentes tamanhos. Estes “primers” podem ser compostos por dois, três, quatro ou cinco nucleótidos (Kewasat and Kumar, 2009).

Uma vez que os ISSRs se baseiam na amplificação de segmentos que se encontram entre SSR, é imprescindível esclarecer a definição destas últimas.

As SSR (Simple Sequence Repeat) ou microssatélites são segmentos repetitivos de DNA que estão presentes em todos os eucariotas (figura 2). O polimorfismo deste marcador

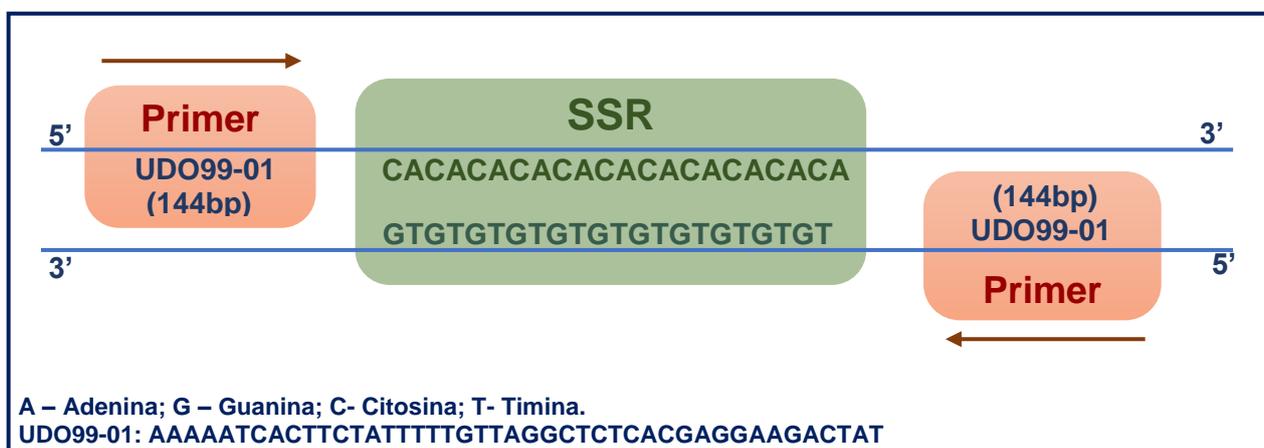


Figura 2 - Funcionamento do “primer” UDO99-01 para amplificação de marcadores SSR. Adaptado de Cipriani *et al.* (2002).

expressa-se através do diferente número de repetições de uma determinada zona do genoma. Estima-se que repetições de tamanho superior a 20 pares de base ocorrem a cada 33 kb nas plantas. As sequências de nucleótidos que flanqueiam estas regiões repetitivas de DNA são utilizadas para desenhar “primers” que irão permitir amplificar esses microssatélites.

Por sua vez, estes “primers” são de grande utilidade para identificar formas polimórficas de *loci* e gerar mapas baseados nestes marcadores. Este tipo de polimorfismo é altamente reprodutível (Srivastava and Narula, 2005).

Os ISSRs utilizam “primers” mais longos do que os RAPD’s, o que significa maiores temperaturas de emparelhamento e maior especificidade. A temperatura de emparelhamento vai depender da quantidade de nucleótidos de guanina e citosina de cada “primer” e varia normalmente entre 45 a 65°C. Os produtos resultantes (200 a 2000 pares de bases) podem ser avaliados por meio de eletroforese (gel de agarose ou poliácridamida) (Kewasat and Kumar, 2009).

Estes marcadores estão distribuídos aleatoriamente pelo genoma e demonstram ser altamente polimórficos apesar do nível de polimorfismo variar consoante o método de detecção utilizado (Kewasat and Kumar, 2009).

Os ISSRs possuem um grande potencial em identificar diversidade dentro e entre uma grande amplitude de grupos taxonómicos quando comparados com outros “primers”, pois estes conseguem revelar variabilidade relacionada com zonas únicas do genoma simultaneamente, em vários loci (figura 3). Através da aplicação dos “primers” é possível

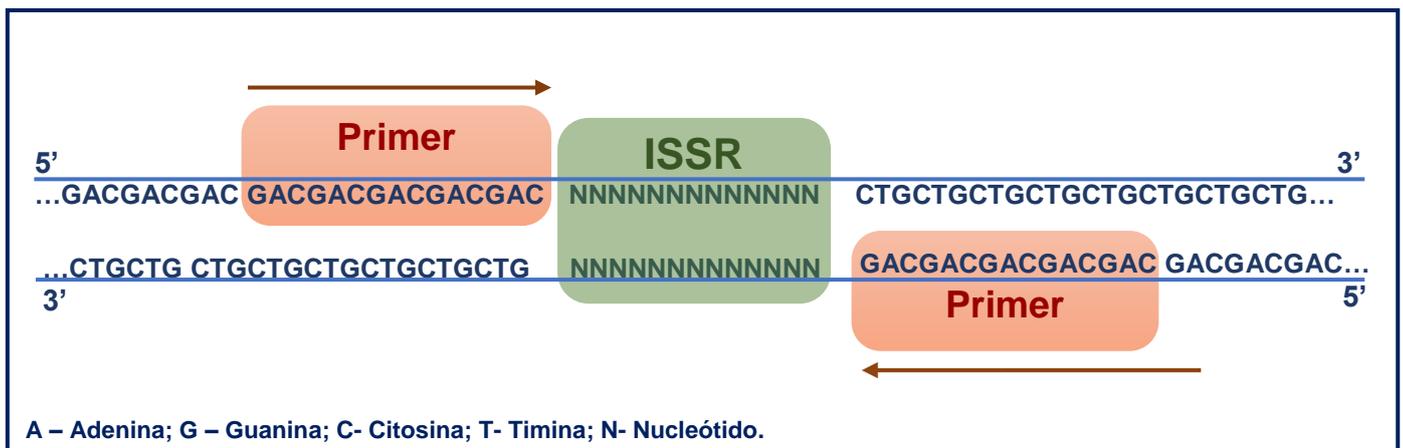


Figura 3 – Funcionamento do “primer” (GAC)₅ para amplificação de marcadores ISSR.

identificar a presença de zonas de DNA repetitivo e estudar a sua distribuição em vários genomas. Isto demonstra a capacidade que estes marcadores possuem em distinguir espécies através do “DNA fingerprinting”. O aparecimento de padrões semelhantes entre espécies permite também estudar potenciais relações filogenéticas evolutivas (Zietkiewicz *et al.* 1994).

São marcadores utilizados no estudo de alterações de DNA no genoma de eucariotas, podendo ser aplicados ao estudo genético de populações, taxonomia molecular, mapeamento genético e identificação de mutações somáticas (Zietkiewicz *et al.* 1994).

1.2.3.1. Vantagens e desvantagens dos ISSRs

Vantagens

Os ISSRs, apesar de apresentarem uma especificidade para microssatélites não necessitam de dados de sequências para o desenho dos “primers”, usufruindo da vantagem de marcadores aleatórios (Joshi et al., 2000).

Estes “primers” não possuem proprietário, podem ser sintetizados por qualquer pessoa que tenha os meios e o material necessário. É uma técnica simples, rápida e não necessita obrigatoriamente do uso de radioatividade (Kewasat and Kumar, 2009).

Os ISSRs têm uma abundância no genoma e uma reprodutibilidade média-alta e um nível de polimorfismo médio. A intensidade de trabalho necessária para a sua aplicação é baixa e os custos de desenvolvimento são baixos. Os custos operacionais são médios a baixos assim como a exigência técnica. A quantidade de DNA necessária para utilizar estes marcadores é muito baixa. A técnica é favorável à automatização (Kewasat and Kumar, 2009).

Uma das vantagens em relação aos RAPDs é a obtenção de mais marcadores polimórficos por ensaio. Contudo, os ISSRs possuem o mesmo espectro largo de aplicação que os RAPDs, podendo ser aplicados a vários *taxa* (Zietkiewicz et al., 1994).

Desvantagens

Uma das desvantagens é a ausência de homologies na presença de fragmentos de tamanho semelhantes. O facto de não haver especificidade de locus pode ser uma desvantagem em alguns estudos. Apesar de terem uma reprodutibilidade média-alta podem ocorrer problemas em reproduzir resultados (Kewasat and Kumar, 2009).

1.3. Variabilidade inter-cultivar

Vários estudos permitiram a distinção de cultivares de diversas origens (portuguesas, espanholas, francesas, italianas, gregas, marroquinas, turcas, tunisinas, sírias e israelitas) com alguns “primers”, tanto ISSR e RAPD (Gemmas et al, 2004; Belaj et al., 2001; Belaj et al, 2004; Besnard et al., 2001; Martins-Lopes et al., 2007; Rallo et al., 2000).

Martins-Lopes et al. (2007) estudaram a variabilidade de 30 cultivares portuguesas, distinguíveis com apenas sete “primers” ISSR e 12 “primers” RAPD. A cultivar Galega Vulgar foi distinguida através das bandas OPO-13-700 e OPO-12-1046 dos “primers” RAPD. A ausência das bandas OPO4-736 e UBC846-1100 permitiu também distinguir a cultivar.

Rallo *et al.* (2000) distinguiram 47 cultivares de diferentes origens (entre estas 3 portuguesas: 'Galega Vulgar', 'Cobrançosa' e 'Cordovil de Serpa') com apenas cinco "primers" SSR.

Belaj *et al.* (2004) distinguiram 31 cultivares recorrendo a quatro "primers" RAPD (OPA-01, OPA-08, OPA-01, OPA-03). Dentro dessas 31 de diversas origens encontram-se as mesmas cultivares portuguesas utilizadas por Rallo *et al.* (2000).

Por último, Gemas *et al.* (2004) estudaram 11 cultivares portuguesas de diferentes regiões agro-ecológicas de produção de azeite, de grande importância económica para o país. Foram analisadas, no total, 201 árvores das cultivares: Galega Vulgar, Maçanilha, Carrasquenha, Redondil, Blanqueta, Azeiteira, Cordovil, Madural, Cobrançosa, Negrinha e Verdeal. Todas as cultivares foram distinguidas através de sete "primers" RAPD (OPC-4, OPC-7, OPC-8, OPC-10, OPC-13, OPC-15, OPC-16 de Operon Technologies, Inc.). Para cada "primer" foram obtidas oito a 15 bandas, criando no total 82 bandas. Algumas destas bandas eram monomórficas, mas outras mostraram ser específicas de certas cultivares.

É de realçar as bandas exclusivas da cultivar Galega Vulgar (o número subsequente ao "primer" indica os pares de bases da banda em questão): OPC-8-1016, OPC-13-409, OPC-13-847, OPC-7-727, OPC-10-569 e OPC-10-623; e também as bandas ausentes apenas em 'Galega Vulgar': OPC-8-261 e OPC-13-475 (Gemas *et al.*, 2004).

As cultivares demonstraram ter uma relação de similaridade de 83%. As cultivares Negrinha e Azeiteira tiveram o maior nível de proximidade, e a cultivar Galega Vulgar foi a cultivar mais afastada em termos de semelhança em relação às restantes 10 cultivares (Gemas *et al.*, 2004).

Com base nos resultados obtidos foram feitas análises de MANOVA (análise multivariada da variância) e ANOVA (análise de variância) para obter as relações entre as cultivares de diferentes regiões agro-ecológicas e de diferentes usos. As cultivares foram discriminadas em cinco grupos, dos quais quatro são relacionados com as diferentes regiões agro-ecológicas (Beira Interior, Algarve, Alto Alentejo e Trás-os-Montes) e um último para a cultivar Galega Vulgar que está dispersa por todo o país. Foi feita também uma segunda divisão com base na utilização da cultivar para azeite, para fruto ou para ambas as utilizações (Gemas *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos revelaram que, geneticamente, existe uma ligação entre as cultivares e a seleção que ocorre localmente para a produção de fruto. Existe também uma ligação com adaptação agro-ecológica de cada cultivar. Este facto também é verificado por Besnard *et al.* (2001) e Belaj *et al.* (2002), que estudaram cultivares de várias zonas do Mediterrâneo.

A aplicação de SSRs por Lopes *et al.*, (2004) levou à colocação da cultivar Galega Vulgar e da cultivar Galega Grada de Serpa no mesmo grupo, enquanto que o 'Galego de Évora' não foi incluído.

Martins-Lopes *et al.* (2007) dividiu as três cultivares acima referidas com base nos resultados da aplicação de RAPDs e ISSRs. Mas estas demonstraram ter uma relação genética comum.

Figueiredo *et al.* (2002) concluíram também que a 'Galega Grada de Serpa' e a 'Galega Grada de Évora' não pertencem ao grupo da cultivar Galega Vulgar.

Cordeiro *et al.* (2008) aplicaram também "primers" RAPD à cultivar Galega Vulgar que foi totalmente discriminada através da ausência exclusiva da banda 4 do "primer" OPR-7. Esta demonstrou estar distanciada geneticamente das restantes 28 cultivares analisadas, sugerindo que possui uma origem diferente.

1.4. Variabilidade intra-cultivar da Galega Vulgar

A cultivar Galega Vulgar foi avaliada por Lopes *et al.*, (2004) com diversos SSRs. Os oito genótipos avaliados resultaram em oito perfis individuais sendo que sete se distinguiam por um ou dois alelos e o último era distinguível por 10 alelos. Os "primers" utilizados foram: *ssrOeUA-DCA1*, *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA4*, *ssrOeUA-DCA5*, *ssrOeUA-DCA7*, *ssrOeUA-DCA8*, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA11*, *ssrOeUA-DCA13*, *ssrOeUA-DCA14*, *ssrOeUA-DCA15*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA17* e *ssrOeUA-DCA18*.

Gemas *et al.* (2004) estudaram a variabilidade da cultivar Galega Vulgar aplicando três "primers" RAPD (OPC-07, OPC-08, OPC-10) e cinco "primers" ISSR (9MS, (GAC)₅, (GTG)₅, (GTGC)₄ e (GACA)₄) que geraram 93 marcadores polimórficos. Foram estudados 77 genótipos de cinco regiões agro-ecológicas diferentes: Alto Alentejo, Ribatejo-Abrantes, Ribatejo-Santarém, Beira Litoral e Baixo Alentejo. Todos os genótipos foram distinguidos através dos "primers" utilizados. Análises AMOVA (análise de variância molecular) e agrupamento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) revelaram que os vários indivíduos analisados poderiam ser organizados geneticamente em relação à sua origem. As análises de ANOVA suportaram esta ideia e demonstraram uma grande variabilidade dentro das regiões agro-ecológicas. Estes resultados suportam a ideia de que a cultivar Galega Vulgar é composta por diferentes genótipos adaptados às diferentes regiões onde se encontram. Com isto conclui-se que a cultivar está prematuramente domesticada e que deve ser considerada uma cultivar melhorada localmente em vez de uma cultivar uniforme que toma a mesma forma em qualquer parte do país (Gemas *et al.*, 2004). A variabilidade genética da cultivar, estudada em relação a cada zona agro-ecológica, atingiu o maior nível de significância na região de Ribatejo-Santarém, assim pode afirmar-se que este será o seu centro de origem e zona de dispersão (Gemas *et al.*, 2004).

1.5. Método de avaliação de diversidade citogenómica - citometria de fluxo

1.5.1. Definição e funcionamento

A citometria de fluxo é um processo que consiste na medição de características físicas e/ou químicas de células individuais ou de outras partículas de tamanho semelhante, de origem biológica ou não. As medições são feitas quando as células ou partículas, em suspensão líquida, atravessam o ponto de interrogação, uma por uma, num fluxo de diâmetro muito pequeno (Shapiro, 2004).

Um citómetro de fluxo tem cinco componentes: fluídica, ótica, eletrónica, computacional e mecânica. (Sklar 2005, *cit in* Loureiro, 2007).

O sistema fluídico gera um fluxo constante de amostra, forçando a passagem das partículas num núcleo central estreito, projetando-as, uma por uma, na direção do ponto focal da fonte de luz (Anónimo, 2002).

A maioria dos citómetros recentes utiliza “sheath flow” que consiste na injeção da amostra que contém os núcleos (ou outras partículas) no centro de um fluxo contínuo de fluido de embainhamento (“sheath fluid”), que como o nome indica irá servir de bainha, circundando a amostra (figura 4). Esta técnica permite aumentar a precisão com que a amostra é direcionada na zona de observação do citómetro ao restringir as células à zona central do fluxo. Com isto, a probabilidade de entupimento do sistema fluídico diminui, gerando um fluxo estável e sem obstruções que irá minimizar as variações da velocidade e posição do fluxo da amostra (fluxo central). Se o fluxo se tornar turbulento ou instável, maior é a probabilidade de obter dados imprecisos (Shapiro, 2004).

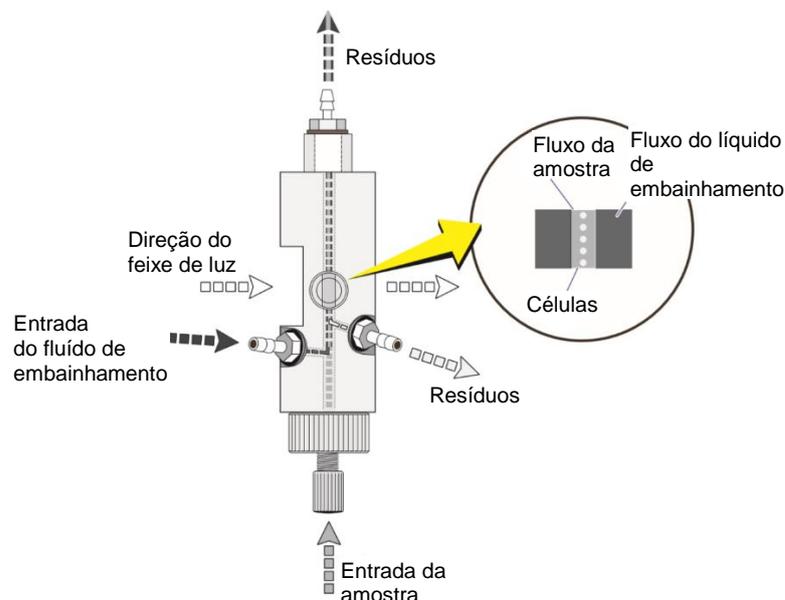


Figura 4 – Sistema fluídico da citometria de fluxo. (Adaptado de Anónimo, 2002).

As velocidades normais de fluxo são de um a dez metros por segundo, originando análises de 100 a 1000 células por segundo (Doležel 1991, *cit in* Loureiro, 2007).

A parte ótica de um citómetro de fluxo consiste na iluminação das partículas por diversas fontes de luz e na redireção da luz refletida e dos sinais de fluorescência para detetores óticos individuais (Sklar 2005, *in* Loureiro 2007). Com isto, pode-se afirmar que o sistema ótico se divide em duas partes: a fonte de luz (lasers) e o sistema de detetores (Anónimo, 2002).

Os lasers (acrónimo de “light amplification by stimulated emission of radiation”), produzem um feixe de luz estável, brilhante e estreito, monocromático, com comprimentos de onda específicos (Carter and Omerod, 2000). A luz é emitida através de um ângulo sólido muito pequeno, tornando possível a sua total concentração numa zona elíptica ou redonda (Shapiro, 2004). Este facto permite que os lasers sejam mais sensíveis na análise de dados (Loureiro, 2007).

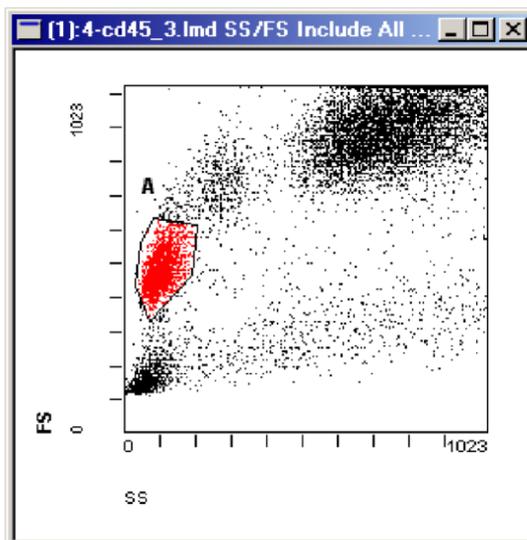
Os citómetros de fluxo são equipados com um laser de cristal de estado sólido verde que é muito vantajoso, nomeadamente em análises de plantas, na medição de genótipos com iodeto de propídio (PI). Este laser emite luz de 532 nm, que se encontra muito perto do comprimento de onda ótimo de ativação do corante IP (ao contrário do que acontece com a maioria dos lasers que emitem a 488 nm), o que resulta numa análise mais sensível com desvios padrão mais baixos (Loureiro, 2007).

Contudo esta vantagem pode tornar-se inconveniente: quando são necessários outros comprimentos de onda, a especificidade dos lasers implica a introdução de outros lasers. São também lasers muito caros. (Suda, 2004).

Para medir a fluorescência emitida pelas células, o sistema de deteção ótica foca-se na zona de encontro entre os feixes de luz e a passagem da amostra, a zona de deteção (ponto de interrogação). Quando as partículas da amostra são iluminadas por lasers, há uma dispersão e emissão de luz fluorescente na presença de corantes fluorescentes ou de partículas auto fluorescentes. A luz que é dispersa a ângulos pequenos em relação ao centro do laser representa a dispersão frontal (forward scatter – FSC), e a luz dispersa a ângulos de 90° designa-se de dispersão lateral (side scatter – SSC). Enquanto que a FSC é proporcional ao tamanho da partícula, a SSC é proporcional à granularidade das células e é utilizada para diferenciar vários tipos de células, por exemplo, tipos de leucócitos (Anónimo, 2002).

A luz proveniente das partículas iluminadas é recolhida por foto-sensores que irão gerar correntes elétricas pulsadas proporcionais à luz recebida. O sistema eletrónico do citómetro de fluxo amplifica, regulariza, integra e analisa estas correntes (Anónimo, 2002).

O sistema operativo é vocacionado para a análise e apresentação de dados obtidos, permitindo o seu armazenamento sob a forma de histogramas ou de listas, onde as medições de cada partícula são registadas (Doležel 1991, *cit in* Loureiro, 2007). Depois de guardados, estes dados podem ser analisados de novo com outras abordagens através da criação e aplicação de regiões e de limites para que apenas sejam analisadas partículas de certo tamanho. A sobreposição de histogramas também é uma ferramenta útil para uma fácil comparação entre amostras. A maioria dos softwares utilizados fornecem também ferramentas básicas de estatística, que auxiliam a interpretação de dados (Loureiro, 2007) (figura 5).



**Figura 5 - Histograma de resultados com recorrência à ferramenta de restrição de zona.
(Fonte: Anónimo, 2002).**

A componente mecânica é constituída por diversos mecanismos que são incorporados nos citómetros de fluxo. Entre estes estão os carregadores de amostras automatizados (carrosséis) (figura 6) e os tabuleiros de clonagem coordenados utilizados na colheita rigorosa de partículas em separadores de fluxo (flow sorters) (Loureiro, 2007).



Figura 6 – Citómetro de fluxo com carrossel. (Fonte: <https://m.bdbiosciences.com/sg/instruments/facs canto/features/options.jsp>.)

1.5.2. A citometria de fluxo nas plantas

As plantas possuem uma estrutura complexa tridimensional entre células, e uma vez que a citometria de fluxo utiliza suspensões de partículas isoladas, a sua aplicação a plantas parecia ser inadequada (Galbraith, 2004). Contudo a primeira aplicação da citometria de fluxo em plantas foi feita em 1973 por Heller, mas a metodologia aplicada na preparação de suspensões de células e núcleos através de pectinase e pepsina foi laboriosa e demorada (Doležel and Bartoš, 2005).

Apenas dez anos mais tarde é que a citometria de fluxo começou a ser mais aplicada às plantas através do isolamento de protoplastos em vez de células. A utilização de células perturba o fluxo do citómetro devido à forma irregular da parede celular; com a possibilidade de remoção da parede celular com enzimas hidrolíticas, os protoplastos começaram a ser utilizados na citometria de fluxo. Uma vez que estes possuem uma estrutura esférica e regular o fluxo já não é perturbado (Doležel and Bartoš, 2005).

Contudo, a utilização de protoplastos também trazia os seus inconvenientes: a baixa permeabilidade da membrana plasmática, a fluorescência do citoplasma e a posição descentrada do núcleo levavam a erros em relação à resolução dos histogramas do conteúdo de DNA (Galbraith 1990, *cit in* Loureiro, 2007). Com isto, começaram a isolar-se núcleos intactos a partir de tecidos vegetais (Loureiro, 2007).

Na década de 80 foram apresentados dois métodos de extração de núcleos. O primeiro baseava-se na lise de protoplastos com detergentes, foi um processo apresentado por Puite e Tenbroeke (1983) que demonstrou ser moroso, trabalhoso e não aplicável a todas as espécies nem a todos os tipos de tecidos. Apesar de gerar bons histogramas, este método é pouco utilizado hoje em dia. O segundo método, sugerido por Galbraith *et al.* (1983), consistia em picar (cortar) uma folha numa solução tampão de isolamento criando uma suspensão de núcleos. Este método, simples, rápido e extremamente conveniente, gerava histogramas de

alta resolução em pouco tempo de análise. Facilmente se pode afirmar que o trabalho de Galbraith revolucionou o início da citometria de fluxo nas plantas e estimulou novas aplicações da citometria de fluxo na biologia vegetal (Doležel and Bartoš, 2005). Esta estratégia é também aplicável a um outro grupo de organismos pluricelulares com parede celular, os fungos, mesmo em situações em que o tamanho do genoma pode ser até 100 ordens de grandeza inferior ao das espécies vegetais de menor genoma (Bourne *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017).

Cálculo do DNA nuclear

A estimativa do DNA nuclear de células é uma das aplicações mais importantes da citometria de fluxo em biologia vegetal. O método de Galbraith *et al.* (1983) tem sido o método mais utilizado globalmente para criar suspensões de núcleos das amostras.

Neste processo, duas folhas são trituradas ao mesmo tempo por meio de uma lâmina em conjunto com o tampão. Os núcleos de cada folha são libertados para o tampão de isolamento. Uma das folhas, ou parte de uma folha, pertence à amostra da espécie cujo conteúdo de DNA pretendemos estimar. A outra folha, ou porção de folha, em quantidades semelhantes à anterior, pertence à espécie padrão escolhida para o procedimento a partir da qual será feita a estimativa do DNA da amostra. Como a citometria de fluxo mede intensidades relativas de fluorescência, a utilização de uma espécie padrão, cujo tamanho do genoma é conhecido, é essencial para conseguir obter estimativas da espécie em questão. De seguida a suspensão é filtrada através de um filtro de nylon para impedir a passagem de resíduos (partes de folhas). Depois de filtrada a amostra é corada com um corante específico para DNA (figura 7) (Doležel and Bartoš, 2005).

O material recolhido pode ser de qualquer parte da planta, desde que possua núcleos intactos (Greilhuber *et al.*, 2007 *cit in* Loureiro, 2007). O tecido recolhido deve estar isento de pragas, doenças ou feridas. Se forem comparadas plantas, estas devem ser provenientes da mesma zona de cultivo (especialmente em relação ao regime da luz) para impedir a influência de diferentes quantidades de compostos citosólicos (Loureiro, 2007).

A quantidade de material necessário depende do tipo de tecido utilizado e deve ser calculada empiricamente. Quando se trata de folhas, 20 a 100 mg geram um fluxo de 50 a 100 partículas por segundo (Loureiro, 2007).

