

# **Caracterização morfológica e genética de cultivares de oliveiras centenárias e tradicionais para a obtenção de produtos diferenciados**

**Gisela Mariana Magalhães Ribeiro Fernandes**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

**Prof. Doutora Paula Cristina Santos Baptista**

**Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira**

**Bragança  
2014**



“É absolutamente certo que neste mundo  
nunca se consegue o possível se não se tentar,  
constantemente, fazer o impossível.”

Max Webber



*Aos meus pais,*

*Ao meu irmão*



## **Agradecimentos**

A concretização desta dissertação marca o final de uma importante etapa da minha vida. Assim, gostaria de manifestar o meu apreço e sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram de forma positiva para a sua realização.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Paula Cristina Santos Baptista e ao Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária de Bragança, pela orientação científica, pelos conhecimentos transmitidos, pela constante disponibilidade e incentivo prestados, pela confiança transmitida, pelos proveitosos comentários, sugestões e opiniões, pela exigência e rigor, por toda a simpatia e amizade demonstrada.

À Professora Doutora Alice Pinto, da Escola Superior Agrária de Bragança, e à minha colega Dora pelos ensinamentos e esclarecimentos transmitidos na área da genética populacional, pela disponibilidade e paciência demonstradas e pelas oportunas sugestões.

À Doutora Sónia Santos, da Escola Superior Agrária de Bragança, pela disponibilidade e auxílio concedidos no tratamento estatístico dos dados morfológicos.

Aos meus colegas de laboratório, Fátima, Teresa, Ricardo, Nuno, Diogo e Diogo Ferrão pelos conhecimentos transmitidos durante a parte experimental deste trabalho, pelo constante auxílio, incentivo, boa disposição e simpatia.

Aos meus colegas dos mestrados, por todo o incentivo prestado, simpatia e boa disposição.

Aos meus amigos, nomeadamente à Andreia, Azucena, Carla, Catarina, Filipa, Natércia e Pedro pela paciência, pelo constante apoio, compreensão e encorajamento prestados, pelos oportunos e proveitosos conselhos e sugestões. Pelo convívio, boa disposição e amizade sempre demonstradas.

E por fim, mas nunca em último, à minha família. Aos meus Pais pois sem o seu apoio não seria possível alcançar mais este objetivo na minha vida. Pelo constante incentivo em todos os momentos, pelos conselhos, pela amizade e pelo seu amor incondicional. Ao meu Irmão, por estar também sempre do meu lado, pelo encorajamento, pela amizade e pelo seu amor demonstrados. Aos meus Avós, por acreditarem sempre em mim e me incentivarem constantemente. E ao meu Avô, que mesmo lá no céu, sempre me deu força e olhou por mim.

Obrigada, por me terem dedicado parte do vosso tempo.





Trabalho financiado pelo Projeto "RED/AGROTEC - Red transfronteriza España Portugal de experimentación y transferencia para el desarrollo del sector agropecuario y agroindustrial" financiado no âmbito do POCTEP - Programa Cooperação Transfronteira Espanha-Portugal 2007-2013.





---

**Índice**

<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	x
<b>Capítulo 1- Enquadramento e Objetivos</b> .....	1
<b>Capítulo 2- Introdução</b> .....	5
2.1. A cultura da oliveira e sua importância a nível nacional .....	7
2.2. Principais cultivares de oliveiras existentes em Portugal .....	8
2.3. Oliveiras centenárias e sua importância .....	9
2.4. Importância da certificação varietal .....	10
2.5. Caracterização de cultivares de oliveira .....	11
2.5.1. Caracterização morfológica .....	12
2.5.2. Caracterização genética .....	13
<b>Capítulo 3- Material e Métodos</b> .....	17
3.1. Amostragem .....	19
3.2. Caracterização morfológica .....	20
3.2.1. Parâmetros biométricos avaliados no fruto .....	21
3.2.2. Parâmetros biométricos avaliados no endocarpo .....	23
3.2.3. Parâmetros biométricos avaliados na folha .....	25
3.3. Caracterização genética .....	26
3.3.1. Extração de ADN .....	26
3.3.2. Concentração, pureza e qualidade do ADN extraído/amplificado .....	27
3.3.3. Caracterização genética por microssatélites .....	28
3.3.3.1. Seleção de iniciadores oligonucleotídicos .....	28
3.3.3.2. Condições de amplificação .....	31
3.3.3.3. Análise de fragmentos .....	31
3.3.4. Análise de dados .....	32
3.3.4.1. Morfológica .....	32
3.3.4.2. Genética .....	33
<b>Capítulo 4- Resultados e Discussão</b> .....	35
4.1. Análise Morfológica .....	37
4.1.1. Parâmetros biométricos .....	37
4.1.1.1. Parâmetros avaliados no fruto .....	37
4.1.1.2. Parâmetros avaliados no endocarpo .....	49

---

4.1.1.3. Parâmetros avaliados na folha .....	61
4.1.2. Análise filogenética com base nos caracteres morfológicos .....	71
4.1.3. Análise de Componentes Principais com base nos caracteres morfológicos .....	73
4.2. Análise genética .....	75
4.2.1. Análise da diversidade genética .....	75
4.2.1.1. Frequências alélicas .....	75
4.2.1.2. Estimativas da diversidade genética .....	79
4.2.1.2.1. Número de alelos por <i>locus</i> ( $N_a$ ) .....	79
4.2.1.2.2. Número de alelos efetivos ( $N_e$ ) .....	81
4.2.1.2.3. Índice de <i>Shannon</i> ( <i>I</i> ) .....	82
4.2.1.2.4. Heterozigotia .....	82
4.2.1.2.5. Alelos privados ( <i>A</i> privados) .....	83
4.2.2. Análise da estrutura genética .....	85
4.2.2.1. Índice $F_{ST}$ .....	86
4.2.2.2. <i>Structure</i> .....	87
4.2.3. Relações filogenéticas .....	89
4.3. Correlação entre as análises morfológica e genética .....	90
<b>Capítulo 5- Conclusão</b> .....	<b>93</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>97</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>107</b>

---

**Índice de tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Coordenadas geográficas das oliveiras amostradas.....	20
<b>Tabela 2-</b> Descrição dos <i>loci</i> e respectivos fluoróforos e temperaturas de emparelhamento.....	29
<b>Tabela 3-</b> Descrição dos <i>loci</i> e respectivos fluoróforos e temperaturas de emparelhamento (Continuação).....	30
<b>Tabela 4-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos de oliveiras novas.....	38
<b>Tabela 5-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos de oliveiras centenárias.....	39
<b>Tabela 6-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	43
<b>Tabela 7-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	44
<b>Tabela 8-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	45
<b>Tabela 9-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	46
<b>Tabela 10-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	47
<b>Tabela 11-</b> Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	48
<b>Tabela 12-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nos endocarpos de oliveiras novas.....	50
<b>Tabela 13-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nos endocarpos de oliveiras centenárias.....	51
<b>Tabela 14-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	55
<b>Tabela 15-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	56
<b>Tabela 16-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	57

---

<b>Tabela 17-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	58
<b>Tabela 18-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	59
<b>Tabela 19-</b> Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	60
<b>Tabela 20-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de oliveiras novas.....	62
<b>Tabela 21-</b> Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de oliveiras centenárias.....	63
<b>Tabela 22-</b> Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	67
<b>Tabela 23-</b> Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	68
<b>Tabela 24-</b> Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas.....	69
<b>Tabela 25-</b> Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras centenárias.....	70
<b>Tabela 26-</b> Frequência alélica para as populações de oliveiras novas e centenárias....	77
<b>Tabela 27-</b> Estimativas da diversidade genética nas duas populações de oliveiras amostradas (oliveiras novas e centenárias).....	80
<b>Tabela 28-</b> <i>Locus</i> e os respetivos alelos privados e as suas frequências, nas duas populações de oliveiras amostradas.....	84
<b>Tabela 29-</b> Grau de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as duas populações de oliveiras amostradas.....	87
<b>Tabela 30-</b> Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> ( $r$ ) para o fruto, endocarpo, folha e total dos órgãos, para a população de oliveiras centenárias, novas e ambas as populações.....	91