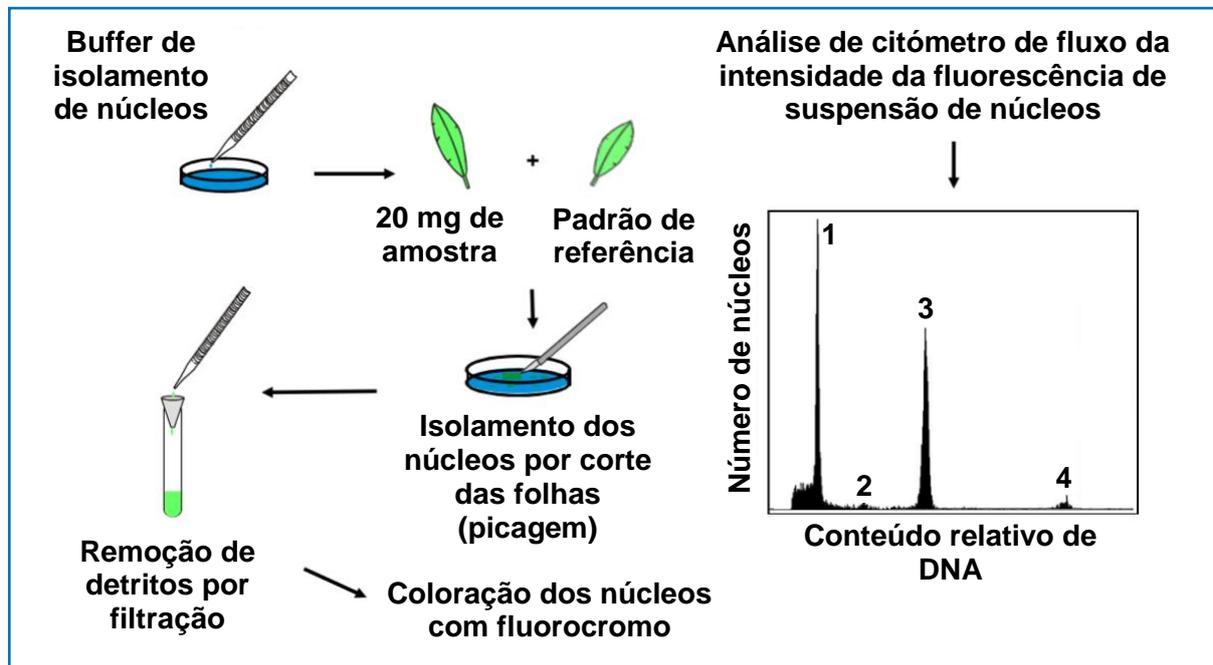


Figura 7 - Diagrama do procedimento de preparação de amostras para determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, desenvolvido por Galbraith *et al.* (1983); 1- pico representativo dos núcleos em fase G_0/G_1 com DNA 2C da amostra, 2- pico representativo dos núcleos em fase G_2 com DNA 4C da amostra, 3- pico representativo dos núcleos em fase G_0/G_1 com DNA 2C do padrão, 4- pico representativo dos núcleos em fase G_2 com DNA 4C do padrão. (Adaptado de Loureiro, 2007).

As folhas, material vegetal mais utilizado em citometria de fluxo, após serem recolhidas devem ser mantidas a baixas temperaturas (Loureiro, 2007), embrulhadas em papel humedecido e fechadas dentro de um saco de plástico (Doležel and Bartoš, 2005).

Ao serem triturados, os tecidos recolhidos irão libertar núcleos para o tampão de isolamento (Galbraith *et al.*, 1983 cit in Loureiro, 2007). A composição do tampão é essencial para obter uma boa quantidade de núcleos de boa qualidade (sem citoplasma, intactos e separados uns dos outros). Também é importante para manter a qualidade do DNA nuclear e impedir a sua degradação por endonucleases. O tampão de isolamento de núcleos facilita também a coloração da molécula de DNA (Doležel and Bartoš, 2005). Loureiro *et al.* (2007) otimizaram dois tampões para a suspensão de núcleos: o "woody plant buffer" (WPB) e o "general purpose buffer" (GPB). Como o nome indica o WPB é mais apropriado para espécies lenhosas, caso contrário, o GPB permite obter histogramas de maior resolução. A utilização destes dois tampões na maioria das espécies estudadas, permite obter histogramas de melhor qualidade quando comparados com os obtidos através de outros tampões (Loureiro *et al.*, 2007).

Depois de filtrada, a solução é corada com fluorocromo que se irá ligar especificamente ao DNA dos núcleos. Os corantes podem ligar-se especificamente a certos pares de bases ou globalmente a qualquer ácido nucleico de cadeia dupla (quadro 2) (Loureiro, 2007).

Quadro 2 – Fluorocromos utilizados em citometria de fluxo nas plantas: modo de ligação, comprimentos de onda de ativação e emissão. (Fonte: Loureiro, 2007).

Fluorocromo	Modo de ligação primário	Comprimento de onda (nm)	
		Excitação	Emissão
Iodeto de propídio (IP)	Intercalação	530 (azul-verde)	605 (vermelho)
Brometo de etídio (EB)	Intercalação	530 (azul-verde)	615 (vermelho)
Laranja de acridina	Intercalação	502 (azul)	525 (verde)
DAPI	Específico de A-T	365 (UV)	450 (azul)
Hoechst 33258	Específico de A-T	365 (UV)	465 (azul)
Hoechst 33342	Específico de A-T	360 (UV)	460 (azul)
Cromomicina A3	Específico de G-C	445 (violeta-azul)	570 (verde)
Mitramicina	Específico de G-C	445 (violeta-azul)	575 (verde)
Olivomicina	Específico de G-C	440 (violeta-azul)	560 (verde)

Uma vez que as estimativas de DNA são feitas com base em comparações dos resultados de uma amostra com DNA padrão, é essencial utilizar corantes que não sejam específicos (iodeto de propídio ou brometo de etídio) (Doležel *et al.* 1992).

A espécie escolhida como DNA de referência deve ser biologicamente semelhante à que vai ser analisada e o tamanho do genoma deve ser parecido. Deve ser tido em conta a disponibilidade da espécie a escolher, a homogeneidade citológica e a quantidade de compostos citológicos. A sua preparação deve ser fácil e resultar em picos estreitos de DNA (baixa variação). A espécie deve ser geneticamente estável, com estimativas de DNA constantes e fidedignas, de fácil acessibilidade para outros investigadores, propagada por semente e facilmente multiplicada. (Greilhuber *et al.* 2007 *cit in* Loureiro, 2007).

Um DNA padrão ideal possui um genoma diferente da amostra, mas não extremamente diferente para não gerar erros (Doležel and Bartoš, 2005).

Uma vez que é difícil cumprir todos estes critérios, são várias as espécies padrão utilizadas até à data (quadro 3) (Loureiro, 2007).

Quadro 3 – Padrões de referência de DNA disponíveis, fornecidos pelo Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, pertencente ao Institute of Experimental Botany, em Olomouc, na República Checa. (Adaptado de Loureiro, 2007).

Espécies	Cultivar	Conteúdo de DNA 2C (pg) ¹	Referência
<i>Vicia faba</i> (Fabaceae)	'Inovec'	26.90	Doležel <i>et al.</i> 1992
<i>Secale cereale</i> (Poaceae)	'Dankovské'	16.19	Doležel <i>et al.</i> 1998
<i>Pisum sativum</i> (Fabaceae)	'Ctirad'	9.09	Doležel <i>et al.</i> 1998
<i>Zea mays</i> (Poaceae)	'CE-777'	5.43	Lysák and Doležel 1998
<i>Glycine max</i> (Fabaceae)	'Polanka'	2.50	Doležel <i>et al.</i> 1994
<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	'Stupické'	1.96	Doležel <i>et al.</i> 1992
<i>Raphanus sativus</i> (Brassicaceae)	'Saxa'	1.11	Doležel <i>et al.</i> 1992

¹ - Conteúdo de DNA nuclear estimado através da utilização de leucócitos humanos masculinos (2C=7.0 pg DNA; Tiersch *et al.* 1989) como padrão de referência primário.

1.5.3. Vantagens e desvantagens

Vantagens

A citometria de fluxo tem algumas vantagens quando relacionada com outros métodos análogos (Loureiro, 2007).

Uma das grandes vantagens é a facilidade de preparação das amostras, a sua conveniência e rapidez, cujo protocolo é de fácil replicação. Uma vez que a citometria de fluxo analisa várias partículas a alta velocidade, a obtenção de dados é bastante rápida, permitindo analisar várias amostras diariamente. Outra vantagem é a pequena quantidade de material necessário na preparação das amostras. A variedade do tipo de tecidos compatíveis com a análise também é um ponto a favor uma vez que células de qualquer tecido, raízes, pétalas, sementes, frutos, entre outros, podem ser utilizadas. Não há necessidade de utilizar células mitoticamente ativas (Loureiro, 2007).

Este método permite também identificar subpopulações, algo que é importante no estudo de casos de endopoliploidia, mixoploidia e de citótipos mais pequenos.

Em termos económicos, após a compra do citómetro que representa a maior despesa, os custos do material consumido nas análises são baixos, o que torna os custos de operação muito pequenos (Loureiro, 2007).

Desvantagens

Um dos problemas mais recentes da citometria de fluxo, e também o mais importante, é a dificuldade em corar os núcleos, devido à presença de compostos citosólicos em certas espécies de plantas vasculares. Os tecidos destas plantas, quando submetidos ao processo de isolamento de núcleos, libertam compostos que condicionam o acesso do fluorocromo ao DNA nuclear e resultam na agregação de partículas de pequeno tamanho aos núcleos afetando as suas propriedades de dispersão. Outra desvantagem deve-se à necessidade constante de possuir material vegetal fresco (Loureiro, 2007).

Quando se pretende detetar pequenas diferenças no tamanho do genoma de amostras, estas devem ser todas analisadas no mesmo laboratório e com o mesmo instrumento de medição. A utilização de diferentes tipos de citómetros (de laser ou de lâmpada) leva a discrepâncias entre resultados. A utilização de diferentes espécies como padrão também leva a uma variação ligeira de resultados, havendo uma falta de consenso geral no que toca a padrões de referência (Doležel *et al.*, 1998).

É essencial que um conjunto de espécies padrão para plantas seja escolhido e utilizado em todo o mundo. Uma investigação coordenada internacionalmente deveria normalizar as diferenças entre as diferentes quantidades de DNA nuclear assumidas para cada espécie padrão e permitir os subseqüentes ajustes nas quantidades de DNA das espécies a analisar. Deveriam também ser adicionadas novas espécies à lista de espécies padrão recomendadas (Johnston *et al.*, 1997).

1.5.4. A citometria de fluxo e o método de Feulgen em *Olea europaea*

A citometria de fluxo tem-se vindo a tornar na técnica mais importante para quantificar o tamanho do genoma e analisar o nível de ploidia de DNA em plantas (Loureiro, 2007). Tal facto deve-se às grandes vantagens que o método apresenta, como já foi referido o seu procedimento é extremamente rápido, fácil e preciso, o que o coloca em vantagem quando comparado com outros métodos com o mesmo objetivo (Doležel and Bartoš, 2005).

A citometria de fluxo foi aplicada pela primeira vez em *Olea europaea* e nas suas cultivares por Loureiro (2007). No estudo publicado a citometria de fluxo foi aplicada a seis cultivares de oliveira de grande importância económica em Portugal (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) e ao zambujeiro (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*), com o objetivo de estudar a variabilidade intraespecífica e comparar os resultados obtidos com trabalhos realizados no passado.

As cultivares utilizadas foram: 'Redondal', 'Santulhana', 'Negrinha', 'Madural', 'Verdeal' e 'Cobrançosa'; as amostras foram recolhidas da coleção de germoplasma da Universidade

de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal (UTAD). As amostras de oliveira selvagem foram obtidas a partir de uma árvore em Porto de Mós, Portugal.

O procedimento utilizado foi o de Galbraith *et al.* (1983) com *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9.09 pg de DNA) como DNA padrão.

Os resultados obtidos nas cultivares variaram de $2,90 \pm 0,020$ pg/2C (Verdeal) a $3,07 \pm 0,018$ pg/2C (Santulhana). Nas amostras de oliveira selvagem os valores rondaram $3,19 \pm 0,047$ pg/2C. Com estudos estatísticos concluiu-se que a oliveira selvagem possui diferenças significativas das cultivares analisadas. A cultivar Verdeal provou ser singularmente diferente de todas as restantes cultivares à exceção da cultivar Cobrançosa. Contudo, os valores extremos diferem apenas em 3,3% entre cultivares e 6,9% entre a oliveira selvagem e a cultivar Verdeal. É difícil estimar se estas variações são causadas por verdadeiras diferenças entre amostras ou se são provenientes de elementos técnicos.

Noutro estudo efetuado por Brito *et al.* (2008) duas cultivares desconhecidas de origem Portuguesa (Aveiro) foram analisadas por citometria de fluxo e obteve-se o valor médio de 3,10 pg/2C. Foram também analisadas várias oliveiras selvagens de três sítios diferentes de Porto Santo pelo mesmo método obtendo-se uma média de 3,18 pg/2C. Estes resultados estão em sintonia com os alcançados por Loureiro (2007) (Brito *et al.*, 2008).

Loureiro *et al.* (2007), calcularam o conteúdo nuclear da oliveira (*Olea europaea* spp. *europaea*) através de citometria de fluxo obtendo $3,24 \pm 0,02$ pg/2C.

A espécie utilizada como DNA padrão foi a ervilha, *Pisum sativum* 'Ctirad' (9.09 pg/2C) para ambos os estudos de Brito *et al.* (2008) e de Loureiro *et al.* (2007).

Porém, Bitonti *et al.* aplicou em 1999 o método de Feulgen (citofotometria) a várias cultivares italianas de oliveiras e obteve resultados diferentes. As cultivares 'Pendolino' e 'Agogia' geraram, respetivamente, o valor mais alto (4,66 pg/2C) e mais baixo (3,90 pg/2C) de quantidade de DNA nuclear, havendo uma diferença de 16,31%, provando a existência de uma grande variabilidade. Foi provada a existência de uma relação positiva entre a quantidade de DNA nuclear e o número de sequências repetitivas ("tandem repeats") presentes em cada genoma. Pode então afirmar-se que este DNA repetitivo é responsável pelas grandes diferenças entre cultivares.

Contudo, verdadeiras variações intraespecíficas relacionadas com repetições de DNA são raras. Na maioria dos casos encontrados estas variações são causadas por condicionantes relacionados com o procedimento utilizado, lacunas técnicas que erráticamente geram variabilidade nos resultados. A variabilidade intraespecífica é mais rara do que comumente se pensa, e a sua veracidade deve ser mais questionada quando se pensa estar na sua presença (Greilhuber, 1998).

Rugini *et al.* (1996) utilizou o método de Feulgen para determinar o tamanho do genoma das cultivares "Leccino" e "Frantoio" que resultaram, respetivamente, em 4,52 e 4,40 pg/2C.

A oliveira por ser uma espécie lenhosa pode representar um desafio no procedimento de isolamento de núcleos. A metodologia utilizada por Loureiro gerou histogramas estáveis, com picos de fluorescência de boa resolução e com baixo desvio padrão, e também com pouco barulho de fundo. Com isto pode considerar-se que os resultados obtidos representam boas estimativas, imparciais e verdadeiras, da quantidade de DNA nuclear.

Uma vez que foram obtidos resultados contraditórios em ambos os estudos, é essencial que seja realizada a mesma avaliação para um maior número de cultivares para aferir a veracidade de cada estudo (Loureiro, 2007).

Foi encontrada poliploidia nas subespécies *maroccana* (hexaplóide) e *cerasiformis* (tetraplóide) por Besnard em 2008. Foram analisadas várias oliveiras da zona mediterrânica (subespécie *europaea*): duas cultivares espanholas, Arbequina e Manzanilla, e uma oliveira selvagem também de origem espanhola. Foi utilizado com DNA padrão núcleos de eritrócitos de frango (BioSure, Grass Valley, CA, USA). Para as cultivares foi obtida uma média de 3,25 pg/2C (foi analisada uma árvore por cultivar) e para a forma selvagem os resultados de três árvores rondaram as 3,4 pg/2C. O resultado médio para todas as formas da subespécie *europaea* foi de 3,39 pg/2C, que é intermédio em relação aos obtidos por Loureiro (2007) e Bitonti (1999). Tal facto deve-se aos diferentes genótipos analisados e às diferentes metodologias de citometria de fluxo utilizadas. Foram utilizadas diferentes espécies como DNA padrão para a estimativa da quantidade de DNA das amostras, sendo difícil, mais uma vez, aferir se as diferenças entre resultados de cada estudo são reais e representativas da variabilidade entre populações do mediterrâneo ou se são resultantes de diferentes métodos adotados (Besnard, 2008).

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

2.1.1. Recolha

O material utilizado é composto por 56 amostras, cada uma representativa de um genótipo diferente, da cultivar Galega Vulgar, provenientes de diversas zonas de Portugal. Todas as amostras, à exceção da amostra 'viveiro', foram recolhidas na Herdade do Reguengo, que representa o polo de Elvas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) no dia 23 de abril de 2018 (figura 8). A amostra 'viveiro' foi recolhida uma semana depois, a partir de uma planta dos viveiros Plansel, representando um genótipo comercial de cultivar Galega Vulgar.



Figura 8 – Parcela do banco de germoplasma de oliveira ‘Galega Vulgar’ na Herdade do Reguengo em Elvas (INIAV).

A maioria das árvores (filas Glg I/II/III e 12 primeiras árvores de Glg IV) foi plantada em 2016, e o restante em 2013, tendo na altura da colheita 2 e 5 anos de idade, respetivamente. O compasso é de 5x2 metros (entrelinha x linha). No anexo 1 é apresentado o mapa da parcela em que foi feita a recolha de amostras.

Foram feitas duas recolhas em simultâneo, uma para a análise de citometria de fluxo e outra para a extração de DNA e posterior aplicação de “primers” (ISSR/RAPD). Para cada árvore foram retirados, duas vezes, vários ramos terminais com um pequeno número de folhas jovens, e separados consoante o método de avaliação de diversidade utilizado (figura 9).

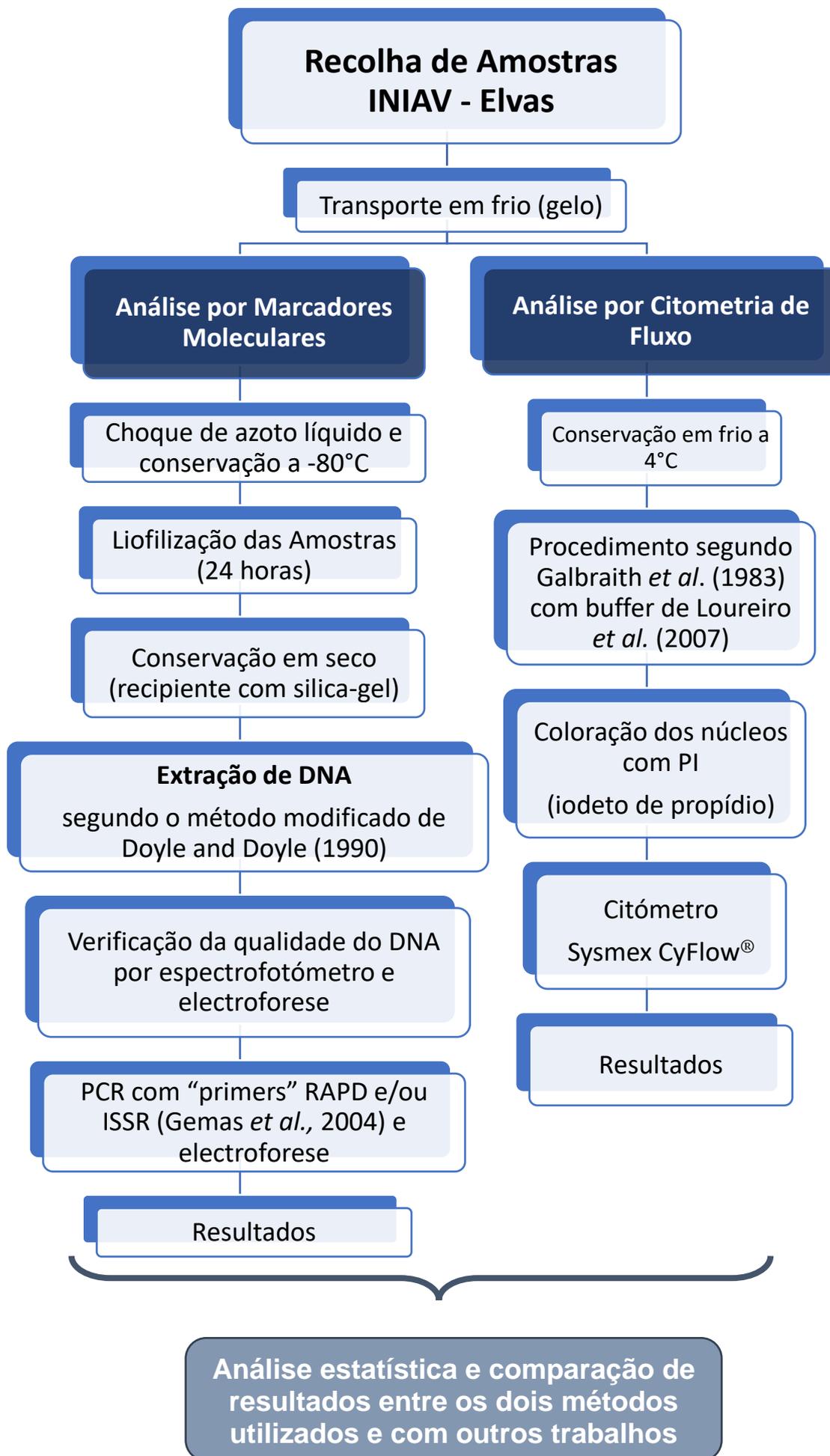


Figura 9 – Fluxograma explicativo dos materiais e métodos de avaliação de variabilidade genómica e genética da ‘Galega Vulgar’.

2.1.2. Conservação

2.1.2.1. Citometria de Fluxo

Após recolhidas, as amostras foram identificadas e guardadas em papel de alumínio ou sacos de plástico. No mesmo dia da recolha foram conservadas em fresco no frigorífico a 5°C. As análises foram realizadas num período de 15 dias após a recolha do material e todos os resultados obtidos são referentes a esse período.

2.1.2.2. Marcadores moleculares

Após recolhidas, as amostras foram identificadas e guardadas em papel de alumínio e colocadas em gelo. Foram transportadas em caixas de esferovite com gelo e congeladas no mesmo dia da recolha em azoto líquido e conservadas a - 80°C. Aproximadamente três semanas depois, as amostras foram liofilizadas durante 29 horas (figura 10). A transferência das amostras do congelador para o liofilizador foi feita em azoto líquido, minimizando o perigo de descongelamento. Depois de liofilizadas as amostras foram mantidas num recipiente com sílica-gel e isolado com parafilme.



Figura 10 – Liofilização das amostras.

2.2. Métodos

2.2.1. Citometria de Fluxo

O procedimento utilizado para a citometria de fluxo consiste numa adaptação do método de Galbraith *et al.* (1983) feita por Loureiro (2007). Apesar de ser aplicado um procedimento semelhante ao de Galbraith *et al.* (1983), o tampão utilizado é criado por Loureiro *et al.* (2007). O corante escolhido para corar os núcleos também difere, assim como o facto de só na adaptação de Loureiro (2007) se introduzir um DNA de referência. Na metodologia original, Galbraith *et al.* utilizam microesferas fluorescentes como padrão para calcular o DNA nuclear.

O primeiro passo do protocolo consiste em cortar uma porção de folha de oliveira (figura 11) e tentar igualar o máximo possível, em quantidade, uma outra porção de folha do DNA padrão (figura 13A). Isto permite aproximar ao máximo o número de núcleos avaliados para cada espécie, evitando grandes discrepâncias quantitativas entre o padrão e a amostra,



Figura 11 – Lançamentos recolhidos e folhas terminais jovens utilizadas para a suspensão de núcleos.

permitindo calcular a quantidade relativa de DNA nuclear de maneira mais precisa possível.

A espécie escolhida como DNA de referência foi o buxo, *Buxus sempervirens* (figura 12). O buxo foi utilizado como DNA padrão por Cravo (trabalho por publicar). Esta espécie possui quantidades de DNA semelhantes à oliveira, mas não iguais; as diferenças entre o padrão e amostra são suficientes para comparar valores e calcular a quantidade relativa de DNA da oliveira. Gera picos estreitos e fáceis de identificar devido à baixa variabilidade e é

facilmente propagada por semente ou estaca. Contudo, a acessibilidade da espécie a todos os investigadores não é garantida.



Figura 12 – *Buxus sempervirens* no pátio do edifício principal do ISA em julho de 2018.

Cada porção de folha de oliveira é finamente dividida, com uma lâmina, em conjunto com o buxo num mililitro de tampão WPB (Woody Plant Buffer) criado por Loureiro *et al.* (2007) (figura 13). Este tampão é composto por 0,2 M de Tris-HCL (TRIZMA), 4 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1% de TRITON X-100, 2mM $EDTA Na_2 \cdot 2H_2O$, 86mM NaCl, 10mM $Na_2S_2O_5$ (metabissulfito de sódio), 1% PVP-10 e água (quadro 4). No fim da adição de todos os componentes à água, o pH do tampão é ajustado até 7,5 recorrendo a partículas de hidróxido de sódio. O tampão é depois armazenado e conservado a 4°C.

A composição do WPB é baseada no tampão $Tris.MgCl_2$ (Pfosser *et al.*, 1995), sendo este o tampão que melhor contraria os efeitos negativos do ácido tânico (Loureiro *et al.*, 2007). Este composto fenólico interfere na ligação do corante às moléculas de DNA gerando resultados erráticos, especialmente em plantas lenhosas (Loureiro *et al.*, 2006).

A adição de EDTA (agente quelante) e de NaCl (sal inorgânico) provêm do tampão LB01 utilizado pela primeira vez por Doležel *et al.* em 1989. O EDTA liga-se a cátions divalentes que atuam como cofatores de DNases; ao adicionar este composto ao tampão a degradação de DNA é bloqueada. Sais inorgânicos, NaCl no caso do WPB, são utilizados para atingir um certo nível de força iónica (Doležel and Bartoš, 2005).

Quadro 4 - Composição de tampões utilizados em citometria de fluxo. Adaptado de: Loureiro *et al.*, 2007 e Doležel and Bartoš, 2005.

Tampão	Composição	Referência
Tris-MgCl ₂	0,2 M Tris; 4 mM MgCl ₂ •6H ₂ O; 0,5% (v/v) Trinton X-100; pH 7,5	Pfosser <i>et al.</i> (1995)
WPB	0,2 M Tris-HCl; 4 mM MgCl ₂ •6H ₂ O, 2mM EDTA Na ₂ •2H ₂ O; 86 mM NaCl, 10 mM metabissulfito de sódio; 1% PVP-10; 1% (v/v) Triton X-100; pH 7,5.	Loureiro <i>et al.</i> (2007)
LB01	15mM Tris; 2mM Na ₂ EDTA; 0,5 mM espermina 4HCl; 80 mM KCl; 20mM NaCl; 15mM β-mercaptoetanol; 0,1% (v/v) Triton X-100; ph 7,5.	Doležel <i>et al.</i> (1989)

O Triton X-100, sendo um detergente não-iônico, é utilizado para facilitar a libertação dos núcleos a partir das células e impedir a sua aglomeração. Este detergente permite também afastar resíduos dos núcleos isolados, impedindo também a sua agregação (Doležel and Bartoš, 2005).

O metabissulfito de sódio e o PVP-10 são introduzidos no WPB para que este possa ser utilizado em espécies recalcitrantes, nomeadamente plantas lenhosas que possuem um alto nível de fenóis e outros metabolitos secundários (Loureiro *et al.*, 2007). O metabissulfito de sódio é o agente redutor que impede que os compostos fenólicos estejam ativos, enquanto que o PVP-10 gera a aglomeração desses compostos num estado reduzido, uma vez que é um concorrente de fenóis (Greilhuber *et al.*, 2007 *cit in* Loureiro *et al.*, 2007).