---

**Índice de figuras**

<b>Figura 1-</b> Distribuição geográfica das principais zonas de cultivo de <i>O. europaea</i> L. a nível mundial. ....	7
<b>Figura 2-</b> Produção de azeite e de azeitona de mesa por região, em 2010/2011. ....	8
<b>Figura 3-</b> Mapa de Portugal, com destaque da região de Mirandela. ....	19
<b>Figura 4-</b> Forma do fruto. ....	21
<b>Figura 5-</b> Forma do ápice ....	22
<b>Figura 6-</b> Forma da base. ....	22
<b>Figura 7-</b> Mamilo. ....	22
<b>Figura 8-</b> Presença de lentículas. ....	22
<b>Figura 9-</b> Forma do endocarpo ....	23
<b>Figura 10-</b> Superfície ....	24
<b>Figura 11-</b> Distribuição dos sulcos fibrovasculares ....	25
<b>Figura 12-</b> Extremidade do ápice ....	25
<b>Figura 13-</b> Forma da folha. ....	26
<b>Figura 14-</b> Curvatura longitudinal do limbo. ....	26
<b>Figura 15-</b> Dendrogramas de dissimilaridade morfológica nas oliveiras novas e centenárias ....	72
<b>Figura 16-</b> ACP usando as variáveis quantitativas avaliadas nos frutos, endocarpos e folhas de oliveiras novas e centenárias. ....	75
<b>Figura 17-</b> Valores de $\Delta K$ em função do número de grupos formados (K). ....	88
<b>Figura 18-</b> Análise da estrutura genética das 15 oliveiras novas e das 17 oliveiras centenárias ....	89
<b>Figura 19-</b> Dendrograma obtido a partir do método UPGMA baseado no índice de similaridade <i>Jaccard</i> . ....	90





**Abreviaturas, siglas e símbolos**

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
A privados	Alelos privados
A <sub>260</sub>	Absorvância a 260 nanômetros
A <sub>280</sub>	Absorvância a 280 nanômetros
ACP	Análise de Componentes Principais
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Citosina
C	Oliveiras Centenárias
CE	Comunidade Europeia
cm	Centímetros
COI	Conselho Oleícola Internacional
Comp.	Comprimento
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DOP	Denominação de Origem Protegida
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
F privados	Frequência dos alelos privados
G	Guanina
g	Gramas
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>e</sub>	Heterozigotia esperada
H <sub>o</sub>	Heterozigotia observada
I	Índice de <i>Shannon</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
kb	Kilo pares de bases
Larg.	Largura
M	Molar

MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Oliveiras Novas
N <sub>a</sub>	Número de alelos por <i>locus</i>
NaCl	Cloreto de sódio
N <sub>e</sub>	Número de alelos efetivos
Nº	Número
NS	Não significativo
°C	Graus Celsius
p	<i>p-value</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Rpm	Rotações por minuto
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
U	Unidades
UE	União Europeia
UPGMA	<i>Unweight Pair Group Method with Arithmetic</i>
UV	Ultra violeta
V	Voltes

## Resumo

As oliveiras centenárias são uma marca da paisagem Transmontana e a obtenção de azeites diferenciados destas árvores poderá ser um nicho a explorar, com vantagens económicas, sociais e ambientais. Esta estratégia só será viável após a caracterização genética das cultivares de oliveiras centenárias existentes na região. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente e geneticamente, através da análise por microssatélites, cultivares de oliveiras centenárias existentes na região Transmontana. Neste estudo foram ainda incluídas cultivares tradicionais frequentemente plantadas na região de forma a elucidar possíveis relações de filogenia entre estas e as centenárias.

Os resultados da análise morfológica do fruto, endocarpo e folha das oliveiras amostradas (15 tradicionais e 17 centenárias) não permitiram uma diferenciação completa das duas populações. Os caracteres mais diferenciadores nas oliveiras tradicionais estavam relacionadas com a folha e a forma do fruto, enquanto que nas centenárias estavam relacionadas com o peso e diâmetro do fruto e endocarpo. As características do endocarpo foram as que permitiram uma maior diferenciação das duas populações.

Os 12 *loci* utilizados na análise genética permitiram detetar 74 alelos nas 32 oliveiras e evidenciaram a existência de uma grande diversidade. A população de oliveiras centenárias apresentou uma maior diversidade genética e número de alelos privados, comparativamente com a população de oliveiras novas. Em ambas as populações foi registado um excesso de heterozigóticos. Apesar do baixo valor de  $F_{ST}$  observado (0,030), a análise do *structure* permitiu a diferenciação das duas populações de oliveiras e sugeriu a possibilidade de algumas das oliveiras novas terem origem das centenárias. Dos *loci* estudados, UDO-011 e DCA18 foram os que permitiram uma maior diferenciação das duas populações podendo ser bastante úteis na certificação de oliveiras centenárias.

O teste de *Mantel* evidenciou uma correlação positiva e altamente significativa entre os caracteres morfológicos, em especial os relacionados com o fruto, e a análise molecular. Com base nos resultados obtidos é recomendável a conservação da população de oliveiras centenárias por apresentar uma grande diversidade genética.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L., microssatélites, diferenciação, estrutura populacional, folha, fruto, endocarpo.

**Abstract**

Centenary olive trees are a typical element on Trás-os-Montes landscape, being the extraction of differentiated olive oils from these trees a potential niche to explore, with economic, social and environmental benefits. This strategy will be only feasible after the genetic characterization of the centenary olive trees of this region. This study aimed to characterize both morphologically and genetically, through microsatellite analysis, the centenary olive trees in the Trás-os-Montes region. In this study were also included traditional cultivars of this region in order to elucidate possible phylogenetic relationships between these and centenary olive trees.

The results from the morphological analysis of the fruit, endocarp and leaf from the 15 traditional and 17 centenary olive trees did not allow a complete differentiation of the two populations. The most distinguishable morphological trait in traditional cultivars were related to leaf and shape of fruit, while in the centenary olive trees were most related with the weight and diameter of both the fruit and endocarp. The traits related with the endocarp were the characters that allowed a better differentiation of the two olive tree populations.

The 12 *loci* used in the genetic analysis allowed the detection of 74 alleles in the 32 olive trees and showed a great diversity. The centenary olive trees population showed a higher genetic diversity and number of private alleles when compared to the traditional olive trees population. In both populations was observed an excess of heterozygotes. Despite the low  $F_{ST}$  value observed (0,030), the structure analysis allowed the differentiation of the two olive trees populations and indicates that some of the traditional olive tree cultivars may be originated from the centenary olive trees. Among the studied *loci*, UDO-011 and DCA18, allowed the greatest differentiation of the two populations and may be useful in the certification of centenary olive trees.

The Mantel test showed a positive and highly significant correlation between morphological traits, especially those related to the fruit, and molecular analysis. Taking into account the results, it is suggested the conservation of the centenary olive tree population due to their higher genetic diversity.

**Keywords:** *Olea europaea* L., microsatellite markers, differentiation, population structure, leaf, fruit, endocarp.

# Capítulo 1

## Enquadramento e Objetivos





A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie arbórea que se encontra dispersa por quase todo o mundo (Ghanbari *et al.*, 2012) apresentando elevada importância económica, sobretudo nos países da bacia mediterrânica incluindo Portugal (Gomes *et al.*, 2012). Os produtos derivados do olival, em especial o azeite e a azeitona de mesa, têm um peso importante na economia nacional, tendo a sua exportação gerado no ano de 2012 cerca de 268 787 milhões de euros (Estatísticas Agrícolas, 2012). Em Trás-os-Montes, segunda maior região produtora de azeite em Portugal (COI, 2012), a cultura da oliveira detém igualmente considerável importância económica (Peres *et al.*, 2011). Contudo, o mercado de azeite sendo muito competitivo e com preços instáveis e baixos, incompatível com os elevados custos de produção dos olivais tradicionais que constituem a maioria das explorações na região, tem originado consideráveis perdas de rendimento dos produtores. Uma das estratégias para fazer face a esta concorrência, cada vez mais intensa, passa pelo desenvolvimento de novos produtos uma vez que a tendência do mercado aponta para o aumento da procura de diferenciação e qualidade. Neste âmbito, destaca-se a produção e comercialização de azeites obtidos a partir de oliveiras centenárias. A procura destes azeites tem vindo a aumentar sobretudo nos mercados internacionais e constitui um produto de valor acrescentado. É na qualidade da matéria-prima de cultivares mais adaptadas aos sistemas minifundiários, dominantes na região, e na sua diferenciação e/ou singularidade, que reside o valor destes azeites. Contudo, para que estas iniciativas consigam credibilização e a garantia da presença destes azeites no mercado de forma sustentável é importante que se conheça a diversidade genética e fenotípica destas árvores centenárias, que são desconhecidas na região Transmontana.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar morfológicamente (fruto, endocarpo e folha) e geneticamente (através da análise de microssatélites) cultivares de oliveiras centenárias e cultivares tradicionais, frequentemente plantadas na região Transmontana. Os resultados obtidos permitirão assim aumentar o conhecimento sobre a variabilidade genética e as relações filogenéticas entre as oliveiras.