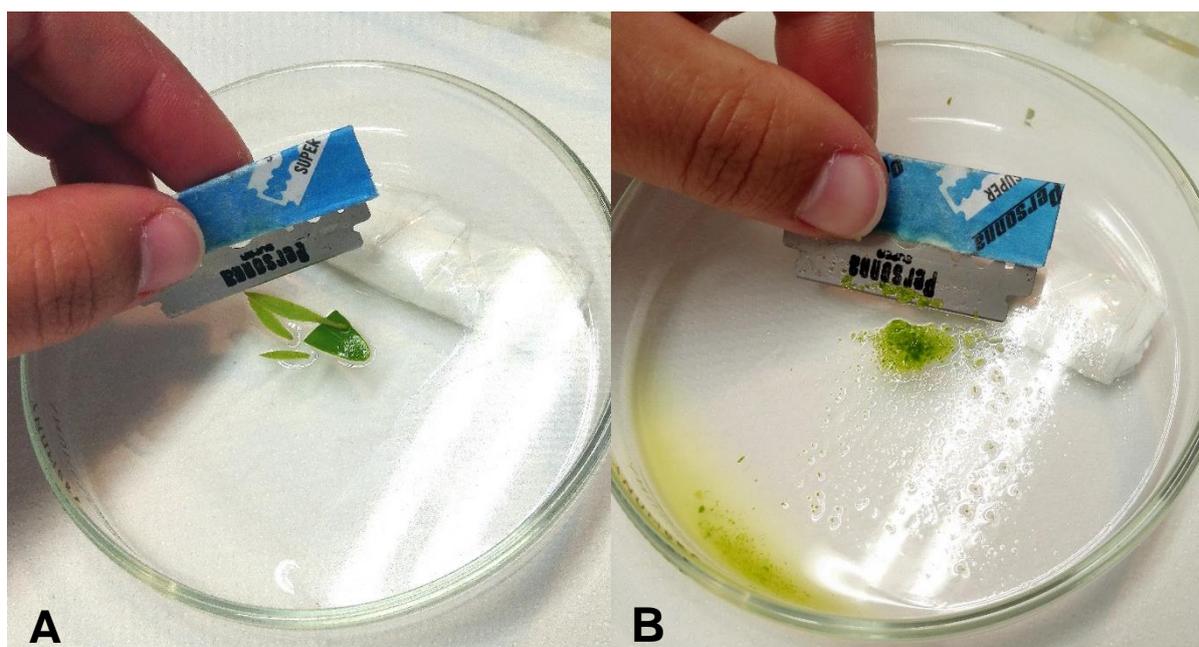


Figura 13 - Trituração conjunta de folhas de oliveira 'Galega Vulgar' e do padrão de DNA *Buxus sempervirens* no tampão WPB.

Após fragmentação, a suspensão de núcleos é filtrada numa malha de 30 μ m e é adicionado o corante. Cada suspensão é corada com Iodeto de Propídio (IP). O iodeto de propídio (empresa: Sigma-Aldrich; referência: P4170) é adquirido em pó, a partir do qual é feita uma solução aquosa que é conservada a -20°C.

Foi realizado um teste comparando a concentração de IP normalmente preparada (50 μ g/ml), utilizada por vários autores (Deitch *et al.*, 1982; Doležel *et al.*, 1989; Loureiro, 2007), com as diluições 0,5, 0,25 e 0,125. Cada porção de folha foi triturada com 5 ml de WPB e a solução dividida por 4 tubos, sendo o volume final ajustado com WPB. A cada tubo foi adicionado 5 μ l da respetiva concentração de IP. Este processo foi repetido seis vezes, havendo assim seis amostras preparadas. Os resultados deste teste serão apresentados na secção de resultados e discussão (capítulo 3.1.1.), contudo, pode afirmar-se que a concentração adotada no presente trabalho (12,5 μ g/ml) fornece melhor eficácia gerando resultados com menos “ruído de fundo”.

Este corante, ao contrário do utilizado por Galbraith em 1983, não é específico de certas bases e permite obter uma estimativa mais correta da quantidade absoluta de DNA. A mitramicina, usada por Galbraith, é específica de ligações entre citosina e guanina, gerando estimativas de DNA que são influenciadas pela sua composição (proporção de cada tipo de base).

O IP é excitado com luz azul-esverdeada e emite fluorescência vermelha (Suda, 2004).

O tubo contendo a amostra é inserido no citómetro e são feitas 6 repetições para cada amostra.

No citómetro, as amostras são analisadas recorrendo a um laser de cristal de estado sólido verde, de comprimento de onda de 532 nm. Este comprimento de onda é muito semelhante ao comprimento de onda ótimo de excitação do corante IP (530 nm), o que resulta numa análise mais precisa, gerando desvios padrão mais baixos (Loureiro, 2007).

2.2.1.1. Recolha de Dados

Cada repetição consiste na paragem da contagem de núcleos, através do software que controla o citómetro, e na recolha de dados da respetiva repetição. A média e desvio padrão de cada pico do histograma (da amostra e do DNA de referência) são registados através de uma ferramenta de delimitação de dados e é feita recolha da imagem dos gráficos através da ferramenta de recorte (figura 14).

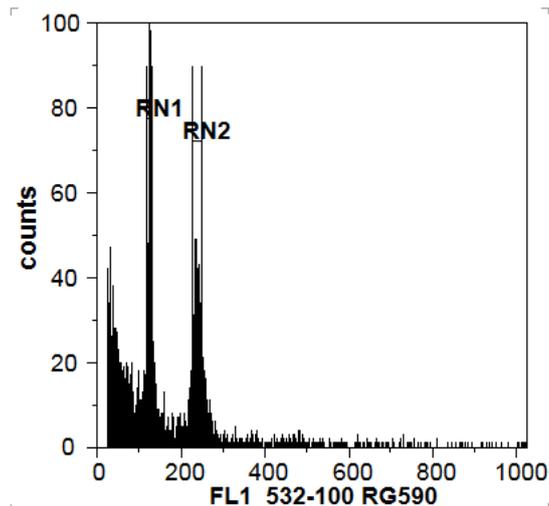


Figura 14 - Gráfico resultante da análise de citometria de fluxo da amostra 2213R_002 com laser verde de 532nm. No eixo das abcissas é contabilizada a fluorescência (conteúdo nuclear) captada pelo laser e no eixo das ordenadas está o número de contagens.

Após recolhidos os dados de fluorescência da amostra e do DNA padrão, o valor do DNA nuclear da amostra é calculado. Esta estimativa é feita com base no valor de DNA nuclear da referência já conhecido, sendo neste caso para o buxo (*Buxus sempervirens*) de 1,63 pg/2C (Cravo, trabalho não publicado).

Este valor, ao contrário do calculado por Hanson *et al.* em 2003 ($3,24 \pm 0,01$ pg/4C ou $1,62 \pm 0,01$ pg/2C), foi obtido recorrendo a citometria de fluxo e várias espécies de referência como o tomate (*Solanum lycopersicum*), o rabanete (*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativa*) e o milho (*Zea mays*). Hanson *et al.* (2003) calcularam a quantidade de DNA nuclear do buxo com base em apenas uma espécie, o arroz, através de citometria de fluxo.

Apesar da estimativa realizada por Cravo ser baseada em mais espécies, o valor calculado é semelhante ao de Hanson *et al.*, 2003. Ambos se diferenciam apenas na ordem das centésimas, tal variação que é prevista por Hanson *et al.*, 2003.

$$\text{Conteúdo de DNA nuclear/2C de } \textit{Olea europaea ssp. europaea cultivar Galega Vulgar} \text{ (pg)} = \frac{\text{média do pico da amostra } (\textit{Olea europaea ssp. europaea cultivar Galega Vulgar})}{\text{média do pico da referência } (\textit{Buxus sempervirens})} \times 1,63$$

De seguida os valores são convertidos em Mbp (Megabase pair), o equivalente a um milhão de pares de base. O fator de conversão utilizado é $1\text{pg} = 978\text{ Mbp}$ (Dolezel *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados resultantes da citometria de fluxo, foi utilizado o programa RStudio. Foi feita, em primeiro lugar, uma avaliação da normalidade de distribuição das amostras tanto no problema da concentração do IP como na avaliação da variabilidade citogenómica, utilizando o teste de Shapiro-Wilk.

De seguida foi aplicado o teste paramétrico da ANOVA (analysis of variance) com $\alpha = 0,05$. Para avaliar as relações de similaridade entre as amostras recorreu-se ao teste de Tukey, com $\alpha = 0,05$.

2.2.2. Marcadores moleculares

2.2.2.1. Extração de DNA

O método de extração de DNA foi adaptado de Doyle and Doyle (1990).

O primeiro passo consiste em macerar 150 miligramas de folhas liofilizadas num almofariz, até ficar em pó, com o auxílio de azoto líquido. O pó recolhido é incorporado em 10 ml de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio) e 10µl de β-Mercaptoetanol, ficando meia hora em banho-maria, a 65°C.

O tampão CTAB é composto por 2% de CTAB em pó, 1,4 M de NaCl (cloreto de sódio), 100 mM Tris HCl (tris hidroximetil aminometano cloridrato) de pH 8, 20 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 1% de PVP (polivinilpirrolidona).

É adicionada uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico de 24:1 em igual quantidade ao volume pré-existente e é feita uma agitação manual durante três minutos. O clorofórmio permite remover proteínas (Murray and Thompson, 1980) e o álcool isoamílico estabiliza o clorofórmio.

De seguida a amostra é centrifugada durante 10 minutos a 10000 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente. O sobrenadante é recolhido, e a este é adicionada RNase (concentração final de 1 µg/ml). Depois de ser adicionada a RNase, a amostra vai para incubar a 37°C durante meia hora.

Após esse tempo é novamente adicionada a mistura de clorofórmio e álcool isoamílico em igual quantidade à presente no tubo, sendo este agitado e de seguida centrifugado durante 10 minutos, a 10000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante é extraído e transferido para um novo tubo onde é adicionado 1/10 volume de acetato de sódio (pH 5,2; concentração: 3M) e 2/3 volume de isopropanol puro (a -20°C).

O tubo é inclinado ligeiramente, várias vezes, fazendo reagir os componentes para precipitar o DNA. A amostra é colocada no congelador durante pelo menos quatro horas e centrifugada a 4°C, durante três minutos, a 10000 rpm. Após a centrifugação o precipitado é reservado, drenando os componentes líquidos.

O precipitado é lavado com 500 µl de solução de lavagem durante 30 minutos num agitador. A solução de lavagem é composta por 76% de etanol e 10 mM de acetato de amónio.

Após uma nova centrifugação e drenagem o precipitado é seco à temperatura ambiente e de seguida em estufa a 40°C.

É feita uma dissolução, aplicando 300 µl de cloreto de sódio (concentração: 5 M) e 600 µl de TE.

O TE possui um pH de 8,0 e é composto por 10 mM de Tris HCl e 1 mM de EDTA (Sambrook *et al*,1989)

A dissolução do precipitado é feita em banho-maria a 65°C durante pelo menos cinco horas. Após este período a solução contendo o DNA é transferida para um tubo eppendorf onde é novamente adicionada a mistura de clorofórmio (em 1:1). Depois da agitação manual há uma nova centrifugação durante 10 minutos a 130000 rpm, à temperatura ambiente.

O sobrenadante é recolhido e é-lhe adicionado 2/3 do volume isopropanol puro. A amostra é inclinada várias vezes fazendo reagir os componentes. Se é observada precipitação de DNA, a amostra é centrifugada e o sobrenadante drenado. Se não se verifica precipitação de DNA de forma visível, a amostra é colocada no congelador a -20°C durante pelo menos uma hora.

A centrifugação após precipitação do DNA é feita durante cinco minutos a 130000 rpm, a temperatura ambiente. De seguida o precipitado é lavado com etanol a 70% no agitador durante aproximadamente 30 a 45 minutos. Depois de drenado o precipitado é seco ao ar livre e posteriormente numa estufa a 40°C.

Quando a secagem está completa são adicionados 50µl de TE para hidratar o precipitado. Para auxiliar na dissolução a amostra é colocada na estufa a 40°C durante algumas horas.

Após este processo de extração, a utilização do DNA puro resultante não demonstrou resultados coerentes havendo RNA nos géis de quantificação e inconsistência no produtos de PCR aquando da aplicação dos “primers” (capítulo 3.2.1). Foi feita uma diluição de 1:30 (5µl de DNA puro + 145µl de TE), que continuou sem demonstrar produtos de PCR. Por esta razão recorreu-se a uma segunda purificação.

Com o DNA puro resultante da extração realizou-se uma diluição em TE de 1:30 (5µl de DNA puro + 145µl de TE). A esta diluição foram adicionados 10µl de RNase e os tubos foram postos na estufa a 37°C durante meia hora. De seguida foram adicionados 300µl de água destilada filtrada a cada amostra para que a pipetagem do sobrenadante após a adição de clorofórmio fosse facilitada. Os tubos foram enchidos até à capacidade total com clorofórmio, igualando ou ultrapassando o volume da diluição do DNA. De seguida as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente, durante dez minutos, a 130000 rpm. Ao sobrenadante extraído foi adicionado etanol a 100% até perfazer o volume total do tubo eppendorf, sendo o volume adicionado sempre superior a 2,5 do volume pré-existente no tubo. Para precipitar o DNA, os tubos foram mantidos durante pelo menos duas horas no congelador a -80°C. Após a precipitação, os eppis são centrifugados a 4°C durante dez minutos, a 13000 rpm. Os tubos são drenados, mantendo o pellet no fundo, que é depois lavado durante meia hora num agitador com 400 µl de solução de lavagem. Após lavagem os tubos são centrifugados à temperatura ambiente, durante 10 minutos, a 130000 rpm. A solução de lavagem é drenada e os pellets são novamente lavados. Após a segunda drenagem, o pellet é seco à temperatura

ambiente durante dez minutos e de seguida os tubos são colocados na estufa a 50°C até os pellets estarem secos. Após secagem são adicionados 20µl de TE a cada tubo, e a hidratação do DNA é feita em banho-maria a 56°C durante pelo menos duas horas.

A solução resultante de todo este processo é utilizada pura na aplicação dos “primers” e na obtenção dos resultados finais.

Todos os reagentes são conservados à temperatura ambiente, à exceção do isopropanol e da solução de lavagem que são mantidos a -20°C.

2.2.2.2. Avaliação Quantitativa/Qualitativa de DNA

O DNA extraído foi avaliado através de uma diluição de 1:50 analisada no espectrofotómetro.

Após esta análise foi feita uma quantificação do DNA por eletroforese (100V) em gel de agarose de 1,2% durante 45 minutos, com 1 µl da solução de DNA extraído não diluída, e 2 µl de azul de bromofenol (0,1% p/v; conservado a temperatura ambiente), recorrendo aos marcadores Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (1 µl) da Fermentas (concentração: 0,5 µg/µl) e Ladder II (5 µl) da NZYTech (100 bandas) (Figura 10). Cada gel foi composto por 1,2% de agarose, 1xTAE (Tris-Acetato-EDTA) e 2,5 µl de Greensafe premium da NZYTech por cada 100 ml de gel. O Greensafe é conservado no frio a 5°C.

O tampão TAE é composto por 0,04 M de Tris acetato e 0,001 M de EDTA (1xTAE) (Sambrook *et al*,1989).

2.2.2.3. Utilização do “primer” 18S para controlar a viabilidade de amplificação do DNA

Antes de serem aplicados os RAPD e ISSR, os “primers” para o gene ribossomal 18S foram testados em todas as amostras para verificar a viabilidade do DNA em reações de amplificação e determinar a quantidade ideal para aplicação dos “primers” RAPD e ISSR. Este conjunto de “primers” foi desenhado para a macieira e é comumente utilizado no laboratório (quadro 5).

Quadro 5 – Sequências dos “primers” 18S “forward” e “reverse”.

18S-F	5' GATAAAAGGTCGACGCGGACT 3'
18S-R	5' GACCCAACCCAAGGTCCA ACT 3'

Todas as 55 amostras foram testadas com o 18S com o objetivo de pré-determinar as quantidades certas (microlitros de DNA puro) a utilizar.

2.2.2.4. Aplicação de “primers” ISSR/RAPD

Os “primers” foram escolhidos com base no trabalho de Gemas *et al.* (2004) que estudaram a variabilidade genética intra-varietal da cultivar Galega Vulgar. O trabalho de Gemas *et al.* (2000) também foi consultado, onde é estudada a intra e intervariabilidade de três cultivares de *Olea europaea* com RAPDs, entre elas a ‘Galega Vulgar’. No anexo 3 encontra-se uma tabela com o levantamento dos “primers” utilizados em várias cultivares de *Olea europaea* e em ‘Galega Vulgar’.

Os RAPD utilizados foram OPC-04, OPC-07, OPC-08, OPC-10 e OPC-13 (Operon RAPD 10 mer Kit, disponível em: <http://www.cosmogenetech.com/cosmo/upload/files/brochure/operon%20RAPD%20kit.pdf>.)

. Para os ISSR foram escolhidos o 9MS, (GAC)₅, (GTC)₅, (GTGC)₄ e (GACA)₄. A sequência de cada “primer” está descrita no anexo 4.

2.2.2.5. PCR

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), criada por Mullis e Faloona (1987), permite amplificar uma cadeia de DNA, gerando milhares de cópias de um dado segmento. Com o auxílio de “primers”, a utilização desta técnica possibilita a multiplicação de zonas específicas no genoma, tornando possível a sua identificação, mais tarde, em eletroforese.

O método desenvolvido por Mullis e Faloona (1987) é composto por três ciclos: o 1º a 94°C (desnaturação das cadeias duplas de DNA), o 2º cuja temperatura se situa normalmente entre os 40 a 65°C, consoante o “primer” utilizado (emparelhamento – ligação do “primer”) e o 3º e último a 72°C (alongamento das cadeias).

Cada PCR realizado foi composto por:

- Ciclo 1: 94°C, durante 5 minutos
- Ciclo 2: 94°C, durante 45 segundos
- Ciclo 3: 35°C (RAPD) ou 50°C (ISSR), durante 45 segundos
- Ciclo 4: 72°C, durante 45 segundos
- Ciclo 5: 72°C, durante 5 minutos

40 vezes

O primeiro e último ciclo foram aplicados para assegurar que todas as cadeias de DNA eram desnaturadas e alongadas, respetivamente. O número total de ciclos foi ajustado consoante a qualidade das bandas obtidas na eletroforese (arrastamento).

A enzima utilizada foi a NZYTaQ DNA polymerase (“stock”: 5 u/μl; utilização de 1,6(6) unidades por amostra) (MB00102) em conjunto com MgCl₂ (cloreto de magnésio) (“stock”: 50 mM) e 10x reaction buffer. Os dNTPs utilizados estavam na concentração de “stock” 10 mM para cada nucleótido. As concentrações finais em cada reação de PCR foram 1x tampão de reação, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μM de cada um dos dNTPs, 0,2 μM de cada “primer” no caso do 18S-F e 18S-R ou 0,4 μM de cada “primer” no caso de RAPD ou ISSR.

A quantidade de DNA utilizada variou de amostra para amostra e de “primer” para “primer” tomando valores entre 0,3 μl e 1,3 μl.

2.2.2.5. Electroforese

Para electroforese, 10 μl de cada amostra (produto do PCR) foi misturada com 2μl de azul de bromofenol. Foram utilizados géis de agarose de 2%, com 3,2 μl de Greensafe por cada 100ml de gel. Cada gel foi submetido a uma voltagem de 100V durante um total de 2h30.

Para auxiliar na identificação de bandas foi utilizado 1μl de DNA Ladder de 100 bp (“base pair” = pares de bases) (concentração: 0,5 μg/μl) da Fermentas, em cada gel (figura 15).

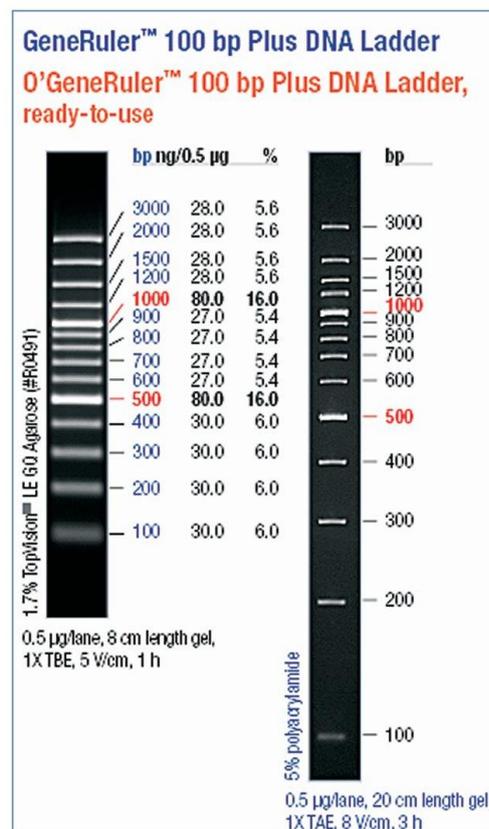


Figura 15 - Marcador DNA Ladder 100pb.

2.2.2.6. Recolha de Dados

Cada gel foi observado num transiluminador de luz ultravioleta.

Ao fim da primeira hora de cada electroforese os géis foram vistos sob o transiluminador e fotografados. A cada 15 minutos a partir da primeira hora este processo era repetido até chegar ao tempo final de 2h30.

As fotos foram obtidas através de uma câmara dupla de 12 MP+28 MP, no modo noite, com os parâmetros de ISO e S em modo automático. A contagem das bandas foi feita através da observação das fotos em formato digital. Vários parâmetros foram ajustados (luminosidade, contraste, etc.) para facilitar a identificação das bandas.

Todas as bandas a partir de 200 bp foram consideradas e registadas sob a forma de sistema binário sendo que 1 significa presença de banda e 0 ausência.

Através do software RStudio (<https://www.rstudio.com/>) foi obtida a matriz de similaridade e respetivo dendrograma. O dendrograma obtido foi baseado em distâncias euclidianas e no método de “complete linkage (furthest neighbour)” que define a distância entre dois grupos como a distância entre os dois objetos mais afastados (um em cada grupo).

3. Resultados e discussão

3.1. Citometria de fluxo

3.1.1. Concentração de Iodeto de Propídio

O pico causado pela contagem dos núcleos de oliveira foi delimitado para cada repetição (RN1). Para cada um foi obtida a fluorescência média (“Mean-x”), o coeficiente de variação (CV-x%), a contagem total de núcleos (“Count”), o número de contagens por mililitro de solução de amostra preparada (“Count/ml”) e a percentagem de medições (núcleos) abrangida pelo pico em relação à amostra total (“%Gated”) (figura 16).

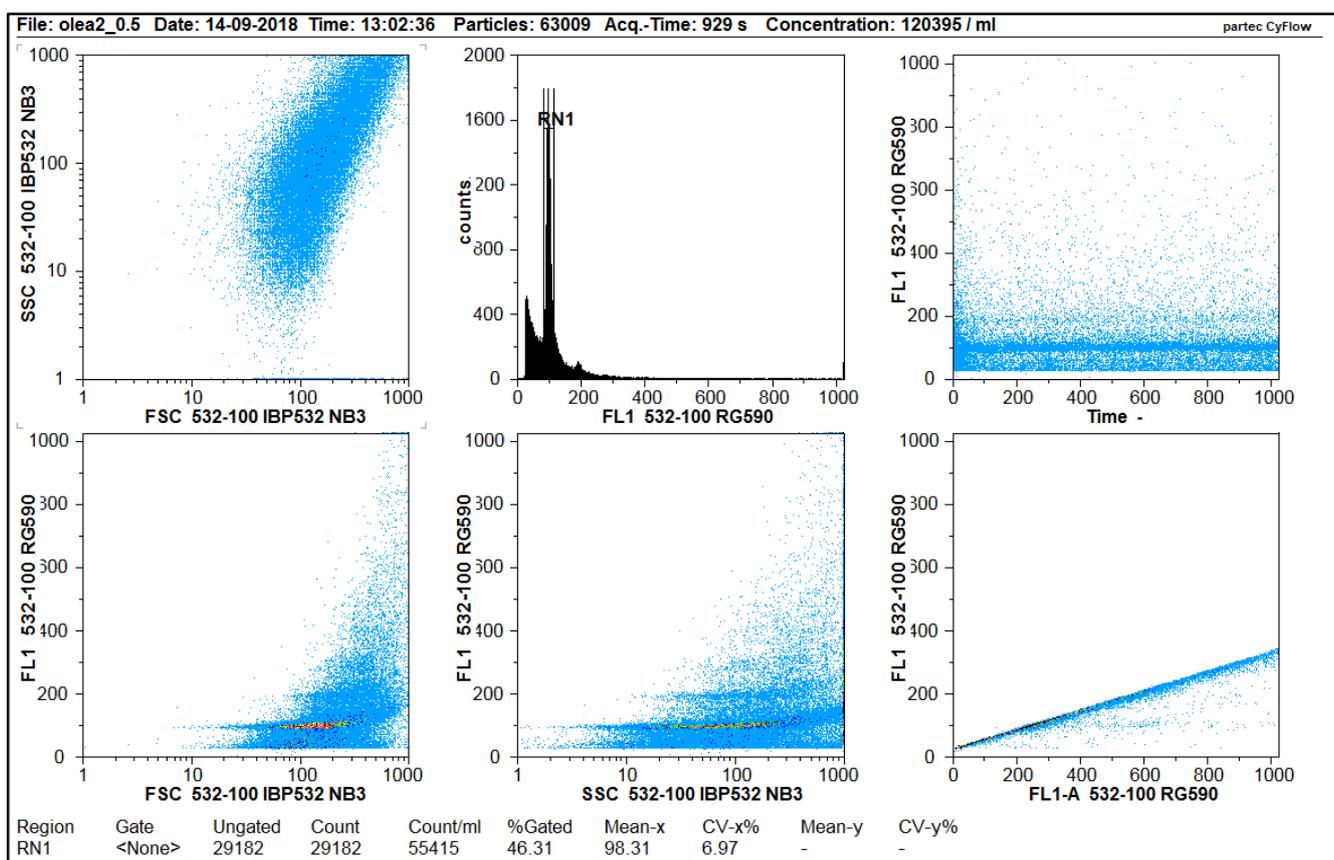


Figura 16 - Gráficos resultantes de uma análise de citometria de fluxo da preparação da segunda amostra de folhas de oliveira ‘Galega Vulgar’ com uma concentração de iodeto de propídio de 0,5. Nos eixos das coordenadas estão o SSC (side scatter), FSC (forward scatter) e o FL1 (fluorescência) resultante do laser de 532 nm assim como a contagem de partículas analisadas (counts) e do tempo decorrido (time).

Apesar da zona delimitada (pico) ser constituída por núcleos de células de oliveira, não deixa de existir uma parte composta por impurezas ou células em divisão que afetam a leitura final. Tal facto faz com o valor de “%Gated”, que dá uma noção da percentagem de núcleos em relação ao “lixo” total a amostra, possa estar ligeiramente sobrestimado.

O programa utilizado forneceu também a informação relativa ao número total de contagens por amostra. Em conjunto com o valor de “%Gated” foi calculado “%Ungated” que

representa a zona não abrangida por RN1, ou seja, o “lixo”. Com o valor de contagens totais e com a percentagem de lixo, foi determinado o número de contagens de “lixo”.

Os dados recolhidos na totalidade são apresentados no anexo 5.

No quadro 6 estão presentes os valores médios resultantes das repetições.

Quadro 6 - Médias dos resultados obtidos através de leitura de núcleos de ‘Galega Vulgar’ com diferentes concentrações de iodeto de propídio em citometria de fluxo. Cada concentração foi testada em seis repetições, na preparação de seis amostras diferentes.

Concentração IP	Contagem total RN1 (núcleos)	Contagem/ml RN1	%Gated (núcleos)	Fluorescência média	Coefficiente de variação (%)	Contagem total (lixo e núcleos)	%Ungated (lixo)	Contagem lixo
1	38474	74354	36,89	116,89	7,38	101690	63,11	63216
0,5	35313	67946	42,19	103,41	7,15	81146	57,81	45833
0,25	32838	64248	44,72	95,52	7,03	72068	55,28	39232
0,125	32113	64271	49,22	83,89	6,95	64177	50,78	32065

Podemos observar que à medida que a concentração do IP foi diminuindo a percentagem de núcleos avaliados pelo citómetro aumentou (“%Gated”), ou seja, a sua eficiência melhorou. Ao ser utilizado na concentração normal, a percentagem de núcleos avaliado é inferior em 12,33%, em relação à diluição de 0,25. Como consequência a percentagem de “lixo” analisado (“%Ungated”) diminui na mesma quantidade, assim como a contagem de “lixo”.

Contudo, a contagem total, tanto em RN1 como na amostra toda, diminui à medida que o corante é mais diluído. Isto é de esperar uma vez que a diluição do IP vai diminuir a sua eficácia como corante apesar de aumentar a sua eficiência como discriminante de “%Gated” e “%Ungated”. Com a diminuição da contagem total, há diretamente uma diminuição do número de contagens por mililitro de amostra.

O coeficiente de variação também diminui à medida que o corante é mais diluído (-5,83%), traduzindo menor variabilidade.

O facto de a fluorescência média diminuir com a concentração do IP pode indicar uma perda de capacidade do corante de atingir os núcleos de maior dimensão ou apenas uma aproximação ao valor médio real devido à presença de menos “lixo”. Contudo esta variação pode ser meramente amostral pois a variação de fluorescência que acontece na oliveira, aconteceria também na amostra padrão (*Buxus sempervirens*). Quando feita a conversão de fluorescência em conteúdo nuclear com base na amostra referência, os resultados seriam iguais uma vez que o valor do padrão iria variar do mesmo modo que a amostra.

Uma vez que é o parâmetro “%Ungated” que nos fornece informação acerca da eficiência do IP e a da sua variação com a concentração, este foi avaliado estatisticamente.

Na figura 17 pode ser observado o gráfico de quantis desta variável. É visível que a variação de resultados é muito menor na concentração de 0,25, e que o valor de “%Ungated” vai diminuindo com a concentração, tomando o seu menor valor em 0,125.

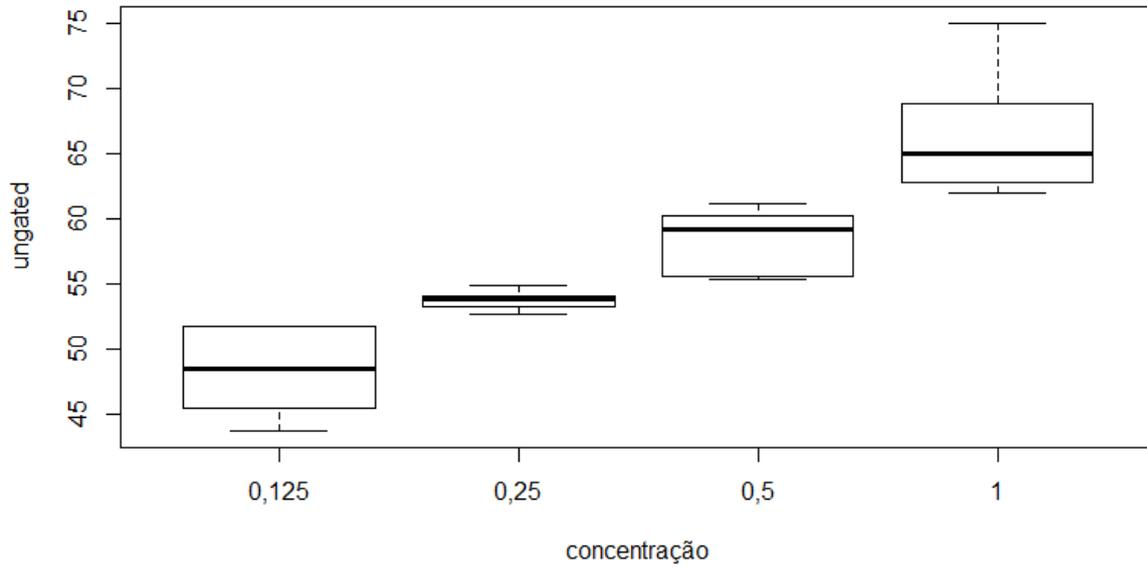


Figura 17 - Gráfico de quantis da variável “%Ungated”.

Recorrendo ao programa RStudio foi avaliada a normalidade da distribuição da variável através do teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado também o comando ‘qqnorm’ que gera um gráfico de quantis da distribuição normal (figura 18).

Normal Q-Q Plot

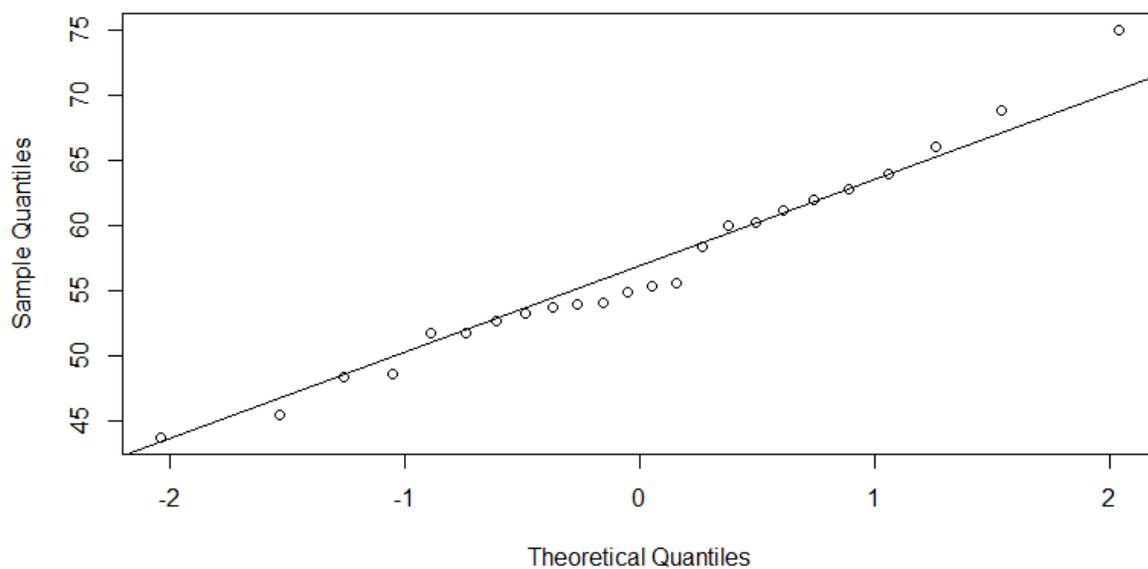


Figura 18 – Gráfico de quantis da normal dos dados de “%Ungated”.

Shapiro-Wilk normality test
 data: ungated
 w = 0.97442, p-value = 0.7753

Apesar dos dados terem passado no teste de normalidade, pois o “p-value” foi maior do que $\alpha = 0,05$, pode observar-se no gráfico de quantis que há alguns desvios à normalidade. Contudo, devido ao número de amostras estes desvios não são significativos.

Assim, para avaliar se o fator concentração teve algum efeito na variável resposta, foi aplicado um teste paramétrico ANOVA.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
concentração	3	475.7	158.57	3.987	0.0223 *
Residuals	20	795.4	39.77		

 Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Como o “p-value” é menor do que $\alpha = 0,05$, podemos rejeitar a hipótese nula (H_0) e concluir que as médias da variável “lixo” (“%Ungated”) são significativamente diferentes entre concentrações.

De seguida foi aplicado o teste de Tukey (hsd test) (figura 19).

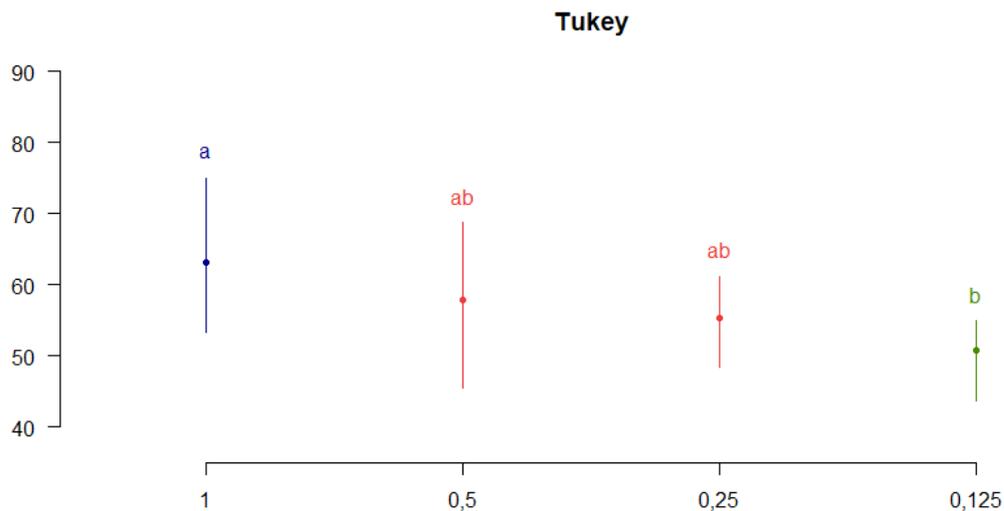


Figura 19 – Gráfico resultante da análise de comparações múltiplas de Tukey dos valores de concentração de iodeto de propídio.

É visível que os resultados de diferentes concentrações são diferentes entre si, sendo que a concentração de 0,5 não é estatisticamente diferente da de 0,25. Contudo esta última possui uma menor variância de resultados.

A aplicação do teste de Tukey permite afirmar que a utilização de uma diluição do IP melhora a sua eficiência uma vez que a percentagem de “lixo” analisado diminui. Contudo é visível uma diminuição do número de núcleos avaliado.

Para o estudo da variabilidade citogenómica da ‘Galega Vulgar’ foi escolhida a diluição de 0,25 (12 µg/ml) pois é a concentração que gera valores com melhor balanço entre eficiência e eficácia.

3.1.2. Avaliação de diversidade citogenómica de amostras de oliveira ‘Galega Vulgar’

Os dados resultantes da análise das 57 amostras de ‘Galega Vulgar’ provenientes do pólo de Elvas do INIAV são apresentados no anexo 6.

Os valores de fluorescência são o resultado da média dos picos delimitados manualmente com uma ferramenta do programa. Cada pico representa os núcleos de cada espécie sendo o pico RN1 correspondente à amostra do DNA padrão, o buxo, e o pico RN2 à amostra de ‘Galega Vulgar’ (figura 20).

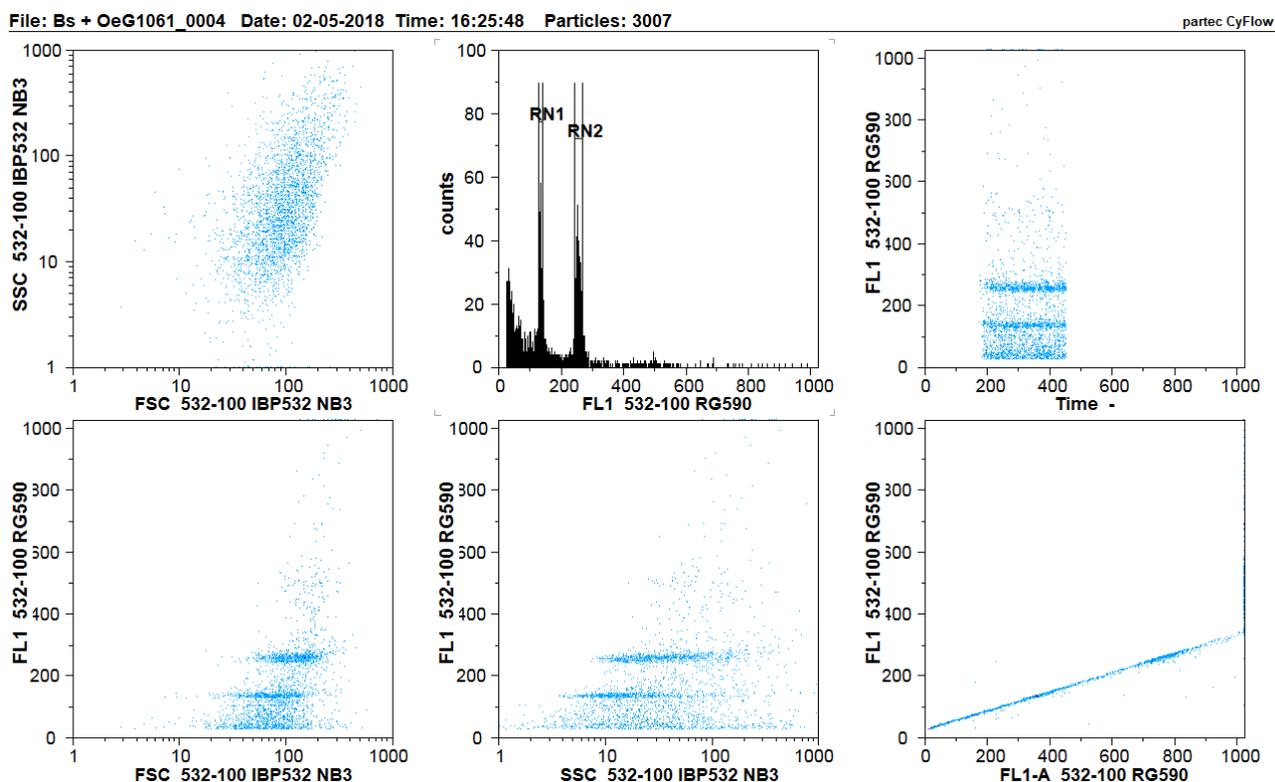


Figura 20 - Gráficos resultantes da análise da amostra 1061 de ‘Galega Vulgar’ e de buxo em citómetro. Nos eixos das coordenadas estão o SSC (side scatter), FSC (forward scatter) e o FL1 (fluorescência) resultante do laser de 532 nm assim como a contagem de partículas analisadas (counts) e do tempo decorrido (time).

No quadro 7 são apresentados os dados recolhidos da amostra 1061. O conteúdo nuclear da amostra é calculado com base na fluorescência do padrão (*Buxus sempervirens*) cujo valor de DNA nuclear é conhecido (1,63 pg/2C).

Quadro 7 – Resultados de citometria de fluxo referentes à amostra 1061.

Amostra	Repetição	Fluorescência padrão	Fluorescência amostra	Conteúdo nuclear amostra		Coeficiente de variação padrão (%)	Coeficiente de variação amostra (%)
				pg	Mbp		
1061	1	127,26	243,57	3,11975	3051,1	3,72	3,28
	2	131,55	249,63	3,09310	3025,0	2,35	2,87
	3	133,88	253,92	3,09150	3023,5	2,57	2,84
	4	134,01	253,67	3,08546	3017,6	3,11	2,77
	5	133,85	254,99	3,10522	3036,9	2,28	2,41
	6	134,59	255,26	3,09142	3023,4	2,74	1,98

Para a análise estatística dos resultados todas as repetições foram tidas em conta, não sendo utilizado nenhum valor médio. A variável resposta utilizada foi o conteúdo nuclear (nucleus) em picogramas, de cada amostra de oliveira ‘Galega Vulgar’ (figura 21).

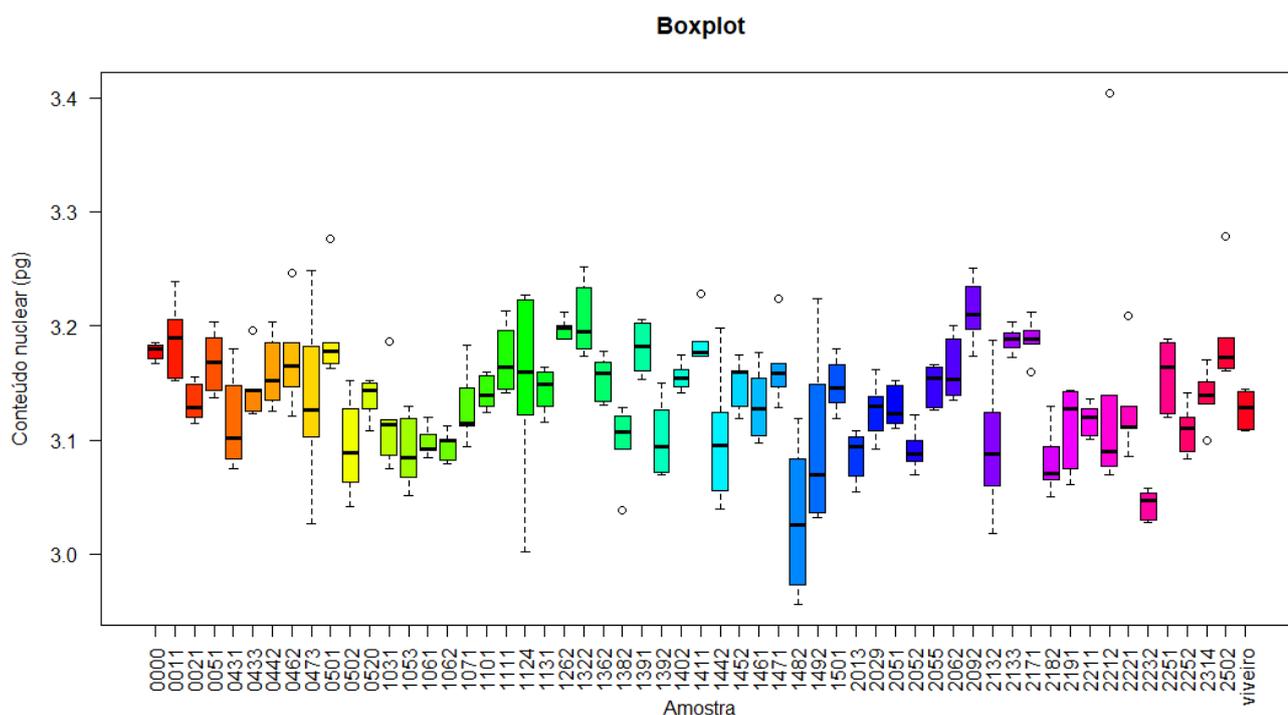


Figura 21 - Gráfico de quantis do conteúdo nuclear das 57 amostras de ‘Galega Vulgar’.

Podemos observar que a maioria dos valores de conteúdo nuclear se encontra entre 3 e 3,3 pg/2C, sendo o valor mínimo de 2,956 pg/2C e o valor máximo de 3,404 pg/2C (‘outlier’). A média de todas as amostras foi de aproximadamente 3,137 pg/2C e o desvio padrão médio foi de 0,052.

Foram calculados os valores médios do conteúdo nuclear de cada amostra e correspondente coeficiente de variação e desvio padrão (quadro 8).

Quadro 8 – Valores médios do conteúdo nuclear e do coeficiente de variação das amostras.

Amostra	Conteúdo nuclear médio por amostra		Desvio padrão	Coeficiente de variação médio por amostra (%)
	pg	Mbp		
0000	3,18	3107,89	0,007	3,41
0011	3,19	3118,49	0,034	3,37
0021	3,13	3063,58	0,016	1,53
0051	3,17	3098,60	0,026	4,15
0431	3,11	3046,30	0,041	3,56
0433	3,15	3076,80	0,026	3,79
0442	3,16	3088,98	0,030	3,11
0462	3,17	3101,68	0,043	3,61
0473	3,14	3066,30	0,074	2,93
0501	3,19	3120,73	0,042	4,65
0502	3,09	3025,60	0,040	4,45
0520	3,14	3068,01	0,017	3,73
1031	3,12	3046,76	0,038	2,35
1053	3,09	3021,02	0,032	2,73
1061	3,10	3029,59	0,013	2,69
1062	3,10	3027,66	0,013	3,76
1071	3,13	3058,57	0,032	2,59
1101	3,14	3072,65	0,015	2,04
1111	3,17	3100,50	0,030	3,89
1124	3,15	3079,54	0,085	3,31
1131	3,14	3075,28	0,019	4,52
1262	3,20	3127,26	0,009	3,24
1322	3,20	3133,85	0,032	2,87
1362	3,15	3085,01	0,019	3,68
1382	3,10	3030,77	0,032	3,50
1391	3,18	3111,29	0,022	3,59
1392	3,10	3033,00	0,033	3,07
1402	3,16	3086,03	0,012	3,76
1411	3,19	3115,46	0,021	3,41
1442	3,10	3033,10	0,056	2,91
1452	3,15	3080,91	0,021	4,12
1461	3,13	3061,99	0,034	3,65
1471	3,16	3094,25	0,033	3,01
1482	3,03	2963,46	0,068	3,35
1492	3,10	3028,65	0,076	3,32

1501	3,15	3079,08	0,022	2,49
2013	3,09	3018,95	0,021	2,49
2029	3,13	3057,78	0,024	2,98
2051	3,13	3059,30	0,017	3,33
2052	3,09	3023,14	0,018	3,69
2055	3,15	3079,51	0,018	4,03
2062	3,16	3092,19	0,027	2,70
2092	3,21	3141,95	0,028	3,65
2132	3,09	3026,09	0,057	3,64
2133	3,19	3117,97	0,011	3,10
2171	3,19	3118,18	0,017	3,43
2182	3,08	3012,19	0,028	2,57
2191	3,11	3044,25	0,035	3,48
2211	3,12	3049,39	0,014	2,71
2212	3,14	3075,41	0,129	2,70
2221	3,13	3057,34	0,043	3,08
2232	3,04	2977,06	0,012	3,36
2251	3,16	3087,81	0,031	3,84
2252	3,11	3040,78	0,021	2,28
2314	3,14	3069,48	0,023	4,07
2502	3,19	3119,07	0,045	3,66
viveiro	3,13	3057,95	0,016	2,86
Média	3,15	3068,15	0,032	3,29

O valor médio mais alto foi de 3,20 pg/2C e o valor mais baixo foi de 3,03 pg/2C. A variação entre valores médios extremos foi de 5,31%.

O valor mínimo de desvio padrão foi de 0,007 e valor máximo de 0,129. O valor médio do desvio padrão foi de 0,032. Este valor é baixo o suficiente para que possamos considerar que os resultados obtidos são imparciais e representam boas estimativas do conteúdo nuclear de cada amostra. O coeficiente de variação médio tomou um valor razoável, sendo que este deve ser mantido nos 3% para garantir resultados fidedignos (Suda, 2004).

A amostra 'viveiro' não demonstrou nenhuma diferença relevante em relação às restantes amostras. Alguma diferença poderia ser esperada uma vez que este genótipo é o resultado de várias seleções com fins comerciais.

Para o tratamento dos dados, em primeiro lugar foi avaliada a sua distribuição e aplicado o teste de Shapiro-Wilk. O resultado do teste rejeita a hipótese nula de que a distribuição dos dados é normal, uma vez que o "p-value" é muito inferior a 0,05.

Shapiro-wilk normality test

data: nucleus
w = 0.98183, p-value = 0.0002581

Contudo, pode verificar-se através do gráfico de quantis da normal (figura 22) e do gráfico densidade (figura 23) que os dados parecem seguir uma distribuição normal.

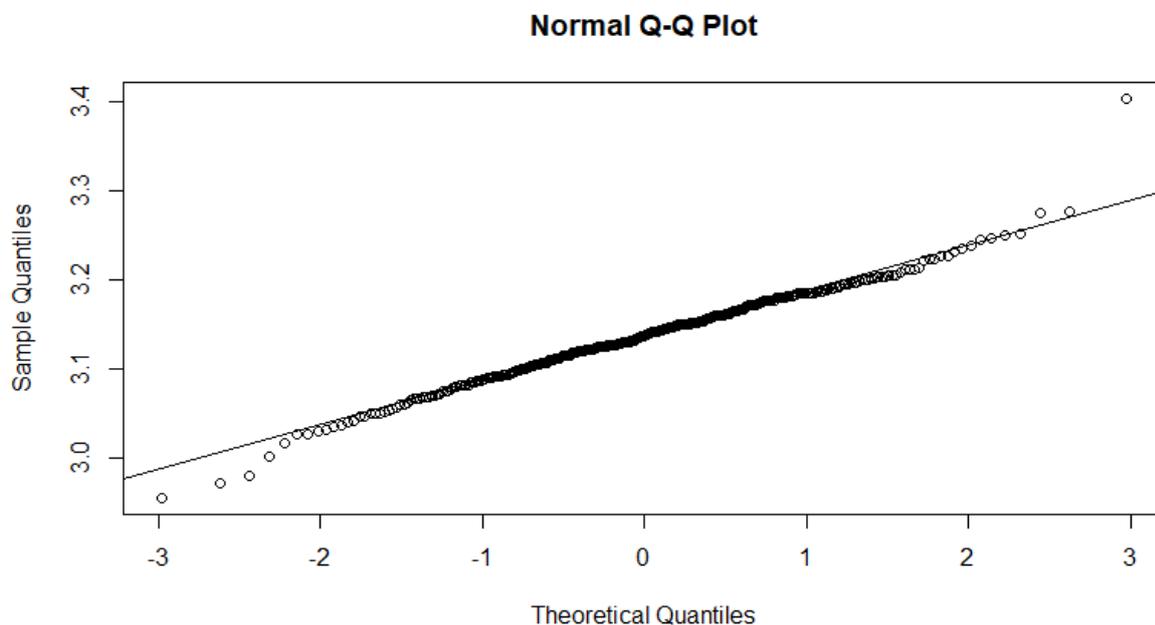


Figura 22 - Gráfico quantis da normal referente à variável conteúdo nuclear.

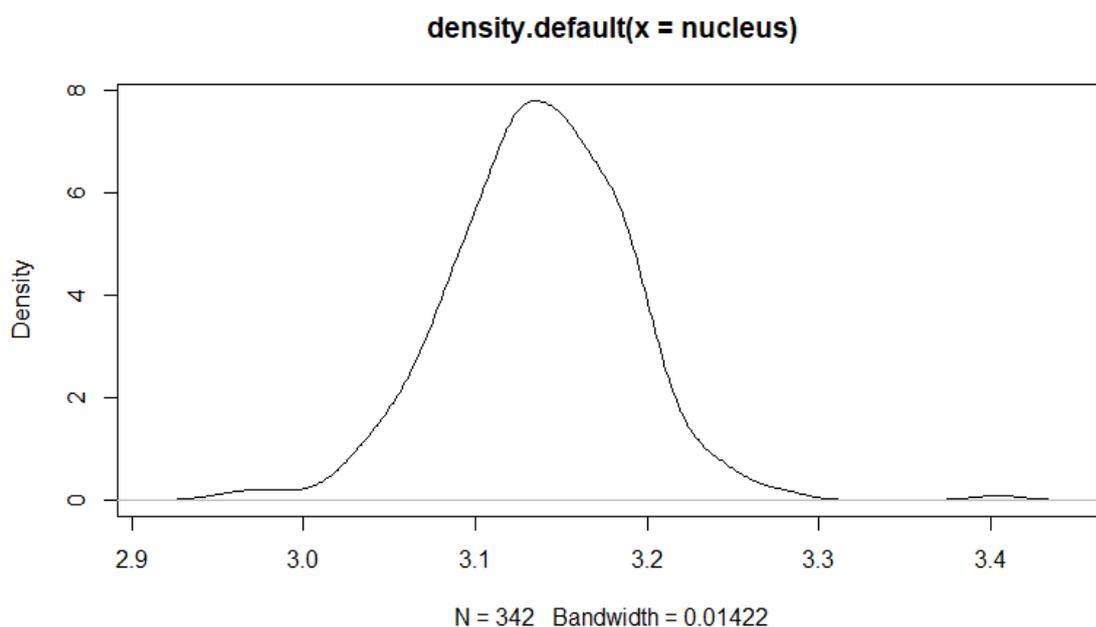


Figura 23 - Gráfico de densidade da variável de conteúdo nuclear.

Devido ao baixo número de repetições (6) a distribuição dos dados não foi considerada como normal no teste de Shapiro-Wilk, contudo pode observar-se que o delineamento é equilibrado e que os resultados se encontram todos no mesmo espectro, ou seja, num

intervalo específico. Com isto, a gravidade da violação da regra de normalidade, aquando da aplicação da ANOVA, é reduzida.

Para avaliar as relações entre as amostras com base no seu conteúdo nuclear foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, recorrendo ao programa RStudio, dando os seguintes resultados:

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Sample.ID    56 0.5190  0.009268   6.383 <2e-16 ***
Residuals   285 0.4138  0.001452
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Uma vez que o “p-value” é bastante inferior ao nível de significância de 0,05, a hipótese nula é rejeitada. Conclui-se assim que as médias das amostras são significativamente diferentes.

Em complemento com a análise de variância foi aplicado o teste hsd que realiza comparações múltiplas de Tukey, cujos resultados são apresentados no anexo 7 e na figura 24. Este teste agrupou as amostras em 22 grupos diferentes, contudo este agrupamento estatístico não se reflete num agrupamento biológico igualmente claro uma vez que a evolução da diferenciação das amostras ao longo da sua seriação é gradual.

É visível na figura 24 que há um grande número de amostras que foram avaliadas como pertencendo a um grupo apenas (abcdefghijkl). Possuindo letras iguais as amostras não são consideradas significativamente diferentes. São elas as 18 amostras: 0051, 1471, 2062, 0442, 2251, 1402, 1362, 1452, 1124, 2055, 1501, 0433, 2212, 1131, 1101, 2314, 0520 e 0473.

É também de referir um segundo grupo (abcdefghijkl) que se destaca devido à quantidade de amostras que alberga (7): 0021, 1461, 2051, 1071, 2029, ‘viveiro’ e 2221.

À exceção dos dois grupos referidos, o número máximo de amostras por grupo observado é de 3 e o mínimo de 1.

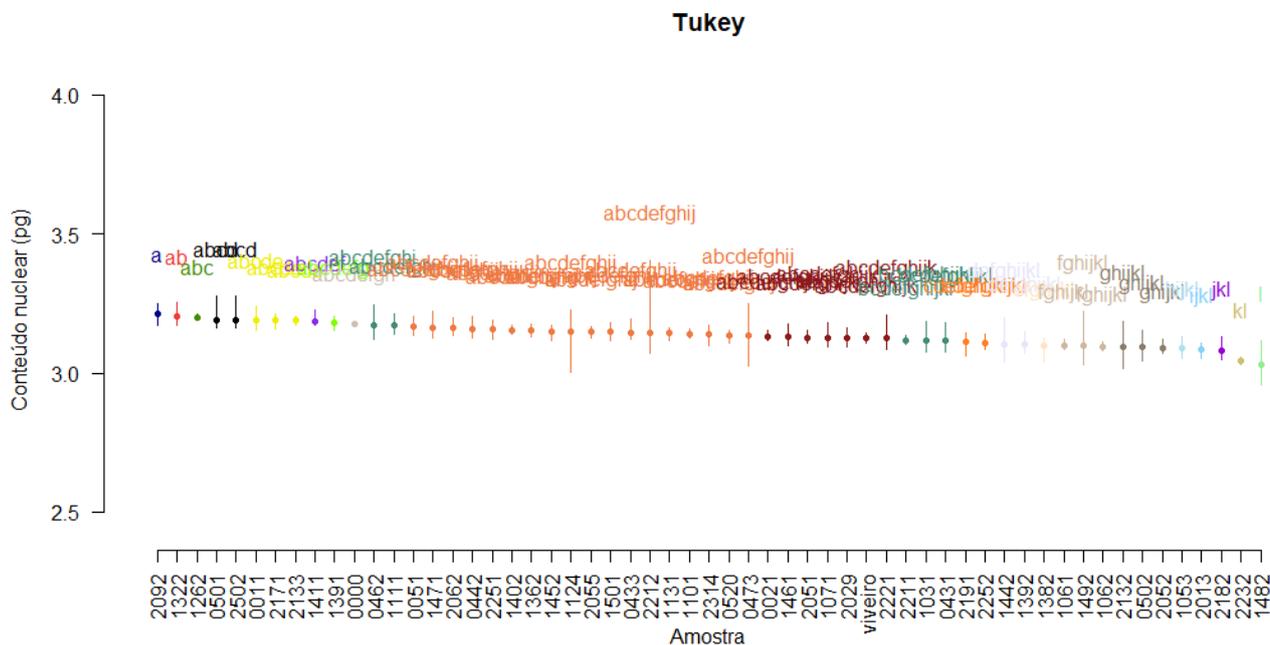


Figura 24 - Gráfico de resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Assim, a maior diferença de tamanho de genoma encontra-se entre os pólos. Para selecionar as amostras que possuem mais diferenças entre si, e tendo em conta que amostras com a mesma letra não são significativamente diferentes, foram escolhidas as primeiras e últimas 10 amostras dos resultados do teste de Tukey para analisar. Os resultados encontram-se no quadro 9.

Quadro 9 – Resultados do teste de Tukey ($\alpha = 0.05$, $n=6$).

Teste	Tukey (ANOVA)	
Posição		
1^a	2092	a
2^a	1322	ab
3^a	1262	abc
4^a	0501	abcd
5^a	2502	abcd
6^a	0011	abcde
7^a	2171	abcde
8^a	2133	abcde
9^a	1411	abcdef
10^a	1391	abcdefg
11^a	0000	abcdefgh
12^a	0462	abcdefghi

13 ^a	1111	abcdefghi
14 ^a	0051	abcdefghij
15 ^a	1471	abcdefghij
16 ^a	2062	abcdefghij
17 ^a	0442	abcdefghij
18 ^a	2251	abcdefghij
19 ^a	1402	abcdefghij
20 ^a	1362	abcdefghij
21 ^a	1452	abcdefghij
22 ^a	1124	abcdefghij
23 ^a	2055	abcdefghij
24 ^a	1501	abcdefghij
25 ^a	0433	abcdefghij
26 ^a	2212	abcdefghij
27 ^a	1131	abcdefghij
28 ^a	1101	abcdefghij
29 ^a	2314	abcdefghij
30 ^a	0520	abcdefghij
31 ^a	0473	abcdefghij
32 ^a	0021	abcdefghijk
33 ^a	1461	abcdefghijk
34 ^a	2051	abcdefghijk
35 ^a	1071	abcdefghijk
36 ^a	2029	abcdefghijk
37 ^a	viveiro	abcdefghijk
38 ^a	2221	abcdefghijk
39 ^a	2211	bcdefghijkl
40 ^a	1031	bcdefghijkl
41 ^a	0431	bcdefghijkl
42 ^a	2191	cdefghijkl
43 ^a	2252	cdefghijkl
44 ^a	1442	defghijkl
45 ^a	1392	defghijkl
46 ^a	1382	efghijkl
47 ^a	1061	fghijkl
48^a	1492	fghijkl
49^a	1062	fghijkl
50^a	2132	ghijkl
51^a	0502	ghijkl
52^a	2052	ghijkl
53^a	1053	hijkl
54^a	2013	ijkl
55^a	2182	jkl
56^a	2232	kl
57^a	1482	l

As amostras mais diferentes (primeira e última posição) foram a amostra 2092 a amostra 1482. As primeiras quatro amostras, 2092, 1322, 1262 e 0501 foram colocadas em grupos diferentes e a 5ª amostra, 2502, foi colocada no mesmo grupo que a 4ª, pertencendo assim ao grupo abcd. As amostras da 6ª, 7ª e 8ª posição ficaram todas no mesmo grupo abcde. Por outro lado, a 9ª e 10ª amostra foram separadas em grupos diferentes.

As últimas seis amostras foram todas separadas em grupos diferentes, sendo que a 51ª e a 50ª (7ª e 8ª a contar do fim) foram colocadas no mesmo grupo que a 51ª (6ª a contar do fim). As amostras em 48º e 49º lugar foram agrupadas no grupo fghijkl.

Quando existem muitas amostras, e neste caso sendo todas da mesma variedade, a variabilidade existente tende a ser contínua. A 2ª amostra tem algo em comum com a 1ª, e a 3ª com a 2ª e assim sucessivamente, de maneira que as amostras estão todas interligadas. Apesar de parecer que não existe variabilidade porque todas as amostras têm uma relação de similaridade entre si, esta existe e toma o seu valor máximo entre a 1ª e a última amostra.

Concluindo, consoante os resultados do teste aplicado pode afirmar-se que há variabilidade genética na população analisada e que o pico dessa variabilidade está entre a amostra 2092 e a 1482, sendo a 2092 significativamente diferente de todas as que aparecem elencadas a partir da posição 39ª, inclusive.

Numa maior abrangência, podemos dividir as amostras em dois grupos diferentes. Como a maior variabilidade se encontra entre as amostras dos polos, podem ser selecionadas as cinco primeiras e as cinco últimas amostras do resultado do teste de Tukey.

Assim, um primeiro grupo seria constituído pelas amostras 2092, 1322, 1262, 0501 e 2502 e um segundo grupo pelas amostras 1482, 2232, 2182, 2013 e 1053.

Contudo, diferenças entre o conteúdo nuclear das células não é uma condição obrigatória de variabilidade genética e vice-versa, ou até de variabilidade fenotípica. Apesar de menos provável, também é possível encontrar diferenças genéticas relevantes entre amostras cujos valores de conteúdo nuclear sejam similares.

As diferenças entre amostras identificadas por avaliação dos conteúdos nucleares não significam obrigatoriedade de variabilidade genética e a relação entre estas não corresponde necessariamente a uma filogenia exata. Por estes motivos, os dois grupos de amostras mais distintas foram analisados recorrendo a marcadores moleculares.

3.1.2.1. Relação com outros resultados já obtidos em oliveira

Os valores obtidos por Loureiro (2007) em relação a diferentes cultivares de oliveira ('Redondal', 'Santulhana', 'Negrinha', 'Madural', 'Verdeal' e 'Cobrançosa') variaram entre 2.90 ± 0.020 pg/2C e 3.07 ± 0.018 pg/2C. A variação máxima entre as médias de cada cultivar foi

de 3,3%. O desvio padrão de 0,023 e a variação máxima entre amostras, ambos inferiores aos valores obtidos no presente trabalho, demonstram bem a diferença de amplitudes de resultados entre os estudos.

Os dados de Loureiro (2007), apesar de serem baseados em mais cultivares, em comparação com o presente estudo, possuem valores menos variáveis, indicando menor variabilidade citogenómica e, possivelmente, genética. Contudo é de notar a diferença do número de genótipos analisado, sendo que Loureiro utilizou apenas três genótipos por cultivar e realizou apenas duas repetições por amostra.

Esta discrepância entre o número de amostras utilizadas pode explicar a grande diferença entre o desvio padrão e uma possível diferença de variabilidade genética.

Besnard *et al.* (2008) calcularam o tamanho do conteúdo nuclear de dois indivíduos de duas variedades espanholas diferentes: 'Arbequina' e 'Maçanilha'. O valor médio obtido foi de 3,25 pg/2C. Brito *et al.* (2008) mediram o tamanho do genoma de duas cultivares desconhecidas provenientes de Aveiro, resultando num valor médio de 3.10 ± 0.028 pg/2C.

Assim podemos concluir que os valores obtidos foram semelhantes aos de Loureiro (2007), Besnard *et al.* (2008) e Brito *et al.* (2008) não havendo grandes disparidades.

A intravariabilidade da cultivar 'Galega Vulgar' nunca foi estudada por meio de citometria de fluxo, não havendo dados comparativos.

Contudo, intravariabilidade já foi descrita através da citometria de fluxo em várias espécies de *Lathyrus*, apresentando uma intra-variância de 10,1% a 28%, dependendo da espécie (Nandini *et al.*, 1997). A intravariabilidade do milho (*Zea mays*) também já foi provada através da citometria de fluxo (Rayburn *et al.*, 1989 *cit in* Doležel and Bartoš, 2005).

Esta variabilidade, apesar de ser a um nível menos específico, pois dá-se dentro de espécies e não de cultivares, pode ser considerada como um ponto de partida para quantificar a intravariabilidade em plantas. O facto de uma variância de 10,1% poder representar variabilidade ao nível da espécie, o valor de 5,31% obtido para a cultivar 'Galega Vulgar' pode igualmente representar o mesmo nível de intravariabilidade.

3.2. Marcadores Moleculares

3.2.1. Problemas de amplificação preliminares

De modo a quantificar a viabilidade de amplificação do DNA, cada amostra foi testada com o “primer” 18S. Aquando da aplicação dos “primers” RAPD e ISSR, as quantidades acertadas não geravam produtos de PCR, não havendo bandas. Ao longo do teste, soluções cujo “primer” 18S funcionara eram utilizadas como controlo em testes seguintes, mas não voltavam a gerar bandas. O facto deste “primer” gerar resultados inconsistentes levou ao abandono da sua utilização no presente trabalho.

A instabilidade e impureza do DNA resultou em constantes incongruências nos produtos de PCR. Isto levou obrigatoriamente à realização de uma segunda purificação, havendo essencialmente necessidade de nova degradação de RNA que foi visível em muitas das amostras em géis de quantificação (figura 25).

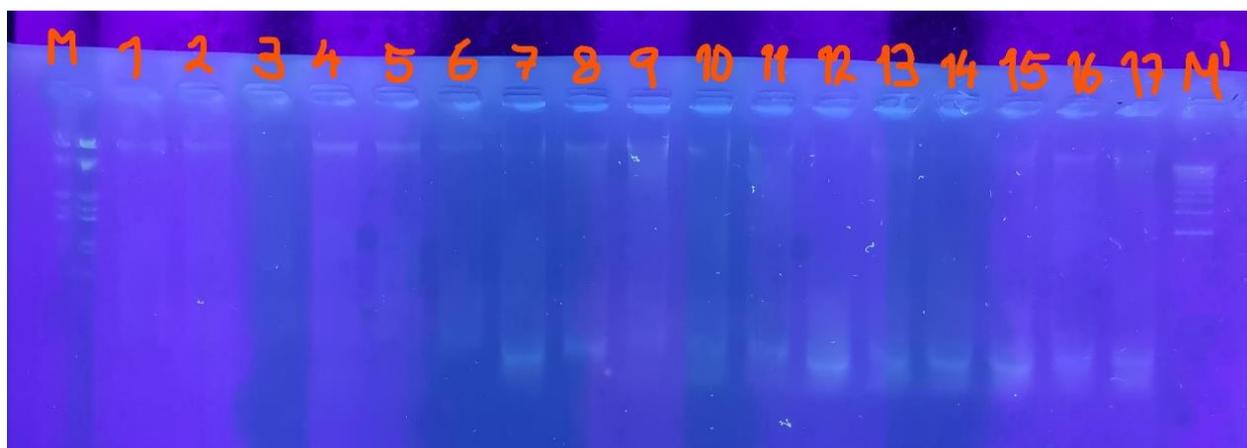


Figura 25 – Observação de gel de agarose em transiluminador de luz ultravioleta de quantificação do DNA genómico relativo às amostras 1 a 17 (correspondências com o número de amostra no anexo 2) recorrendo a dois marcadores (M= Lambda DNA/EcoRI+HindIII; M'= Ladder II).

3.2.2. Aplicação “primers” RAPD/ISSR

Devido a problemas logísticos, não foi possível aplicar os “primers” escolhidos aos 55 genótipos existentes. Deste modo foram seleccionadas as amostras mais diferentes segundo os resultados de citometria de fluxo: as primeiras e últimas cinco do teste de Tukey.

Uma vez que a amostra 2502 não foi colhida, esta foi substituída pela amostra na posição seguinte (6ª) na lista de resultados (0011). Assim as amostras a que foram aplicados os “primers” foram 2092, 1322, 1262, 0501, 0011, 1053, 2013, 2182, 2232 e 1482.

A cada uma das 10 amostras selecionadas foram aplicados cinco “primers” ISSR e cinco “primers” RAPD. Os “primers” RAPD utilizados foram OPC-04, OPC-07, OPC-08, OPC-10 e OPC-13 e os ISSR foram 9MS, (GAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₄ e (GTGC)₄.

Dos “primers” aplicados foram o 9MS e o (GTG)₅ que apresentaram bandas menos nítidas havendo claramente um arrastamento. O 9MS é um “primer” pouco específico uma vez que tem nucleótidos degenerados em várias posições, esta poderá ser a razão pela qual a sua aplicação não gera resultados definidos (figura 26).

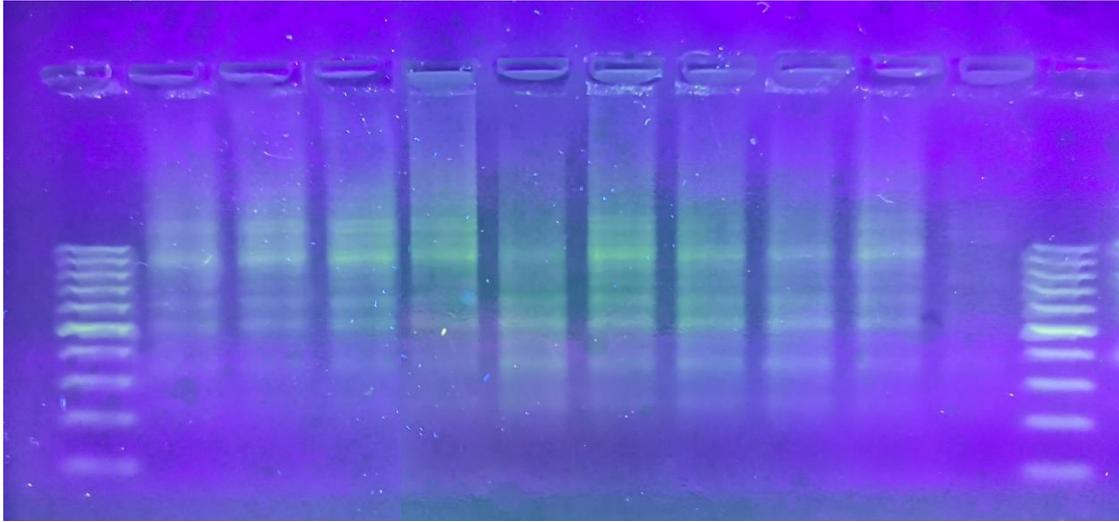


Figura 26 - Observação de gel de agarose sobre transiluminador de luz ultravioleta de resultados da aplicação do “primer” 9MS nas amostras 2092, 1322, 1262, 0501, 0011, 1053, 2013, 2182, 2232 e 1482.

Por outro lado, quanto ao (GTG)₅, a temperatura de “annealing” (emparelhamento) utilizada (50°C) difere da calculada (63°C) o que pode piorar os resultados. Todos os restantes “primers” geraram bandas nítidas sem arrastamento (Figura 27).

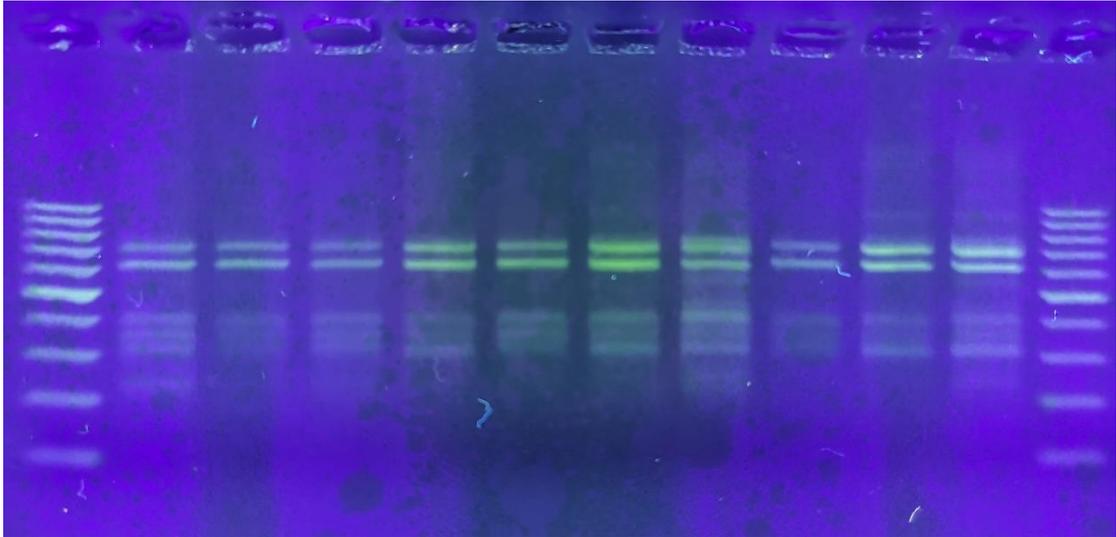


Figura 27 - Observação de gel de agarose sobre transiluminador de luz ultravioleta de resultados da aplicação do “primer” OPC-08 nas amostras 2092, 1322, 1262, 0501, 0011, 1053, 2013, 2182, 2232 e 1482.

3.2.2.1. Poder discriminativo RAPD/ISSR

Para determinar qual o tipo de “primers” com maior poder discriminativo foi realizado um quadro onde são apresentadas as bandas totais, a monomórficas (que estão presentes em todas as amostras), as polimórficas (presentes em algumas amostras e ausentes noutras) e as únicas que aparecem exclusivamente numa amostra. Foi também calculada a percentagem de polimorfismo, ou seja, a percentagem de bandas polimórficas em relação ao número total de bandas (quadro 10).

Quadro 10 – Bandas resultantes da aplicação de “primers” RAPD e ISSR nas 10 amostras selecionadas.

Primers	Bandas			Total	% Polimorfismo	
	Monomórficas	Polimórficas	Únicas			
RAPD	OPC-04	13	1	1	15	13,33
	OPC-07	6	9	2	17	64,70
	OPC-08	5	7	0	12	58,33
	OPC-10	3	11	6	20	85
	OPC-13	3	11	1	15	80
Total	30	39	10	79	62,03	
ISSR	9MS	4	6	2	12	66,67
	(GAC) ₅	4	10	0	14	71,43
	(GTG) ₅	5	7	0	12	58,33
	(GACA) ₄	3	9	2	14	78,57
	(GTGC) ₄	11	0	0	11	-
Total	27	32	4	63	57,14	

Dentro dos RAPD foi o “primer” OPC-10 que gerou mais bandas únicas sendo o que permite discriminar mais amostras. Contrariamente discriminante foi o “primer” OPC-08 que não gerou bandas únicas. O OPC-04 e o OPC-13 geraram ambos apenas uma banda única, e o OPC-07 gerou duas bandas únicas.

Em relação às bandas monomórficas foi o OPC-04 que gerou um maior número destas bandas (13) e os “primers” OPC-10 e OPC-13 resultaram em apenas 3 bandas cada um. O OPC-07 gerou 6 bandas e o OPC-08, 5 bandas monomórficas.

As bandas polimórficas foram altamente produzidas especialmente pelos “primers” OPC-10, OPC-13 e OPC-07, à exceção do caso do OPC-04 que gerou apenas uma banda. O OPC-8 gerou um valor intermédio de 7 bandas polimórficas.

Quanto ao número total de bandas por “primer” o OPC-10 foi o que gerou mais bandas no total (20) e o OPC-08 foi o que gerou o menor número de bandas (12).

A percentagem de polimorfismo foi mais alta em OPC-10 (85%) e mais baixa em OPC-04 (13,33%).

Nos ISSR apenas dois “primers” geraram bandas únicas, o 9MS e o (GACA)₄, sendo que de cada um resultaram duas bandas.

Nas bandas monomórficas o “primer” (GTGC)₄ gerou um total de 11 bandas monomórficas que perfazem o total de bandas produzidas por este “primer” levando-o a ser considerado como o “primer” menos discriminativo de todos os que foram utilizados. Dos “primers” (GACA)₄, (GAC)₅ e (GTG)₅ resultaram 3, 4 e 5 bandas respectivamente. O 9MS gerou também 4 bandas monomórficas.

As bandas polimórficas atingiram o seu valor máximo no “primer” (GAC)₅ que produziu 10 bandas. O 9MS, o (GTG)₅ e o (GACA)₄ geraram, respectivamente, 6, 7 e 9 bandas polimórficas. Como foi referido anteriormente a amostra (GTGC)₄ não gerou nenhuma banda polimórfica, apenas bandas monomórficas.

Em relação ao número total de bandas produzidas pelos ISSR os “primers” que mais bandas geraram foram o (GAC)₅ e o (GACA)₄ com 14 bandas, e o (GTGC)₄ foi o que gerou menos bandas com um total de 11 bandas.

O nível de polimorfismo tomou o seu valor máximo no “primer” (GAC)₅ e foi nulo no caso do (GTGC)₄.

Os RAPD geraram 79 bandas no total sendo que ultrapassam o número de 63 bandas produzidas pelos ISSR. O nível de polimorfismo foi de 62,03% para os RAPD e 57,14% para os ISSR. Apesar da percentagem de polimorfismo ser semelhante para ambos os tipos de “primers”, foram os RAPD que geraram mais bandas únicas (10), mostrando um maior poder discriminativo em relação aos ISSR.

Graças à presença de bandas únicas é possível discriminar amostras recorrendo a apenas um “primer”. O “primer” OPC-10 permitiu discriminar as amostras 1053, 2013 e 2232. A amostra 2013 foi também discriminada pelo “primer” OPC-04, e a amostra 1262 pelos primers OPC-07 e OPC-13. O OPC-07 permitiu também distinguir a amostra 1322 das restantes. Os “primers” 9MS e (GACA)₄ diferenciam a amostra 1482 das outras.

A ausência exclusiva de certas bandas numa amostra permite também a sua distinção.

Esta situação acontece com o OPC-13 que permite identificar a amostra 1322 através de ausência exclusiva de duas bandas (800 e 700 bp) e com o 9MS onde apenas a amostra 1482 não possui três bandas (500, 800 e 900 bp). A amostra 2232 é identificada também pela falta das bandas de 650 e 750bp com o “primer” (GAC)₅. O “primer” (GACA)₄ não gera também 3 bandas exclusivamente na amostra 1482 (720, 820 e 880 bp).

Concluindo, as amostras discriminadas pela ausência ou presença exclusiva de bandas são 1053, 2013, 2232, 1262, 1322 e 1482.

3.2.2.2. Avaliação de diversidade genética de amostras de oliveira ‘Galega Vulgar’

Após realizada a eletroforese de todos os produtos de PCR, as bandas resultantes foram registadas em sistema de matriz binária e transformadas num dendrograma (figura 28). Foi também extraída a matriz de similaridade (quadro 11). A matriz de que resulta o dendrograma está no anexo 8.

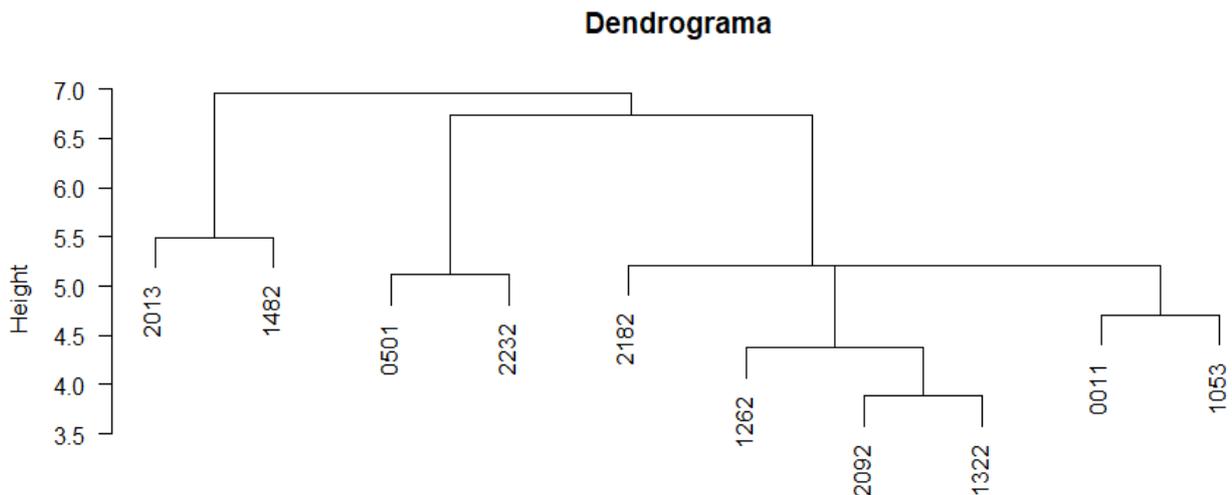


Figura 28 - Dendrograma resultante da análise das amostras por aplicação de “primers” ISSR e RAPD.

O dendrograma agrupou as amostras 0011 e 1053 que demonstraram diferenças significativas no teste de Tukey (capítulo 3.1.2). O mesmo aconteceu para as amostras 0501 e 2232 que mantinham uma distância de 52 posições na lista. Por outro lado, o agrupamento das amostras 1262, 2092 e 1322 corresponde às suas relações resultantes da análise citogenómica assim como as amostras 2013 e 1482 que apesar de terem duas posições de diferença na lista pertencem ao mesmo lado do espectro da diversidade. A amostra 2182 não demonstra ter nenhuma relação filogenética mais próximas, mas também está associada a amostras de um agrupamento diferente (1262, 2092 e 1322).

Quadro 11 – Matriz de similaridade resultante da aplicação de “primers” ISSR e RAPD.

Amostra	2092	1322	1262	0501	0011	1053	2013	2182	2232
1322	0.8920863								
1262	0.8848921	0.8633094							
0501	0.7697842	0.7194245	0.7985612						
0011	0.8633094	0.8848921	0.8201439	0.7625899					
1053	0.8057554	0.8129496	0.8201439	0.8345324	0.8417266				
2013	0.7913669	0.6978417	0.7482014	0.7769784	0.7697842	0.7841727			
2182	0.8848921	0.8057554	0.8273381	0.7697842	0.8201439	0.8057554	0.7913669		
2232	0.7266187	0.6762590	0.7122302	0.8129496	0.7050360	0.7482014	0.7482014	0.7122302	
1482	0.7338129	0.6690647	0.6762590	0.6762590	0.6978417	0.6546763	0.7841727	0.7194245	0.7050360

No dendrograma as amostras mais filogeneticamente afastadas são a 1482 e a 1053, possuindo o valor mais baixo na matriz de similaridade ($\approx 0,654$). Estas duas amostras pertenciam ao mesmo grupo do teste de Tukey (57^a e 53^a respetivamente), o que significa que as amostras foram consideradas como semelhantes com base em resultados citogenómicos. Essa constatação foi contraposta com dados genéticos e demonstrou que falta de variabilidade citogenómica não implica ausência de variabilidade genética.

Das amostras menos semelhantes destaca-se ainda as amostras 1482 e 1322 (57^o e 2^o lugar) com um índice de similaridade de aproximadamente 0,669 e as amostras 1482 (57^o lugar) e 1262/0501 (3^o/4^o lugar) e 1322 (2^a posição) e 2232 (9^a posição) ($\approx 0,676$). Todas estas amostras por outro lado pertenciam a grupos distintos, sendo a variabilidade citogenómica traduzida em variabilidade genética.

As amostras que demonstram ter o maior nível de similaridade são a 2092 e a 1322 que estão em posições seguidas no teste de Tukey (1^a e 2^a lugar respetivamente). Ligeiramente menos similares são as amostras 2092 e 1262/2182 e 0011 e 1322, com índice de similaridade de aproximadamente 0,884.

Com isto conclui-se que algumas relações filogenéticas foram confirmadas pelos resultados citogenómicos, nomeadamente a proximidade das amostras 1262, 2092 e 1322 e a diferença entre as amostras 1482 e 1322. Contudo as amostras que demonstraram ser mais filogeneticamente distantes não possuíam diferenças significativas a nível citogenómicos.

Pode afirmar-se que a variabilidade genética toma o seu auge entre as amostras 1482 e 1053.

3.2.2.3. Reprodutibilidade dos resultados

Para confirmar a reprodutibilidade das bandas, e resultados obtidos, a aplicação dos “primers” deve ser repetida pelo menos três vezes. Devido a problemas logísticos tal não foi possível, recorrendo-se apenas a uma repetição.

Contudo, devido à instabilidade do DNA extraído os resultados nesta repetição foram mais fracos, havendo uma diminuição da intensidade geral das bandas. Tal facto levou a uma incorreta, mas inevitável, depreciação de bandas que eram visíveis na 1ª repetição, gerando uma diminuição de informação recolhida. Com isto o poder discriminante dos “primers” foi também altamente reduzido. Contudo, a ausência de bandas pode significar que estas não são simplesmente reprodutíveis.

Para determinar se as diferenças mais fortes foram conservadas entre repetições foi feita uma nova análise de resultados onde foram consideradas apenas as bandas de maior intensidade em ambos os géis. Dessa avaliação surge o segundo dendrograma (figura 29) cuja matriz está no anexo 9.

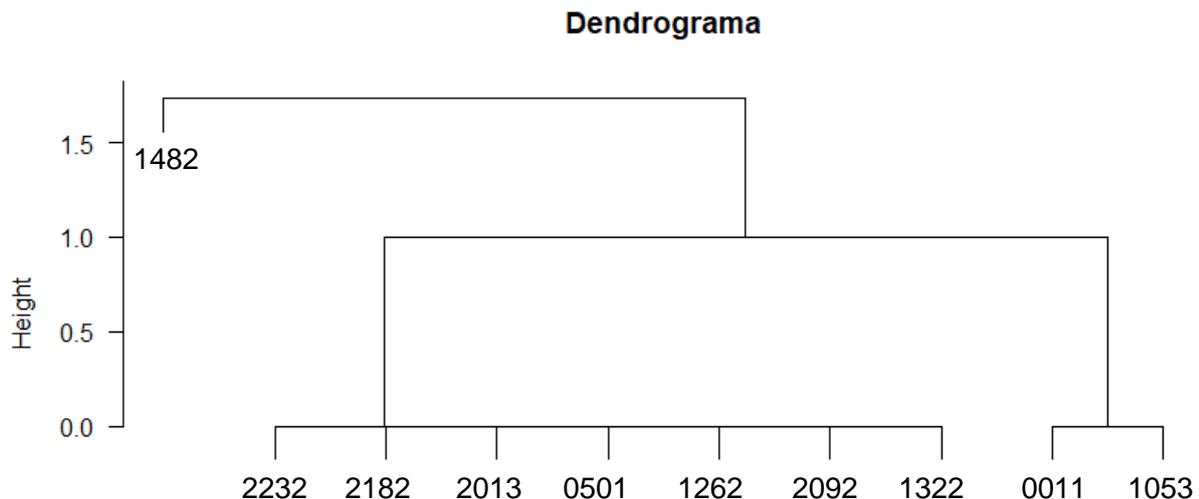


Figura 29 - Dendrograma resultante do cruzamento das matrizes das duas repetições de aplicação de “primers” ISSR e RAPD.

Em comparação com o dendrograma feito com base na 1ª amplificação, pode observar-se que houve alguma alteração nas relações filogenéticas entre amostras. Estas são agora divididas em três grupos sendo que a amostra 1482 se encontra isolada das restantes. No 1º dendrograma a amostra 1482 encontrava-se agrupada com a 2013, sendo que na repetição foi transferida para o grupo mais abrangente, cujas relações se mantêm próximas como na análise anterior.

As amostras 2232, 2182, 2013, 0501, 1262, 2092 e 1322 não demonstram ter diferenças entre si, mas diferenciam-se das amostras 0011 e 1053 que foram agrupadas à parte. Em ambas as análises verificou-se a junção das amostras 0011 e 1053 num só ramo, e as amostras mais distantes mantiveram-se, sendo a 1482 e a 1053.

O grupo com mais amostras é composto maioritariamente por amostras que se encontravam em posições adjacentes no teste de Tukey, nomeadamente em 1º (2092), 2º (1322), 3º (1262) e 4º lugar (0501). As restantes amostras pertencem às últimas posições do teste 56ª (2232), 55ª (2182) e 54ª (2013).

Ao juntar amostras supostamente “diferentes” à luz da citometria de fluxo, mais uma vez é demonstrado que as diferenças entre tamanhos do genoma não se traduzem, obrigatoriamente, em diferenças genéticas. O mesmo se aplica às duas amostras classificadas como filogeneticamente mais distantes que são separadas apenas por quatro posições na análise de Tukey.

3.2.2.4. Relação com outros resultados já obtidos em oliveira

Gemas *et al.* (2004) avaliaram a intravariabilidade da 'Galega Vulgar' com os RAPD OPC-07, OPC-10 e OPC-13 e com os mesmos ISSR aplicados neste trabalho, onde foi possível a total discriminação das 77 amostras recolhidas de diferentes regiões agro-ecológicas. A aplicação dos "primers" gerou 93 bandas polimórficas. Gemas *et al.* (2004) determinaram ainda que todas as amostras de 'Galega Vulgar' representavam genótipos diferentes.

Apesar das amostras do presente trabalho não terem sido analisadas na totalidade através de marcadores moleculares, pode dizer-se que as 10 amostras analisadas demonstraram também diferenças a nível de genótipo, e que não são iguais. A percentagem de polimorfismo foi de 62,03% para os RAPD e de 57,14% para os ISSR, gerando 71 bandas polimórficas, contudo a seleção destas não foi tão rigorosa como no trabalho de Gemas *et al.* (2004). Para determinar se esta diversidade se manterá ao longo do banco de germoplasma, é preciso dar continuidade à aplicação de 'primers' e realizar mais repetições para confirmar os dados recolhidos.

Gemas *et al.* (2000) analisaram 27 amostras de 'Galega Vulgar' com os RAPD OPC-04, OPC-07, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-13, OPC-15 e OPC-16 que gerou um nível de polimorfismo de 32%. Todas as amostras foram agrupadas com um índice de similaridade de $81,1 \pm 2,9\%$, contudo o método de agrupamento (UPGMA) foi diferente do utilizado neste trabalho. No entanto pode afirmar-se que os resultados obtidos no presente trabalho indicam uma maior diversidade no grupo de amostras analisadas pois o índice de similaridade mais baixo foi de $\approx 0,65$.

Figueiredo *et al.* (2013) aplicaram 20 "primers" RAPD, do OPC-01 ao OPC-20 a 75 amostras de 'Galega Vulgar' representantes de diversas zonas do país, gerando 48 bandas polimórficas (32% polimorfismo). Mais uma vez o nível de polimorfismo é inferior ao obtido neste trabalho, sendo de 57,14% apenas para os ISSR. Figueiredo *et al.* (2013) realizaram o agrupamento das amostras recorrendo ao UPGMA e ao coeficiente de DICE, contudo o índice de similaridade mais baixo foi de 0,9. Em contraste com o índice mais baixo obtido (0,669) neste trabalho, pode afirmar-se que os resultados demonstraram uma maior diversidade genética do que a que Figueiredo *et al.* (2013) obtiveram.

4. Conclusões

Os resultados obtidos através da citometria de fluxo das 56 amostras de 'Galega Vulgar' analisados encontram-se dentro da gama dos valores alcançados por outros autores. O conteúdo nuclear médio por amostra tomou valores entre 3,03 pg/2C e 3,20 pg/2C.

Segundo os resultados da citometria de fluxo pode afirmar-se que há variabilidade intra-varietal, sendo as amostras divididas em 22 grupos distintos. No entanto, a variabilidade resultante da análise de todos os indivíduos demonstrou ter um carácter contínuo, resultando num nível de semelhança gradual entre as amostras. Deste modo, a variabilidade toma o seu valor máximo entre os indivíduos dos extremos da lista de amostras do teste de Tukey. Pode concluir-se que as amostras mais diferentes, de um ponto de vista citogenómico, são a 1482 e 2092.

Avaliando os "primers" utilizados para a obtenção de marcadores moleculares em 10 génotipos de 'Galega Vulgar', tanto os ISSR como os RAPD tiveram uma percentagem de polimorfismo semelhante, de 57,14% e 62,03% respetivamente. Contudo os "primers" RAPD geraram um máximo de seis bandas únicas por "primer", enquanto que os ISSR geraram apenas duas. Em comparação com outros trabalhos de avaliação intra-varietal da 'Galega Vulgar' verificou-se uma maior percentagem de polimorfismo. Contudo este facto pode dever-se aos diferentes critérios utilizados na contagem de bandas e na falta de repetições.

Das 10 amostras avaliadas na análise de marcadores moleculares, seis foram distinguidas, através da ausência ou presença exclusiva de bandas, sendo que foram os RAPD que permitiram distinguir mais amostras. O "primer" OPC-10 permitiu diferenciar as amostras 1053, 2013 e 2232 das restantes, sendo o "primer" mais discriminante. Também o OPC-04, o OPC-07, OPC-13, o 9MS, o (GAC)₅ e o (GACA)₄ contribuíram para a distinção de amostras. As amostras discriminadas pela ausência ou presença exclusiva de bandas foram a 1053, 2013, 2232, 1262, 1322 e 1482.

Da avaliação por marcadores moleculares conclui-se que as amostras mais filogeneticamente distantes são a 1482 e a 1053, correspondendo ao índice de similaridade mais baixo de $\approx 0,65$. Igualmente filogeneticamente distantes da amostra 1482 estão as amostras 1322, 1262 e 0501. Quando comparado com outros trabalhos, o dendrograma criado, apesar de utilizar um método de agrupamento diferente, demonstrou relações filogenéticas mais afastadas entre as amostras, indicando uma maior diversidade genética.

O dendrograma gerou o agrupamento de amostras consideradas diferentes pela citometria de fluxo e separou também filogeneticamente amostras consideradas semelhantes. Isto aconteceu nas amostras mais diferentes segundo o diagrama, que se encontravam no mesmo extremo do teste de Tukey. Tal facto demonstra que as diferenças em tamanho do conteúdo nuclear não são imperiosamente traduzidas em diferenças genéticas e vice-versa.

Devido a este fator trabalhos futuros deverão continuar a avaliação por marcadores moleculares dos restantes 46 genótipos, no âmbito da descoberta de novas amplitudes da variabilidade genética deste banco de germoplasma e garantir a avaliação completa da diversidade de todos os indivíduos.

Tendo em conta que o presente trabalho é de carácter preliminar e que visa suportar a escolha de genótipos de 'Galega' para futuros programas de melhoramento, os dados obtidos sugerem que os genótipos 1482, 1053, 1322 e 0501 são bons candidatos para espelhar a diversidade citogenómica e genética do lote analisado. Desta forma pode considerar-se que cada par destas amostras representa variabilidade genética (1482 e 1053; 1322 e 0501), por apresentar relações filogenéticas mais afastadas no dendrograma, ou citogenómica (1482 e 1322; 1053 e 0501) por se apresentarem em polos opostos do teste de Tukey.

Referências Bibliográficas

- Anónimo. (2002). Cytomics FC500 Documentation - Reference. 3.1 - 3.18 pp.
- Bartolini G. and Petruccelli R. (2002). *Classification, origin, diffusion and history of the olive*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome: 79 pp.
- Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I. (2004). Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *HortScience*, 39: 1557-1561.
- Belaj A., del Carmen Dominguez-García M., Atienza S.G., Urdíroz N. M., De la Rosa R., Satovic Z., Martín A., Kilian A., Trujillo I., Valpuesta V. and Del Río, C. (2012). Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 365-378.
- Belaj A., Trujillo I., De la Rosa R., Rallo L. and Gimenez M. J. (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 64-71.
- Besnard G., Breton C., Baradat P., Khadari B., and Bervillé A. (2001). Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 668-675.
- Besnard G., Garcia-Verdugo C., Rubio de Casas R., Treier U. A., Galland N., and Vargas P. (2008). Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany*, 101: 25-30.
- Besnard, G., Baradat, P. and Bervillé, A. (2001). Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 251-258.
- Bitonti M., Cozza R., Chiappetta A., Contento A., Minelli S., Ceccarelli M., Gelati M., Maggini F., Baldoni L. and Cionini P. (1999). Amount and organization of the heterochromatin in *Olea europaea* and related species. *Heredity* 83:188-195.
- Böhm J. (2013). *O Grande Livro da Oliveira e do Azeite. Portugal Oleícola*. Dinalivro, Lisboa: 288 pp.
- Bourne E.C., Mina D., Gonçalves S.C., Loureiro J., Freitas H. and Muller L.A.H. (2014). Large and variable genome size unrelated to serpentine adaptation but supportive of cryptic sexuality in *Cenococcum geophilum*. *Mycorrhiza*, 24: 13–20.
- Brito G., Loureiro J., Lopes T., Rodriguez E., and Santos C. (2008). Genetic characterisation of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 657-664.
- Carter N.P. and Ormerod M.G. (2000). Introduction to the principles of flow cytometry. Em: *Flow cytometry: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.

Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A., and Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228.

Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C. and Gomez-Jimenez M.C. (2008). Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52: 642-647.

Cordeiro A.M., Calado M.L., Morais N., Miranda A. and Carvalho M.T. (2010). 'Galega Vulgar' – variedades de oliveira. INRB/ L-INIA/URGEMP.

Cronquist A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press: 1262 pp.

Deitch A.D., Law H. and deVere White R. (1982). A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 30: 967-972.

Doležel J. (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2: 143-154.

Doležel J. and Bartoš J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.

Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H. and Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 51:127-8.

Doležel J., Binarová P. and Lucretti, S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31:113-120.

Doležel J., Doleželová M. and Novák F.J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36: 351.

Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M., Nardi L. and Obermayer R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82:17-26.

Doležel J., Sgorbati S. and Lucretti S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:625-631.

Doyle J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–15.

Esselman E.J., Jianqiang L., Crawford D.J., Windus J.L., and Wolfe, A.D. (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 8: 443-451.

Figueiredo E., Canhoto J. and Ribeiro M. M. (2013). Fingerprinting and genetic diversity of *Olea europaea* L. ssp. *europaea* accessions from the cultivar Galega using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 156: 24-28.

Figueiredo E., Canhoto J.M. and Ribeiro M.M.A. (2012). Olive tree Galega cultivar accessions' identification based on RAPD markers. *XXXVII Jornadas Portuguesas de Genética*, Lisboa.

Galbraith D.W. (1990) Flow Cytometric Analysis of Plant Genomes. In: *Methods in Cell Biology*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 550-562 pp.

Galbraith D.W. (2004). Cytometry and plant sciences: a personal retrospective. *Cytometry*, 58A: 3744.

Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P. and Firoozabady E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.

Gemas V. J., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R. and Feveireiro, P. (2000). Inter-and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 312-319.

Gemas V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A. and Feveireiro P. (2004). Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 501-511.

Gomes S., Martins-Lopes P., Lopes J. and Guedes-Pinto, H. (2009). Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. *Plant molecular biology reporter*, 27: 365-373.

Greilhuber J. (1998). Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Annals of Botany*, 82: 27-35.

Greilhuber J., Temsch E. and Loureiro J. (2007). Nuclear DNA Content Measurement. In: *Flow cytometry with plant cells*. Wiley-Vch Verlag, Weinheim, 67-101.

Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J. and Owen J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single "primers" of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.

Hanson L., Brown R.L., Boyd A., Johnson M. A. and Bennett M. D. (2003). First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera. *Annals of Botany*, 91: 31-38.

Heller F.O. (1973). DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86: 437-441.

Johnston J.S., Bennett M.D., Rayburn A.L., Galbraith D.W. and Price H.J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86: 609-613.

Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K. and Brar D.S. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311-1320.

Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G. and Hodgkin T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources: A guide to the technologies. *IPGRI Technical Bulletin*, (2).

Kesawat M.S. and Kumar B.D. (2009). Molecular markers: it's application in crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12: 169-181.

Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J., Besnard G., Bervillé A. and Dosba F. (2003). The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 521-529.

Lopes M.S., Mendonça D., Sefc K.M., Gil F.S. and da Câmara Machado, A. (2004). Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience*, 39: 1562-1565.

Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J. and Santos C. (2006). Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany*, 98: 515-527.

Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J. and Santos C. (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of botany*, 100: 875-888.

Loureiro, J.C.M. (2007). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Dissertação do Curso de Doutorado em Biologia. Universidade de Aveiro.

Lysak M.A. and Doležel J. (1998). Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). *Caryologia*, 51: 123-132.

Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L. and Guedes-Pinto H. (2007). RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 117-128.

Mekuria G.T., Collins G.G. and Sedgley, M. (1999). Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74: 309-314.

Morettini, A. (1950). Olivicoltura (Vol. 9). Ramo editoriale degli Agricoltori.

Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.

Murray M.G. and Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 19: 4321-4325.

Nandini A.V., Murray B.G., O'Brien I. E.W. and Hammett, K.R.W. (1997). Intra- and interspecific variation in genome size in *Lathyrus* (*Leguminosae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125: 359-366.

Newberry P.E. (1937). On some African species of the genus *Olea* and the original home of the cultivated olive-tree. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 150: 3-16.

Olson M., Hood L., Cantor C. and Botstein D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245: 1434-1435.

Operon RAPD 10 mer Kit, disponível em: <http://www.cosmogenetech.com/cosmo/upload/files/brochure/operon%20RAPD%20kit.pdf>.

Paran I. and Michelmore R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985-993.

Parra-Lobato M.C., Delgado-Martinez F.J. and Gomez-Jimenez M.C. (2012). Morphological traits and RAPD markers for characterization and identification of minor Spanish olive cultivars from the Extremadura region. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2401-2411.

Penner G. A. (1996). RAPD analysis of plant genomes. In: Jahuar P.P (ed.), *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 251-268.

Pfossen M., Heberle-Bors E., Amon A. and Lelley T. (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 21:387-393.

Pires A.S., Azinheira H.G., Cabral A., Tavares S., Tavares D., Castro M., Várzea V., Silva M.C., Abranches R., Loureiro J. and Talhinhos P. (2016). Cytogenomic characterisation of *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of Coffee Berry Disease, reveals diversity in minichromosome profiles and genome size expansion. *Plant Pathology*, 65: 968-977.

Puite K.J. and Tenbroeke W.R.R. (1983). DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with Hoechst 33342. *Plant Science Letters*, 32: 79-88.

Rafalski J.A., Vogel J. M., Morgante M., Powell W., Andre C. and Tingey S.V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. In *Nonmammalian Genomic Analysis* (pp. 75-134).

Rallo P., Dorado G. and Martin A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 984-989.

Rayburn A.L., Auger J.A., Benzinger E.A. and Hepburn A.G. (1989). Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of experimental botany*, 40: 1179-1183.

Rugini E., De Pace C., Gutiérrez-Pesce P. and Muleo R. (2011). *Olea*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer, Berlin Heidelberg: 79-117.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1584pp.

Sanz-Cortés F., Badenes M. L., Paz S., Iniguez A. and Llacer, G. (2001). Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 7-12.

Shapiro H. (2004). *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss, New York: 542 pp.

Sklar L. (2005). The future of flow cytometry in biotechnology: the response to diversity and complexity. In *Flow cytometry for biotechnology*. Oxford University Press, New York, 3-11.

Srivastava P.S. and Narula A. (2005). *Plant biotechnology and molecular markers*. Anamaya Publishers, New Delhi: 385 pp.

Suda J. (2004). An employment of flow cytometry into plant biosystematics. PhD dissertation, Charles University, Prague.

Talhinhas P., Tavares D., Ramos A.P., Gonçalves S. and Loureiro J. (2017). Validation of standards suitable for genome size estimation of fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 142: 76-78.

Terzopoulos P.J., Kolano B., Bebeli P.J., Kaltsikes P.J. and Metzidakis I. (2005). Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 105: 45-51.

Vargas P. and Kadereit, J. W. (2001). Molecular fingerprinting evidence (ISSR, inter-simple sequence repeats) for a wild status of *Olea europaea* L.(Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora*, 196: 142-152.

Various authors (1882). *Enciclopedia Agraria Italiana*, Vol.3, Part 5. UTET, Turin.

Varshney R.K., Mahendar T., Aggarwal R.K. and Börner A. (2007). Genic molecular markers in plants: development and applications. In *Genomics-assisted crop improvement*. Springer, Dordrecht, 13-29.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Zohary D. and Hopf M. (2000). *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Oxford University Press, New York: 249 pp.

Zohary D. and Spiegel-Roy P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187: 319-327.

Zohary D., Hopf, M. (1994). *Olive: Olea europaea*. In *Domestication of plants in the Old World*. Clarendon Press, Oxford.

Anexos

Anexo 2 – Lista de amostras recolhidas.

	Amostra	Citometria de Fluxo	Marcadores Moleculares
	viveiro	✓	n/a
1	0000	✓	✓
2	0011	✓	✓
3	0021	✓	✓
4	0051	✓	✓
5	0431	✓	✓
6	0433	✓	✓
7	0442	✓	✓
8	0462	✓	✓
9	0473	✓	✓
10	0501	✓	✓
11	0502	✓	✓
12	0520	✓	✓
13	1031	✓	✓
14	1053	✓ (duplicado*)	✓ (duplicado*)
15	1061	✓	✓
16	1062	✓	✓
17	1071	✓	✓
18	1101	✓	✓
19	1111	✓	✓
20	1124	✓	✓
21	1131	✓	✓
22	1262	✓	✓
23	1322	✓	✓
24	1362	✓	✓
25	1382	✓	✓
26	1391	✓	✓
27	1392	✓	✓
28	1402	✓	✓
29	1411	✓	✓
30	1452	✓	✓
31	1461	✓	✓
32	1462	☒ (sem amostra)	✓
33	1471	✓	✓
34	1482	✓	✓
35	1492	✓	✓
36	1501	✓	✓
37	2013	✓	✓
38	2029	✓	✓

(Continua na página seguinte)

39	2051	✓	✓
40	2052	✓	✓ (duplicado)
41	2055	✓	✓
42	2062	✓	✓
43	2092	✓	✓
44	2132	✓	✓
45	2133	✓	✓
46	2171	✓ (duplicado*)	✓ (duplicado*)
47	2182	✓	✓
48	2191	✓	✓
49	2211	✓	✓
50	2212	✓ (2213***)	✓
51	2221	✓	✓
55	2232	✓	✓ (2322***)
52	2251	✓	✓
53	2252	✓	✓
54	2314	✓	✓
	2502	✓ (duplicado**)	☒
Total:	57 genótipos	59 amostras	58 amostras/ 55 genótipos

* - genótipos duplicados no campo em sítios diferentes, recolha duplicada accidental em ambos os métodos (citometria de fluxo/marcadores moleculares).

** - genótipos duplicados lado a lado, recolha duplicada accidental para a citometria do fluxo.

*** - número escrito erráticamente na amostra recolhida.

Anexo 3 – Quadro de “primers” para distinção de cultivares de *Olea europaea ssp.europaea* e de acessões de ‘Galega Vulgar’.

“Primer”		Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares			
	Bandas (bp)							
OPC-07	727	Bandas exclusivas em ‘Galega’ (primers OPC-07, OPC-10, OPC-13 utilizados para estudar intra-variabilidade da cultivar ‘Galega’)	RAPD	Gemás V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A. and Feveireiro P. (2004). Genetic diversity in the Olive tree (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i>) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. <i>Genetic Resources and Crop Evolution</i> , 51: 501-511.	‘Azeiteira’; ‘Blanqueta’; ‘Carrasquenha’; ‘Cobrançosa’; ‘Cordovil’; ‘Galega’; ‘Maçanilha’; ‘Madural’; ‘Negrinha’; ‘Redondil’; ‘Verdeal’.			
OPC-08	1016							
OPC-10	569							
	623							
OPC-13	409							
	847							
OPC-16	1423							
OPC-13	603							
OPC-08	584							
OPC-04	1539							
OPC-10	2596							
OPC-08	261					Ausente exclusivamente em ‘Galega’;		
OPC-13	475							
OPC-08	420							
OPC-16	620							
OPC-07	630	Ausente exclusivamente em ‘Madural’;						
OPC-16	1239							
OPC-07	289	Ausente exclusivamente em ‘Cobrançosa’;						
9MS		Utilizados para estudar a intra-variabilidade da cultivar ‘Galega’.	ISSR					
(GAC) ₅								
(GTG) ₅								
(GTGC) ₄								
(GACA) ₄								
UDO99-09		Distinção de todas as cultivares (espanholas e italianas).	SSR	Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L., and Trujillo I. (2004). Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. <i>HortScience</i> , 39: 1557-1561.	‘Alfafara’; ‘Aloreña’; ‘Arbequina’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Bical’; ‘Blanqueta’; ‘Carolea’; ‘Castellana’; ‘Cellina’; ‘Changlot Real’; ‘Cornicabra’; ‘Coratina’; ‘Empeltre’; ‘Farga’; ‘Frantoio’; ‘Gordal Sevillana’; ‘Hojiblanca’; ‘Itrana’; ‘Leccino’; ‘Leccio del Corno’; ‘Lechín de Granada’; ‘Lechin de Sevilla’; ‘Manzanilla Cacereña’; ‘Manzanilla Sevillana’; ‘Moraiolo’; ‘Morisca’; ‘Morrut’; ‘Picual’; ‘Picudo’; ‘Rosciola’; ‘Sevillanca’; ‘Verdial de Badajoz’; ‘Verdial de Huevar’; ‘Verdial de Velez-Málaga’; ‘Villalonga’.			
UDO99-14								
UDO99-43								

(Continua na página seguinte)

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares
A1 A9 A10 C9 C15	Distinção de todas as cultivares, de várias origens, maioritariamente de França, Itália, Espanha e Grécia (C9 e C15 permitem uma maior eficiência na identificação, mas esta é possível só com A1, A9 e A10).	RAPD	Besnard G., Breton C., Baradat P., Khadari B., and Bervillé A. (2001). Cultivar identification in olive based on RAPD markers. <i>Journal of the American Society for Horticultural Science</i> , 126: 668-675.	‘Aglandau’; ‘Amellau’; ‘Amygdalolia’; ‘Arbequina’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Aubenc’; ‘Ayvalik’; ‘Azeradj’; ‘Barnea’; ‘Barouni’; ‘Berdaneil’=‘Poumal’; ‘Biancolilla’; ‘Blanquetier d’Antibes’; ‘Blanquetier de Nice’; ‘Bouteillan’; ‘Cailletier’; ‘Capanacce’; ‘Carolia’; ‘Cassanese’; ‘Cayet Rouge’; ‘Cayon’; ‘Celounen’; ‘Chemlal’; ‘Chemlal Mechtrass’; ‘Chemlali’; ‘Chetoui’; ‘Colombale’; ‘Corniale’; ‘Cornicabra’; ‘Coucourelle’; ‘Courbeil’; ‘Curnet’; ‘Dolce Agogia’; ‘Domat’; ‘Dorée’; ‘Empeltre’; ‘Filayre Rouge’; ‘Frantoio’=‘Cellina’=‘Ghjermana’; ‘Gaïdourolia’; ‘ Galega ’; ‘Giarraffa’; ‘Grapié’; ‘Grossane’; ‘Kaissy’; ‘Kalamata’; ‘Koroneiki’; ‘Leccino’; ‘Lechin de Sevilla’; ‘Leucocarpa’; ‘Lucques’; ‘Malaussena’; ‘Manzanilla’; ‘Merhavia’=‘Belgentier’; ‘Meski’; ‘Moraiolo’=‘Cayet Bleu’=‘Ghjermana’=‘Aliva Nera’; ‘Moresca’; ‘Nabali Mohassen’; ‘Négrette’; ‘Nocellara del Belice’; ‘Nocellara Etnea’; ‘Noirette’; ‘Oblica’; ‘Ogliarola Messinese’; ‘Olivière’; ‘Passalunara’; ‘Pendolino’; ‘Picholine’; ‘Picholine de Rochefort’; ‘Picholine Marocaine’=‘Sigoise’=‘Shimlali’=‘Canivano Blanco’; ‘Picual’; ‘Pigale’; ‘Poulo’; ‘Rascasset’; ‘Redouneil’; ‘Reymet’ ‘Rougette de Pignan’; ‘Rousset’=‘Verdale de l’Hérault’; ‘Sabina’=‘Aliva Bianca’=‘Biancaghia’; ‘Sabina’; ‘Salonenque’; ‘San Felice’; ‘Santagatense’=‘Nabali Baladi Baka’=‘Souri Cadouri’; ‘Sauzin’; ‘Sevillenca’; ‘Sofralik’; ‘Souri’=‘Nabali’; ‘Souri Mansi’; ‘Taksrit’=‘Limli’; ‘Tanche’; ‘Toffahi’; ‘Tonda Iblea’; ‘Uslu’; ‘Vallanolia’; ‘Verdanel’; ‘Verdelé’; ‘Vermillau’; ‘Villalonga’; ‘Zaituna’; ‘Zaity’; ‘Zarazi’; ‘Zinzala’. (=’ significa que não houve distinção entre variedades com os RAPDs utilizados)

(Continua na página seguinte)

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares								
OPA-01 OPA-13 OPC-08 OPC-13 OPE-01 OPE-02 OPE-16 OPO-03 OPO-04 OPO-05 OPO-06 OPO-07 OPO-10 OPO-12 OPO-13 OPX-03 OPX-14 OPX-15 OPX-18 OPX-19	Distinção de todas as cultivares, 30 portuguesas e oito estrangeiras (o artigo refere que todas as cultivares podem ser identificadas com apenas sete ISSR e 12 RAPD, mas não indica quais).	RAPD	Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L. and Guedes-Pinto H. (2007). RAPD and ISSR molecular markers in <i>Olea europaea</i> L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. <i>Genetic Resources and Crop Evolution</i> , 54: 117-128.	‘Azeiteira’; ‘Blanqueta’; ‘Borrenta’; ‘Carrasquenha’; ‘Cobrançosa’; ‘Conserva de Elvas’; ‘Cordovil de Castelo Branco’; ‘Cordovil de Elvas’; ‘Cordovil de Serpa’; ‘Cordovil de Trás-os-Montes’; ‘Cornicabra’; ‘ Galega ’; ‘Galego de Évora’; ‘Galego Grado de Serpa’; ‘Golosinha’; ‘Izmir Sofralik’; ‘Kalamata’; ‘Leccino’; ‘Leucocarpa’; ‘Maçanilha Carrasquenha’; ‘Maçanilha de Elvas’; ‘Maçanilha de Tavira’; ‘Madural’; ‘Merhavia’; ‘Meski’; ‘Mora’; ‘Morocaine’; ‘Negrinha de Freixo’; ‘Negrita’; ‘Picholine’; ‘Picual’; ‘Quinta do Portado’; ‘Redondal’; ‘Redondil’; ‘Tentilheira’; ‘Verde Verdelho’; ‘Verdeal de Serpa’; ‘Verdeal de Trás-os-Montes’.								
UBC-807 UBC-809 UBC-810 UBC-811 UBC-817 UBC-823 UBC-825 UBC-826 UBC-834 UBC-841 UBC-846 UBC-849 UBC-850 UBC-855 UBC-856 UBC-880 UBC-889						ISSR						
UBC-818 UBC-849									Distinção de todas as cultivares (maioritariamente gregas, italianas e espanholas).	ISSR	Terzopoulos, P. J., Kolano, B., Bebeli, P. J., Kaltsikes, P. J., and Metzidakis, I. (2005). Identification of <i>Olea europaea</i> L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. <i>Scientia Horticulturae</i> , 105: 45-51.	‘Amphisis’; ‘Amygdalolia’; ‘Baruni’; ‘Basilikada’; ‘Changlot Real’; ‘Chrysolia’; ‘Dolce agocia’; ‘Ecizano’; ‘Empeltre’; ‘Frantoio’; ‘Grappolo’; ‘Kalokerida’; ‘Karolia’; ‘Kolybada’; ‘Koroneiki’; ‘Kothreiki’; ‘Koutsourelia’; ‘Leccino’; ‘Lechio-del-corno’; ‘Mastoidis’; ‘Nevadillo negro’; ‘Oblonga’; ‘Piangente’; ‘Rachati’; ‘Sevillano’; ‘Sincoise’; ‘Souri’; ‘Strogylolia’; ‘Thiaki’; ‘Throubolia’; ‘Zargariega’.

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares
OPA-01 OPA-08 OPX-01 OPX-03	Distinção de todas as cultivares (maioritariamente espanholas, mas também gregas, italianas, portuguesas, turcas, tunisinas e marroquinas).	RAPD	Belaj A., Trujillo I., De la Rosa R., Rallo L., and Gimenez M. J. (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. <i>Journal of the American Society for Horticultural Science</i> , 126: 64-71.	‘Amphisis’; ‘Amygdalolia’; ‘Baruni’; ‘Basilikada’; ‘Changlot Real’; ‘Chrysolia’; ‘Dolce agocia’; ‘Ecizano’; ‘Empeltre’; ‘Frantoio’; ‘Grappolo’; ‘Kalokerida’; ‘Karolia’; ‘Kolybada’; ‘Koroneiki’; ‘Kothreiki’; ‘Koutsourelia’; ‘Leccino’; ‘Lechio-del-corno’; ‘Mastoidis’; ‘Nevadillo negro’; ‘Oblonga’; ‘Piangente’; ‘Rachati’; ‘Sevillano’; ‘Sincoise’; ‘Souri’; ‘Strogylolia’; ‘Thiaki’; ‘Throubolia’; ‘Zargariega’.
A1 A9 Me30Ms PA(GA)₅	Distinção de todas as cultivares (maioritariamente francesas, mas também italianas, gregas, espanholas, marroquinas, tunisinas e israelitas).	RAPD SSR	Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J., Besnard G., Bervillé A. and Dosba F. (2003). The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 106: 521-529.	‘Aglandau’; ‘Amygdalolia’; ‘Araban AHP’; ‘Araban du Var’; ‘Arbequina’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Argental’; ‘Aubenc’; ‘Avellanet’; ‘Baguet’; ‘Barnea’; ‘Barouni’; ‘Béchu de l’Ardèche’; ‘Belle d’Espagne’; ‘Berdaneil, Poulmal’; ‘Bid el Hamam’=‘Meski’; ‘Bigarude’; ‘Blanc Payzac’; ‘Blanc Vinezac’; ‘Cailletier’; ‘Cayet bleu’; ‘Cayet rouge’; ‘Cayon’; ‘Celounen’; ‘Chemlali’; ‘Colombale’; ‘Corniale’; ‘Coucourelle’; ‘Courbeil’; ‘Curnet’; ‘Darame’; ‘Dent de Verrat’; ‘Dorée Vinezac’; ‘Filayre’; ‘Gaïdourolia’; ‘Galinier’ (offspring of ‘Lucques’); ‘Gardisson’; ‘Germaine’; ‘Grapie’; ‘Grappola’; ‘Grassois’; ‘Gros Vert’; ‘Grossane’; ‘Koroneiki Kotreiki’; ‘Lechin de Sevilla’; ‘Linat’; ‘Malaussina’; ‘Manzanilla’; ‘Menara’; ‘Montaurounenque’; ‘Moufla’; ‘Négret Callian’; ‘Négrette des Vans’; ‘Négrette SJB’=‘Négrette B’; ‘Oblonga’; ‘Olivière’; ‘Petite Noire’; ‘Picholine’; ‘Picual’; ‘Pigale’; ‘Poulo’; ‘Poussou’; ‘Rabeyrolle’; ‘Rascasset’; ‘Razzola’; ‘Redouneil’; ‘Reymet’; ‘Rouge’; ‘Rougeon’; ‘Rougette’; ‘Roussette’=‘Verdale de l’Ht’; ‘Roussette SJG’; ‘Tanche’; ‘Tripue’; ‘Taulelle’; ‘Valensole’; ‘Verdanel’; ‘Verdelet’; ‘Vilette’; ‘Vermillau’.
IAS-oli06 IAS-oli11 IAS-oli12 IAS-oli17 IAS-oli22	Distinção de todas as cultivares, à exceção de: ‘Morisa’ e ‘Picudo’; ‘Castellana’ e ‘Manzanilla Cacerenã’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Kalamon’ e ‘Picholine Marrocaïne’.	SSR	Rallo P., Dorado G. and Martin A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (<i>Olea europaea</i> L.). <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 101: 984-989.	‘Alfafara’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Arbequina’; ‘Ayvalik’; ‘Bical’; ‘Blanqueta’; ‘Cakir’; ‘Carolea’; ‘Castellana’; ‘Changlot Real’; ‘Chemlali’; ‘Chetoui’; ‘Coratina’; ‘Cobrançosa’; ‘Cordovil de Serpa’; ‘Cornicabra’; ‘Dolce Agocia’; ‘Domat’; ‘Empeltre’; ‘Farga’; ‘Frantoio’; ‘Galega’; ‘Gemlik’; ‘Gerboui’; ‘Gordal Sevillana’; ‘Hojiblanca’; ‘Kaissy’; ‘Kalamon’; ‘Konservolia’; ‘Koroneiki’; ‘Leccino’; ‘Lechín de Granada’; ‘Lechín de Sevilla’; ‘Manzanilla Cacerena’; ‘Manzanilla de Sevilla’; ‘Memeçik’; ‘Meski’; ‘Moraiolo’; ‘Morisca’; ‘Morrut’; ‘Picholine Marrocaïne’; ‘Picual’; ‘Picudo’; ‘Sevillanca’; ‘Uslu’; ‘Verdial de Huevar’.

(Continua na página seguinte)

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares
UDO99-001	Distinção de todas as cultivares.	ISSR	Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A., and Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (<i>Olea europaea</i> L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 104: 223-228.	‘Coratina’; ‘Casaliva’; ‘Favaro’; ‘Fort’; ‘Frantoio’; ‘Grignan’; ‘Leccino’; ‘Less’; ‘Pendolino’; ‘Raza’; ‘Rossanel’; ‘Trep’.
UDO79-003				
UDO99-004				
UDO99-005				
UDO99-006				
UDO99-007				
UDO99-008				
UDO99-009				
UDO99-011				
UDO99-012				
UDO99-014				
UDO99-015				
UDO99-017				
UDO99-019				
UDO99-020				
UDO99-022				
UDO99-024				
UDO99-025				
UDO99-026				
UDO99-027				
UDO99-028				
UDO99-031				
UDO99-034				
UDO99-035				
UDO99-036				
UDO99-039				
UDO99-041				
UDO99-042				
UDO99-043				
UDO99-044				
OPA-01	Todas as cultivares distinguidas com OPR-01, OPK-14 e OPA-01.	RAPD	Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C. and Gomez-Jimenez M.C. (2008). Genetic diversity assessment in Portugal accessions of <i>Olea europaea</i> by RAPD markers. <i>Biologia Plantarum</i> , 52: 642-647.	‘Azeiteira’; ‘Bico de Corvo de Serpa’; ‘Blanqueta de Elvas’; ‘Borrenta’; ‘Carrasqueira’; ‘Cobrançosa’; ‘Conserva das Barrancas’; ‘Conserva de Elvas’; ‘Cordovil de Castelo Branco’; ‘Cordovil de Elvas’; ‘Cordovil de Serpa’; ‘Cordovil Trás-os-Montes’; ‘ Galega ’; ‘Galego Évora’; ‘Galego Grado Serpa’; ‘Golosinha’; ‘Maçanilha de Tavira’; ‘Madural’; ‘Planalto’; ‘Quinta do Portado’; ‘Redondal’; ‘Redondil’; ‘Tentilheira’; ‘Verdeal de Serpa’; ‘Verdeal Trás-os-Montes’; ‘Verdeal Elvas’; ‘Verde Verdelho’.
OPC-15				
OPK-14				
OPR-01				
OPR-06				
OPR-07				
OPS-03				
OPS-14				
OPX-01				
OPX-03				
OPZ-19				

(Continua na página seguinte)

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares
A1-225 A1-275 A1-1200 A2-650 A10-1250	Estabelecimento de relações entre 102 cultivares da bacia do mediterrâneo (uso dos frutos e origem geográfica).	RAPD	Besnard, G., Baradat, P., and Bervillé, A. (2001). Genetic relationships in the olive (<i>Olea europaea</i> L.) reflect multilocal selection of cultivars. <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 102: 251-258.	‘Aglandau’; ‘Amellau’; ‘Amygdalolia’; ‘Arbequina’; ‘Ascolana Tenera’; ‘Aubenc’; ‘Ayvalik’; ‘Azerad’; ‘Barnea’; ‘Berdaneil’; ‘Biancolilla’; ‘Blanquetier de Nice’; ‘Barouni’; ‘Bouteillan’; ‘Blanquetier d’Antibes’; ‘Chemlal “Mechtrass”’; ‘Cailletier’; ‘Cassanese’; ‘Cayet Rouge’; ‘Cayon’; ‘Capanacce’; ‘Carolia’; ‘Celounen’; ‘Chemlal’; ‘Chetoui’; ‘Chemlali’; ‘Courbeil’; ‘Coucourelle’; ‘Colombale’; ‘Corniale’; ‘Cornicabra’; ‘Curnet’; ‘Domat’; ‘Dorée’; ‘Dolce Agogia’; ‘Empeltre’; ‘Frantoio’; ‘Filayre Rouge’; ‘Galega’ ; ‘Gadouralia’; ‘Giarraffa’; ‘Grapié’; ‘Grossane’; ‘Kaissy’; ‘Kalamata’; ‘Koroneiki’; ‘Leucocarpa’; ‘Leccino’; ‘Lechin de Sevilla’; ‘Lucques’; ‘Manzanilla’; ‘Malaussena’; ‘Meski’; ‘Merhavia’; ‘Moraiolo’; ‘Moresca’; ‘Nabali “Mohassen”’; ‘Négrette’; ‘Noirette’; ‘Nocellara Etnea’; ‘Nocellara del Belice’; ‘Oblica’; ‘Ogliarola Messinese’; ‘Olivière’; ‘Pendolino’; ‘Pigale’; ‘Picholine de Rochefort’; ‘Picholine Marocaine’; ‘Passalunara’; ‘Picual’; ‘Picholine’; ‘Poulo’; ‘Redouneil’; ‘Rascasset’; ‘Reymet’; ‘Rougette de Pignan’; ‘Sauzin’; ‘San Felice’; ‘Sabina’; ‘Sabina’; ‘Santagate’; ‘Sevillanca’; ‘Salonenque’; ‘Sofralik’; ‘Souri’; ‘Souri “Mansi”’; ‘Tanche’; ‘Taksrit’; ‘Toffahi’; ‘Tonda Iblea’; ‘Uslu’; ‘Verdale de l’Hérault’; ‘Vermillau’; ‘Verdelé’; ‘Villalonga’; ‘Verdanel’; ‘Vallanolia’; ‘Zaity’; ‘Zarazi’; ‘Zinzala’; ‘Zaituna’.
OPA OPC OPK OPR OPS OPX OPZ	Todas as cultivares identificadas através da combinação de 3 primers (OPF-6, OPA-8 e OPK-16).	RAPD	Parra-Lobato, M. C., Delgado-Martinez, F. J., & Gomez-Jimenez, M. C. (2012). Morphological traits and RAPD markers for characterization and identification of minor Spanish olive cultivars from the Extremadura region. <i>Genetics and Molecular Research</i> , 11: 2401-2411.	‘Carrasqueña’; ‘Oliva’; ‘Morisca’; ‘Pico Limon’; ‘Pico Real’; ‘Azulejo’; ‘Perito’; ‘Manzanilla Real’; ‘Redondil’; ‘Cordovil’; ‘Ocal’; ‘Colora’; ‘Cañaval’; ‘Tempranillo’; ‘Galega’ ; ‘Pajonala’; ‘Bical’; ‘Limoncillo’; ‘Corniche’; ‘Azulito’; ‘Jariego’; ‘Hojiblanca’; ‘Manzanilla Cacereña’; ‘Manzanilla Sevillana’; ‘Cornicabra’; ‘Redondillo’; ‘Cuerno Real’; ‘WT’; ‘Picual’; ‘Arbequina’; ‘Original’; ‘Cojón del Gallo’.

(Continua na página seguinte)

“Primer”	Especificidade	Tipo	Fonte	Cultivares			
OPC-1	Identificação dos 78 genótipos com os 12 “primers” OPC-1/2/3/4/5/7/8/9/10/13/14/20.	RAPD	Figueiredo, E., Canhoto, J., and Ribeiro, M. M. (2013). Fingerprinting and genetic diversity of <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>europaea</i> accessions from the cultivar Galega using RAPD markers. <i>Scientia Horticulturae</i> , 156: 24-28.	‘Galega’			
OPC-2							
OPC-3							
OPC-4							
OPC-5							
OPC-6							
OPC-7							
OPC-8							
OPC-9							
OPC-10							
OPC-11							
OPC-12							
OPC-13							
OPC-14							
OPC-15							
OPC-16							
OPC-17							
OPC-18							
OPC-19							
OPC-20							
UBC 807		ISSR	Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lopes, J. and Guedes-Pinto, H. (2009). Assessing genetic diversity in <i>Olea europaea</i> L. using ISSR and SSR markers. <i>Plant molecular biology reporter</i> , 27: 365-373.	‘Santulhana’ or ‘Gordal Sevillana’ ‘Cornalhuda’ or ‘Cornicabra’; ‘Bical’ ; ‘Casta Grande’; ‘Cordovesa’ or ‘Manzanilha Prieta’; ‘Espanhola’ ; ‘Verdeal-Transmontana’; ‘Azeite Branco’ ; ‘Linguiceira’ ; ‘Lentisca’ ; ‘Coimbreira’; ‘Borrenta’; ‘Carrasca-Molar’; ‘Negrita’ ; ‘Zambulha’ or ‘Lentisca’ ; ‘Zimbreira’ ; ‘Redondal’; ‘Longal’ ; ‘Madural2’ ; ‘Madural5’ ; ‘Cordovil’ ; ‘Madural4’; ‘Verdeal2’ ; ‘Cordovil2’ ; ‘Madural3’ ; ‘Cobrançosa’; ‘Salgueira’; ‘Negrinha’ ; ‘Maçanilha Algarvia’ ; ‘Cordovil-Serpa’; ‘Verdeal-Alentejana’ ; ‘Galega Vulgar’ ; ‘Azeitoneira’ or ‘Azeiteira’; ‘Blanqueta’ ; ‘Picual’; ‘Hojiblanca’ ; ‘Manzanilha-Carrasquenha’; ‘Arbequina’ ; ‘Leccino’; ‘Frantoio’; ‘Ascolana’			
UBC 809							
UBC 810							
UBC 811							
UBC 817							
UBC 823							
UBC 826							
UBC 834							
UBC 846							
UBC 849							
UBC 856							
ssrOeUA–DCA1					SSR		
ssrOeUA–DCA3							
ssrOeUA–DCA4							
ssrOeUA–DCA5							
ssrOeUA–DCA9							
ssrOeUA–DCA13							
OPC-02							
OPC-04							
OPC-05							
OPC-07							
OPC-08							
OPC-09							
OPC-10							
OPC-12							
OPC-13							
OPC-14							
OPC-15							
OPC-16							
OPC-19							
OPC-20							

Anexo 4 – “Primers” RAPD e ISSR utilizados. Fonte: Operon RAPD 10 mer Kit, Cosmogenetech disponível em: <http://www.cosmogenetech.com/cosmo/upload/files/brochure/operon%20RAPD%20kit.pdf>; Gemas *et al.*, 2004.

“Primers”	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)
	OPC-4	CCGCATCTAC
	OPC-07	GTCCCGACGA
RAPD	OPC-08	TGGACCGGTG
	OPC-10	TGTCTGGGTG
	OPC-13	AAGCCTCGTC
	9MS	KKYRVRV(CT) ₆ onde K=G/T; Y=C/G; R=A/G; V=A/C/G
	(GAC) ₅	GACGACGACGACGAC
ISSR	(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG
	(GTGC) ₄	GTGCGTGCGTGCGTGC
	(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA

Anexo 5 – Quadro de valores obtidos de citometria de fluxo com diferentes concentrações de iodeto de propídio em seis repetições de uma amostra de oliveira ‘Galega Vulgar’.

Repetição	Concentração IP	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Contagem total	%Ungated (lixo)	Contagem lixo
1	1	28950	58680	35,97	113,8	7,98	80484	64,03	51534
	0,5	31509	63180	38	104,71	7,63	82911	62	51405
	0,25	31956	67335	41,58	93,22	7,57	76848	58,42	44895
	0,125	35185	73700	46,05	82,98	7,39	76403	53,95	41219
2	1	27501	53320	39,74	115,89	7,01	69200	60,26	41700
	0,5	29182	55415	46,31	98,3	6,97	63009	53,69	33830
	0,25	24693	50250	44,69	95,41	6,2	55251	55,31	30559
	0,125	28250	57810	48,2	83,11	6,3	58607	51,8	30358
3	1	25392	50955	24,96	117,11	7,01	101719	75,04	76330
	0,5	21958	43370	31,16	104,45	7,04	70472	68,84	48513
	0,25	24590	47605	38,79	94,74	7,57	63395	61,21	38804
	0,125	21061	39815	48,28	85,6	8,35	43619	51,72	22560
4	1	26990	48840	33,96	115,69	7,47	79469	66,04	52481
	0,5	21027	38085	37,18	106,49	6,33	56549	62,82	35524
	0,25	18059	33555	44,35	97,57	7,35	40720	55,65	22661
	0,125	16952	32195	45,12	87,5	5,91	37569	54,88	20618
5	1	71569	139360	46,7	123,3	8,58	153267	53,3	81691
	0,5	62962	120400	54,51	103,09	9,03	115514	45,49	52547
	0,25	59210	111940	51,59	93,72	6,58	114762	48,41	55556
	0,125	51434	105890	56,26	79,92	7,11	91426	43,74	39990
6	1	50443	94970	40,03	115,54	6,2	125999	59,97	75562
	0,5	45242	87225	45,97	103,4	5,91	98420	54,03	53176
	0,25	38518	74805	47,3	98,45	6,93	81432	52,7	42915
	0,125	39798	76215	51,39	84,22	6,66	77437	48,61	37642

Anexo 6 – Quadro de resultados de citometria de fluxo de oliveira ‘Galega Vulgar’.

Amostra	Repetição	Fluorescência padrão	Fluorescência amostra	Conteúdo nuclear amostra		Coeficiente de variação padrão (%)	Coeficiente de variação amostra (%)
				pg	Mbp		
0000	1	89,47	174,73	3,183300548	3113,267936	5,44	4,14
	2	91,24	177,49	3,170853792	3101,095009	5,55	3,87
	3	91,54	177,88	3,167406598	3097,723653	5,21	3,03
	4	92,19	179,96	3,181850526	3111,849815	4,9	3,07
	5	92,31	180,38	3,185130538	3115,057667	4,31	3,2
	6	92,32	180,01	3,178252816	3108,331254	4,93	3,13
0011	1	97,44	191,68	3,206469622	3135,927291	4,94	3,89
	2	98,05	194,86	3,239386028	3168,119535	4,41	3,65
	3	100,86	196,76	3,179841364	3109,884854	4,89	3,3
	4	101,76	196,77	3,151877948	3082,536633	3,51	2,85
	5	101,18	198,65	3,200232259	3129,82715	4,32	3,12
	6	103,37	200,02	3,15403502	3084,646249	5,17	3,41
0021	1	136,3	263,85	3,155359501	3085,941592	2,36	1,58
	2	138	264,82	3,127946377	3059,131557	2,81	1,74
	3	138,18	265,2	3,12835432	3059,530525	2,31	1,83
	4	138,15	264,4	3,119594644	3050,963561	2,88	1,37
	5	137,63	262,99	3,114682119	3046,159112	2,07	1,09
	6	137,92	266,45	3,149024797	3079,746251	2,17	1,54
0051	1	89,75	176,36	3,202972702	3132,507303	5,25	4,86
	2	95,1	184,35	3,159731861	3090,21776	4,16	4,5
	3	96,31	185,33	3,136620289	3067,614642	4,76	4,13
	4	97,2	187,45	3,143451646	3074,29571	4,31	4,07
	5	96,62	188,3	3,176661147	3106,774602	4,49	3,59
	6	96,47	188,82	3,190386649	3120,198142	4,14	3,75
0431	1	89,85	175,3	3,180178075	3110,214157	6,07	4,96
	2	91,48	176,66	3,147745955	3078,495544	4,72	4,19
	3	91,07	173,07	3,097662238	3029,513669	4,47	3,74
	4	90,16	170,11	3,075413709	3007,754607	3,64	3
	5	85,51	161,75	3,083294352	3015,461876	3,48	2,35
	6	83,42	158,89	3,104659554	3036,357044	4,1	3,13
0433	1	92,67	181,72	3,196326751	3126,007562	5,05	4,96
	2	95,82	184,73	3,142453559	3073,31958	4,25	3,42
	3	96,5	184,91	3,123350259	3054,636553	4,48	3,32
	4	97,47	186,87	3,125044629	3056,293647	4,38	3,57
	5	97,42	187,9	3,14388216	3074,716752	4,67	3,69
	6	97,69	188,49	3,145037363	3075,846541	5,22	3,76
0442	1	91,88	180,59	3,203762516	3133,279741	6,34	3,85
	2	99,84	191,39	3,12465645	3055,914008	3,96	2,5
	3	100,17	193,62	3,150649895	3081,335597	2,98	2,42
	4	102,88	198,94	3,151945956	3082,603145	3,38	2,9
	5	104,38	203,95	3,184886952	3114,819439	4,57	3,71
	6	109,05	209,73	3,134891334	3065,923725	4,49	3,27

(Continua na página seguinte)

0462	1	79,23	157,78	3,24601035	3174,598122	6,48	4,51
	2	85,89	164,44	3,120703225	3052,047754	5,38	3,58
	3	84,64	163,64	3,151384688	3082,054225	4,93	3,65
	4	83,88	163,55	3,17818908	3108,26892	4,87	3,2
	5	84,9	163,91	3,14691755	3077,685364	5,76	3,29
	6	84,22	164,59	3,18548682	3115,40611	3,63	3,43
0473	1	94,7	188,68	3,247607181	3176,159823	5,35	5,27
	2	101,09	194,11	3,129877337	3061,020036	4,46	2,81
	3	102,86	195,8	3,102799922	3034,538324	3,9	2,3
	4	104,34	199,9	3,122838796	3054,136343	4,22	2,77
	5	106,53	197,83	3,02696799	2960,374694	3,87	1,4
	6	105,53	205,98	3,181535108	3111,541336	4,46	3,04
0501	1	87,64	176,14	3,275994979	3203,92309	4,79	6,08
	2	92,95	181,61	3,184769231	3114,704308	5,42	4,15
	3	94,01	183,39	3,17972237	3109,768478	5,79	4,57
	4	94,59	183,77	3,166773443	3097,104428	5,95	4,53
	5	94,75	184,56	3,175016359	3105,165999	4,95	4,17
	6	96,1	186,5	3,163319459	3093,726431	4,95	4,41
0502	1	91,92	176,36	3,127358573	3058,556684	6,05	5,27
	2	94,22	182,19	3,151875398	3082,534139	6,59	4,54
	3	97,05	183,59	3,08347965	3015,643097	5,41	3,84
	4	97,26	184,59	3,093581123	3025,522338	6,66	3,94
	5	99,05	186,15	3,063346795	2995,953165	6,87	4,32
	6	100,11	186,85	3,042308461	2975,377675	6,32	4,76
0520	1	93,79	181,37	3,152074848	3082,729201	4,63	4,39
	2	95,9	184,83	3,141531804	3072,418104	4,66	4,02
	3	96,84	185,76	3,12669145	3057,904238	4,55	3,68
	4	97,48	188,03	3,144120845	3074,950187	3,05	3,42
	5	98,13	189,62	3,149705493	3080,411972	4,03	3,37
	6	100,92	192,43	3,10801526	3039,638924	6,91	3,5
1031	1	100,77	196,94	3,185592934	3115,50989	3,6	2,51
	2	106,32	202,98	3,111901806	3043,439966	3,27	2,59
	3	109,36	207,12	3,087103146	3019,186876	3,25	2,51
	4	108,72	207,75	3,114721302	3046,197434	2,86	2,43
	5	109,62	206,78	3,074725415	3007,081456	2,85	2,12
	6	109,52	209,48	3,117717312	3049,127531	2,6	1,96
1053	1	109,79	210,08	3,118958011	3050,340935	7,1	5,18
	2	130,04	249,66	3,129389419	3060,542851	3,28	2,44
	3	132,09	251,1	3,098591869	3030,422848	2,94	2,67
	4	133,57	251,48	3,06889571	3001,380004	2,96	2,27
	5	134,32	251,38	3,050546456	2983,434434	2,79	2,13
	6	133,08	250,44	3,067457169	2999,973111	2,67	1,66
1061	1	127,26	243,57	3,11974776	3051,11331	3,72	3,28
	2	131,55	249,63	3,093096921	3025,048789	2,35	2,87
	3	133,88	253,92	3,091496863	3023,483932	2,57	2,84

(Continua na página seguinte)

	4	134,01	253,67	3,085457055	3017,577	3,11	2,77
	5	133,85	254,99	3,105220022	3036,905182	2,28	2,41
	6	134,59	255,26	3,091416896	3023,405724	2,74	1,98
1062	1	98,48	187,33	3,100608245	3032,394864	4,78	4,46
	2	100,26	189,58	3,082140435	3014,333345	4,45	3,55
	3	100,43	191,07	3,101106243	3032,881906	4,46	3,71
	4	101,75	192,22	3,07929828	3011,553718	4,61	3,52
	5	101,38	193,57	3,11224206	3043,772734	4,77	3,57
	6	102,39	194,68	3,099212814	3031,030132	4,69	3,72
1071	1	90,94	177,6	3,183285683	3113,253398	5,45	3,66
	2	93,19	179,88	3,146307544	3077,088778	3,88	3
	3	94,1	179,63	3,111550478	3043,096368	3,99	2,62
	4	94,48	179,31	3,09351503	3025,457699	3,24	2,31
	5	94,46	180,52	3,115049757	3046,518662	3,17	2,09
	6	93,23	178,14	3,114536094	3046,016299	3,24	1,87
1101	1	111,3	213,96	3,133466307	3064,530049	2,53	2,08
	2	114,81	222,32	3,156359202	3086,9193	2,57	2,23
	3	114,98	222,92	3,160198295	3090,673933	2,65	2,32
	4	115,86	222,49	3,130145866	3061,282657	2,55	1,98
	5	114,86	221,69	3,14604475	3076,831766	2,46	1,97
	6	115,18	220,78	3,124426116	3055,688741	2,82	1,67
1111	1	91,48	180,3	3,212603848	3141,926563	3,57	3,74
	2	91,88	177,2	3,143622116	3074,462429	3,95	4,07
	3	87,95	170,01	3,150839113	3081,520653	2,75	3,16
	4	85,21	166,07	3,176787936	3106,898601	4,26	3,64
	5	82,78	162,32	3,196201981	3125,885538	4,75	4,33
	6	87	167,67	3,141403448	3072,292572	4,64	4,37
1124	1	99,38	196,74	3,226868585	3155,877476	3,26	4,5
	2	100,39	192,85	3,131243152	3062,355802	3,77	2,63
	3	95,32	175,54	3,001785564	2935,746282	4,03	0,99
	4	85,64	167,48	3,187673984	3117,545156	4,66	3,87
	5	87,95	168,45	3,121927231	3053,244832	5,55	3,23
	6	78,35	154,94	3,223384812	3152,470346	5,58	4,66
1131	1	89,61	173,68	3,159227765	3089,724754	7,12	5,7
	2	94,1	180,61	3,128526036	3059,698463	5,87	4,71
	3	94,68	183,51	3,159287072	3089,782757	4,13	4,14
	4	96,03	184,94	3,1391461	3070,084886	4,98	4,29
	5	97	185,46	3,116492784	3047,929942	5,04	4
	6	96,71	187,73	3,164097818	3094,487666	5,68	4,28
1262	1	93,11	182,69	3,198203201	3127,84273	4,4	3,41
	2	94,07	184,6	3,198660572	3128,290039	5,21	3,71
	3	95,11	186,05	3,188534329	3118,386573	3,83	3,13
	4	95,37	186,51	3,18770368	3117,574199	3,84	2,72
	5	95,85	188,9	3,212383933	3141,711487	4,61	3,35
	6	96,73	189,91	3,200178848	3129,774914	4,52	3,09

(Continua na página seguinte)

1322	1	95,31	185,53	3,172950372	3103,145464	4,08	3,1
	2	98,77	194,14	3,203889845	3133,404269	4,24	3,04
	3	100,21	195,8	3,184851811	3114,785071	3,46	2,84
	4	100,72	196,5	3,180053614	3110,092434	4,13	2,52
	5	100,07	198,47	3,232798041	3161,676484	4,3	2,95
	6	102,07	203,61	3,251536201	3180,002404	2,15	2,76
1362	1	99,97	192,03	3,131028308	3062,145686	4,14	3,83
	2	101,6	195,35	3,134060039	3065,110719	4,63	3,59
	3	101,05	196,38	3,167732806	3098,042684	5,45	3,66
	4	101,26	196,64	3,165348608	3095,710938	4,74	3,86
	5	102,62	198,35	3,15056032	3081,247993	4,35	3,81
	6	102	198,85	3,17770098	3107,791559	4,49	3,35
1382	1	89,73	171,21	3,110133735	3041,710792	5,72	5,33
	2	93,28	176,93	3,09172277	3023,704869	3,63	3,12
	3	90,9	174,43	3,127842684	3059,030145	3,93	3,93
	4	89,87	171,19	3,104926004	3036,617632	4,66	3,88
	5	90,43	168,55	3,038112352	2971,27388	3,7	2,2
	6	88,02	168,53	3,120925926	3052,265556	2,57	2,52
1391	1	99,52	195,75	3,206114349	3135,579833	5,75	4,08
	2	100,92	198,26	3,202177963	3131,730048	4,67	3,56
	3	102,08	199,96	3,192934953	3122,690384	4,67	3,46
	4	103,3	200,35	3,161379477	3091,829129	4,29	3,24
	5	104,28	201,72	3,153084005	3083,716157	3,95	3,72
	6	104,47	203,3	3,172001532	3102,217498	4,8	3,49
1392	1	94,25	182,16	3,150353316	3081,045543	4,1	4,22
	2	97,67	183,93	3,069580219	3002,049454	4,57	3,43
	3	98,98	187,03	3,080005052	3012,24494	3,04	2,83
	4	99,43	187,42	3,072459016	3004,864918	3,69	3,1
	5	100,47	191,6	3,10847019	3040,083846	4,39	2,51
	6	101,21	194,13	3,126488489	3057,705743	3,01	2,31
1402	1	87,04	168,65	3,15831227	3088,8294	4,43	4,37
	2	90,87	176,94	3,173898977	3104,073199	3,92	4,29
	3	94,46	182,55	3,150079399	3080,777652	4,18	3,65
	4	96,53	186,38	3,147201906	3077,963464	4,1	3,65
	5	98,32	189,48	3,141297803	3072,189251	4,08	3,06
	6	99,84	193,67	3,161880008	3092,318648	3,93	3,53
1411	1	85,67	166,75	3,172668379	3102,869674	4,82	5,39
	2	90,04	176	3,186139494	3116,044425	5,76	2,98
	3	90,61	176,37	3,172752456	3102,951902	5,02	2,84
	4	92,01	179,12	3,173194218	3103,383945	5,23	3,09
	5	90,99	180,17	3,227575558	3156,568895	5,38	3,21
	6	92,58	180,67	3,180947289	3110,966448	4,26	2,95
1442	1	96,87	190,06	3,198077836	3127,720124	5,17	3,17
	2	102,48	194,52	3,093946136	3025,879321	3,96	2,68
	3	103,77	198,9	3,124284475	3055,550217	4,11	3,63

(Continua na página seguinte)

	4	106,53	198,69	3,040126725	2973,243937	2,86	3,14
	5	105,94	198,59	3,055519162	2988,29774	2,88	2,13
	6	105,35	200,1	3,095994305	3027,88243	4,53	2,72
1452	1	89,4	171,65	3,129636465	3060,784463	4,65	4,47
	2	93	181,1	3,17411828	3104,287677	6,09	4,63
	3	95,75	183,23	3,119215666	3050,592921	4,54	3,85
	4	95,65	185,29	3,157581809	3088,115009	4,24	3,83
	5	96,51	187,16	3,161027873	3091,48526	4,55	3,82
	6	97,33	188,67	3,159684578	3090,171518	5,41	4,13
1461	1	89,74	174,93	3,177355694	3107,453869	6,05	4,65
	2	93,1	180,14	3,153901182	3084,515356	5,19	3,64
	3	94,72	180,35	3,103573691	3035,29507	4,36	3,39
	4	94,68	179,9	3,097137727	3029,000697	4,65	3,24
	5	95,19	181,25	3,103661099	3035,380555	4,9	3,31
	6	95,36	184,26	3,14957844	3080,287714	5,36	3,67
1471	1	84,12	166,4	3,224346172	3153,410556	5,95	4,26
	2	91,39	175,36	3,127659481	3058,850973	4,42	3,5
	3	91,56	177,44	3,158881608	3089,386212	3,61	2,95
	4	92,46	179,65	3,167093878	3097,417813	3,05	2,88
	5	92,79	179,14	3,14687143	3077,640259	3,55	2,07
	6	93,08	180,35	3,158256339	3088,774699	3,91	2,42
1482	1	98,95	187,15	3,082915614	3015,09147	5,08	3,92
	2	99,91	191,16	3,118714843	3050,103117	4,27	4,67
	3	99,35	187,06	3,069026673	3001,508087	4,28	3,82
	4	96,37	174,75	2,955717547	2890,691761	4,71	2,84
	5	92,78	169,23	2,973107351	2907,698989	5,21	2,56
	6	90,12	164,83	2,981279405	2915,691258	5,17	2,28
1492	1	94,16	186,26	3,224339422	3153,403955	6,89	4,52
	2	102,1	197,25	3,149045054	3079,766063	3,77	4,86
	3	102,65	194,55	3,089298587	3021,334019	3,68	3,73
	4	102,76	192,29	3,050143052	2983,039905	3,57	2,55
	5	102,02	189,78	3,032164282	2965,456667	3,36	2,08
	6	101,58	189,18	3,035670408	2968,885659	4,29	2,2
1501	1	93,17	181,76	3,17987335	3109,916136	4,46	2,95
	2	94,86	183,53	3,153635884	3084,255895	3,79	2,97
	3	93,91	182,41	3,166098392	3096,444227	3,76	2,4
	4	95,14	182,89	3,133389741	3064,455167	3,49	2,14
	5	95,72	184,27	3,13790326	3068,869388	3,52	2,14
	6	96,08	183,86	3,119190258	3050,568072	3,39	2,31
2013	1	93,91	178,15	3,092157385	3024,129922	4,28	2,39
	2	96,58	184,15	3,107936426	3039,561824	2,38	2,48
	3	99,31	186,06	3,053849562	2986,664872	2,89	2,04
	4	100,89	189,9	3,068064228	3000,566815	3	2,74
	5	101,12	192,05	3,095742682	3027,636343	2,87	2,62
	6	101,72	193,67	3,103441801	3035,166081	2,88	2,67

(Continua na página seguinte)

2029	1	95,67	185,59	3,16203303	3092,468304	2,64	3,7
	2	97,23	186,96	3,134267201	3065,313323	3,2	2,9
	3	98,17	188,99	3,137961699	3068,926542	3,16	3,23
	4	98,41	187,64	3,107948379	3039,573515	3,73	2,6
	5	99,26	188,29	3,092007858	3023,983685	3,86	2,94
	6	100,11	191,94	3,125184297	3056,430243	3,34	2,51
2051	1	85,1	164,33	3,147566392	3078,319932	5,32	4,52
	2	90,53	172,96	3,114158842	3045,647348	4,87	3,43
	3	90,45	172,57	3,109885019	3041,467549	5,23	3,1
	4	89,41	171,29	3,122723409	3054,023494	4,5	2,94
	5	90,19	172,79	3,122826256	3054,124078	5,54	2,82
	6	89,9	173,82	3,151575083	3082,240432	4,62	3,14
2052	1	84,83	162,49	3,122229164	3053,540123	5,97	5,43
	2	89,76	170,08	3,088573975	3020,625348	3,34	3,18
	3	91,21	172,73	3,086831488	3018,921195	4,49	3,63
	4	90,61	172,29	3,099356583	3031,170738	3,98	3,05
	5	92,33	173,85	3,069159536	3001,638027	4,51	3,37
	6	92,56	174,94	3,080728176	3012,952156	4,52	3,46
2055	1	90,44	175,34	3,160152587	3090,62923	5,85	5,1
	2	93,05	178,56	3,127918323	3059,10412	4,92	4,29
	3	93,24	181,1	3,165948091	3096,297233	5,02	3,96
	4	94,76	181,71	3,12565745	3056,892986	4,5	3,31
	5	95,47	184,46	3,149364198	3080,078186	4,41	3,88
	6	95,11	184,6	3,163684155	3094,083104	5,22	3,65
2062	1	96,32	189,07	3,199585756	3129,194869	4,74	3,7
	2	98,91	190,26	3,135414013	3066,434904	3,03	3,09
	3	98,03	189,7	3,154248699	3084,855228	3,04	2,47
	4	97,64	188,03	3,13896866	3069,91135	3,34	2,26
	5	95,77	187,37	3,189026835	3118,868245	2,67	2,21
	6	98,01	189,6	3,153229262	3083,858219	2,17	2,46
2092	1	88,01	175,56	3,251480514	3179,947942	6,2	4,93
	2	91,93	181,24	3,213545089	3142,847097	5,17	3,98
	3	94,58	184,12	3,173140199	3103,331114	4,7	3,18
	4	94,68	186,22	3,205942121	3135,411394	5,29	3,23
	5	95,95	188,17	3,196634706	3126,308742	4,22	3,28
	6	95,27	189,08	3,235020468	3163,850018	4,73	3,31
2132	1	93,14	172,48	3,018492592	2952,085755	3,9	2,71
	2	88,88	166,85	3,059917867	2992,599674	3,6	3,19
	3	81	153,34	3,085730864	3017,844785	4,66	3,51
	4	75,19	142,55	3,090258013	3022,272337	6,15	3,78
	5	69,63	133,44	3,123757001	3055,034347	4,96	4,5
	6	68,83	134,57	3,186824059	3116,71393	5,04	4,14
2133	1	80,89	158,5	3,193905303	3123,639387	4,56	4,11
	2	80,72	158,69	3,204468533	3133,970225	4,34	2,94
	3	81,06	157,72	3,171522329	3101,748838	4,39	2,72

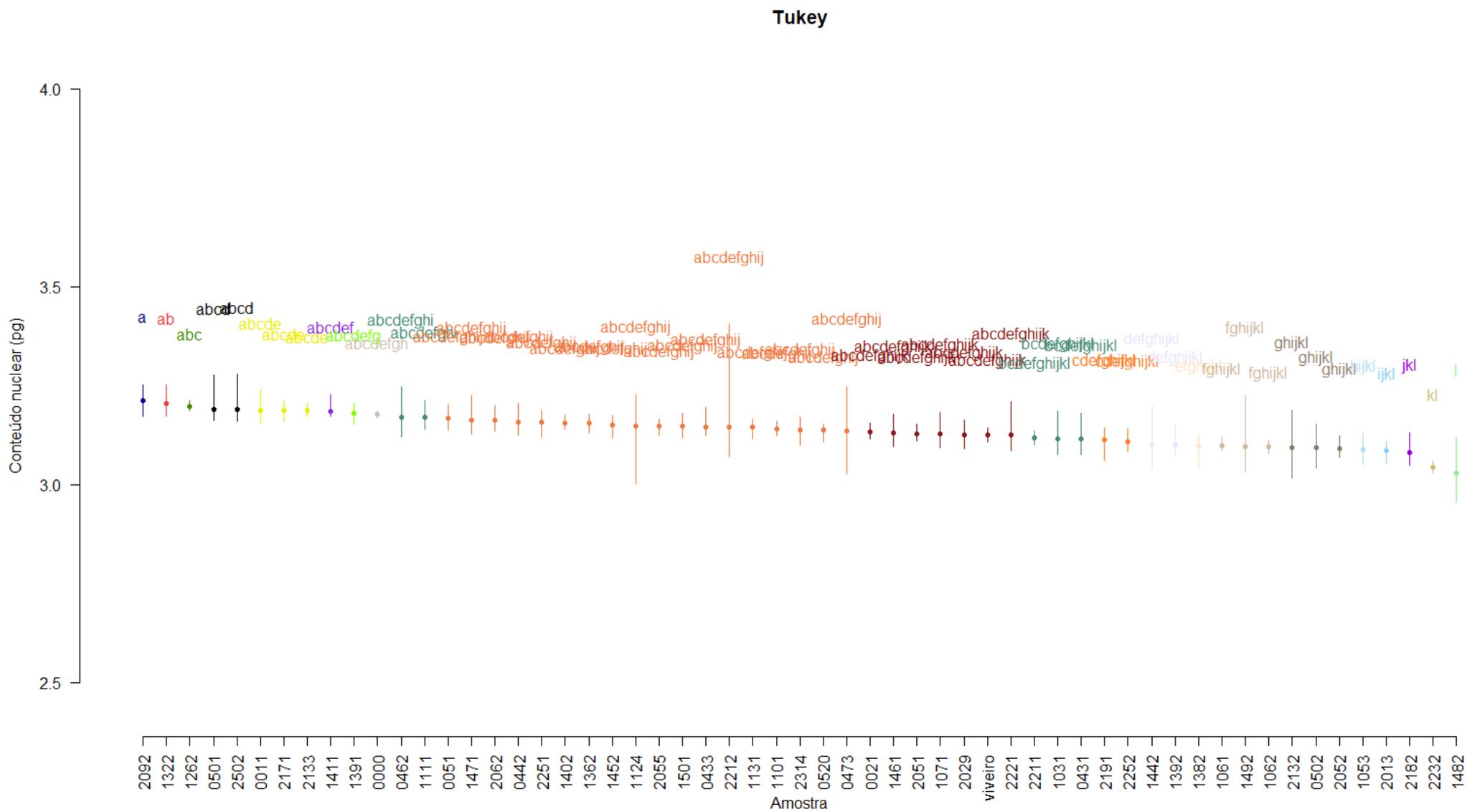
(Continua na página seguinte)

	4	80,29	156,85	3,18427575	3114,221684	5,05	3,39
	5	82,28	161,18	3,193040836	3122,793938	4,21	2,81
	6	82,81	161,63	3,181462384	3111,470211	3,3	2,63
2171	1	90,26	177	3,196432528	3126,111013	4,83	4,54
	2	95,43	188,06	3,212174369	3141,506533	4,08	3,76
	3	96,59	189,11	3,191316907	3121,107935	3,78	3
	4	97,61	190,65	3,183685073	3113,644002	4,73	3,17
	5	98,45	192,45	3,186323007	3116,2239	3,83	3,21
	6	99,9	193,67	3,159980981	3090,461399	4,24	2,92
2182	1	85,1	163,41	3,129944771	3061,085986	5,04	4,26
	2	87,24	164,02	3,06456442	2997,144003	4	2,7
	3	87,98	167	3,093998636	3025,930666	3,66	2,54
	4	89,18	168,12	3,072836959	3005,234546	3,41	1,94
	5	89,31	167,13	3,0502956	2983,189096	4,43	1,82
	6	91,36	171,96	3,068025394	3000,528835	2,86	2,15
2191	1	99,98	191,93	3,129084817	3060,244951	4,97	3,65
	2	103,16	198,88	3,142442807	3073,309066	4,64	4,37
	3	102,46	196,45	3,125253758	3056,498175	4,37	3,62
	4	101,25	191,03	3,07534716	3007,689523	4,67	2,28
	5	96,12	180,53	3,061422181	2994,070893	4,22	2,81
	6	94,16	181,55	3,1428048	3073,663095	3,93	4,16
2211	1	115,32	219,61	3,10409556	3035,805458	3,7	2,94
	2	117,23	223	3,100656828	3032,442378	3,24	2,85
	3	116,06	222,65	3,126998966	3058,204989	3,48	2,64
	4	117,21	223,96	3,114536302	3046,016504	3,73	2,55
	5	117,5	225,3	3,125438298	3056,678655	2,83	2,36
	6	117,7	226,46	3,136192014	3067,195789	3,35	2,9
2212	1	120,92	229,4	3,092308965	3024,278167	4,81	4,17
	2	126,52	239,58	3,086590262	3018,685277	2,61	2,46
	3	131,04	246,77	3,069559676	3002,029364	3,41	2,48
	4	132,55	250,2	3,07677103	3009,082067	2,48	2,43
	5	133,88	279,55	3,403544219	3328,666246	2,91	1,73
	6	131,1	252,45	3,138775744	3069,722677	3,72	2,9
2221	1	86,52	170,33	3,208944753	3138,347968	4,41	4,8
	2	98,95	189,96	3,129204649	3060,362147	3	3,25
	3	100,31	191,51	3,111965906	3043,502656	3,64	3,2
	4	102,32	195,28	3,110891321	3042,451712	2,85	2,48
	5	104,11	198,61	3,10954087	3041,130971	3,19	2,27
	6	105,49	199,73	3,086168357	3018,272653	2,8	2,45
2232	1	83,77	155,64	3,028449326	2961,82344	7,46	4,34
	2	89,3	166,96	3,047534155	2980,488403	5,93	3,56
	3	90,58	169,31	3,046757562	2979,728896	6,11	3
	4	91,22	171,14	3,058081561	2990,803767	5,15	2,94
	5	93,56	173,93	3,030204147	2963,539656	5,45	3,24
	6	94,94	177,83	3,053116705	2985,948138	5,75	3,08

(Continua na página seguinte)

2251	1	83,56	163,43	3,188019387	3117,882961	4,5	6
	2	88,86	171,79	3,151223273	3081,896361	3,91	3,66
	3	85,89	164,54	3,122601001	3053,903779	3,61	3,23
	4	82,57	158,04	3,119840136	3051,203653	3,64	2,83
	5	76,08	148,26	3,176443218	3106,561467	3,96	3,53
	6	72,42	141,53	3,185499862	3115,418865	5,53	3,76
2252	1	130,33	251,15	3,141061152	3071,957807	3,29	3,37
	2	131,46	250,5	3,106001826	3037,669785	2,98	2,44
	3	130,49	249,35	3,114725266	3046,20131	3,61	2,5
	4	130,62	247,65	3,090411116	3022,422072	2,56	2
	5	129,79	245,49	3,08304723	3015,220191	2,51	1,49
	6	130,35	249,49	3,11982125	3051,185183	1,96	1,9
2314	1	79,77	154,23	3,151496803	3082,163874	5,69	6,02
	2	84,53	160,77	3,100143144	3031,939995	4,8	3,45
	3	84,38	162,18	3,13289168	3063,968064	4,92	3,74
	4	84,53	164,39	3,169947947	3100,209093	4,86	3,51
	5	84,94	163,88	3,144859901	3075,672983	5,57	3,74
	6	85,06	163,43	3,131799906	3062,900308	6,01	3,98
2502	1	75,87	152,6	3,278476341	3206,349862	7,5	6,41
	2	89,68	174,21	3,16639496	3096,734271	4,57	3,37
	3	91,14	176,83	3,162529076	3092,953436	4,91	3,19
	4	91,34	177,12	3,160779505	3091,242356	4,3	3,04
	5	92,13	179,61	3,177730381	3107,820313	4,72	3,05
	6	92,02	180,06	3,189500109	3119,331106	4,77	2,88
viveiro	1	92,44	177,25	3,125459758	3056,699643	4	3,7
	2	94,77	180,7	3,107956104	3039,58107	3,36	3,16
	3	95,53	183,52	3,131347221	3062,457582	2,96	2,87
	4	95,49	182,13	3,108931825	3040,535325	4,59	2,45
	5	93,49	180,23	3,142313616	3073,182717	5,12	2,75
	6	95,17	183,59	3,14439109	3075,214486	3,15	2,2

Anexo 7 – Gráfico de resultados do teste de Tukey para amostras oliveira ‘Galega Vulgar’ em citometria de fluxo.



Anexo 8 – Matriz geral da contagem de bandas de aplicação de “primers” RAPD e ISSR nas 10 amostras selecionadas.

2092	1322	1262	0501	0011	1053	2013	2182	2232	1482
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	1	0	1	1	1	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(Continua na página seguinte)

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

(Continua na página seguinte)

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(Continua na página seguinte)

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