Adicionalmente, espera-se contribuir, no futuro, para a identificação de um marcador molecular que poderá ser utilizado como certificador de oliveiras centenárias. A caracterização genética e a análise filogenética de cultivares centenárias poderá ainda facultar informação importante para a criação de um banco de germoplasma e para a compreensão da origem das oliveiras atualmente cultivadas.





# Capítulo 2

## Introdução





## 2.1. A cultura da oliveira e sua importância a nível nacional

A oliveira é uma das árvores mais antigas cultivadas no mundo (Doveri & Baldoni, 2007). Esta árvore frutífera pertence à família *Oleaceae*, ao género *Olea* e à espécie *Olea europaea* L. (Doveri & Baldoni, 2007).

Atualmente, é cultivada em quase todo o mundo (Ghanbari *et al.*, 2012). Porém, por questões edafoclimáticas, o seu cultivo é feito essencialmente em duas zonas do globo que se situam entre os paralelos 30 e 45 dos hemisférios norte e sul (Figura 1) (COI, 2008). É, contudo, na bacia do Mediterrâneo que o seu cultivo está centrado para a produção de azeite e azeitona de mesa, representando cerca de 95% (Yildiz, 2010) da superfície oleícola mundial (Gomes *et al.*, 2012). Os estados membros da união europeia (UE-28) são responsáveis por 65% da produção mundial de azeitona, com Espanha a liderar, seguido da Itália e da Grécia. Estes países são, igualmente, os maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2014). Portugal ocupa a décima posição no ranking mundial e a quarta posição a nível da UE (FAOSTAT, 2014) com uma produção de azeitonas (para azeite e de mesa) na ordem das 416 599 toneladas no ano 2012 (Estatísticas Agrícolas, 2012). No mesmo ano, as exportações de azeitona de mesa, em Portugal, rondaram as 14 280 toneladas (cerca de 5 439 000 euros) e as de azeite 96 077 toneladas (cerca de 263 348 000 euros) (Estatísticas Agrícolas, 2012).



**Figura 1-** Distribuição geográfica das principais zonas de cultivo de *O. europaea* L. a nível mundial.

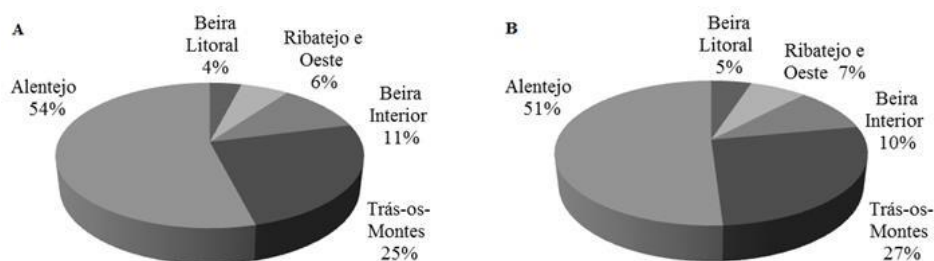
Fonte: COI, 2008.

Para além da importância económica, a cultura da oliveira em Portugal possui igualmente uma enorme relevância a nível social e paisagístico (Peres *et al.*, 2011). A maioria da área olivícola está localizada nas regiões do interior mais desfavorecidas e

com menor densidade populacional. Deste modo, o cultivo da oliveira para além de contribuir para a coesão social e territorial, também constitui uma importante fonte de emprego e, conseqüentemente, colabora para a fixação das populações rurais. A nível paisagístico a cultura da oliveira também é bastante importante, uma vez que os olivais são uma marca da paisagem nacional, nomeadamente nas regiões do interior do país. Derivado desta beleza, o setor do turismo tem vindo a aumentar com o passar dos anos, o que poderá ser um complemento muito importante ao rendimento da empresa agrícola.

## 2.2. Principais cultivares de oliveiras existentes em Portugal

Portugal contém cinco principais regiões de cultivo de oliveiras: Trás-os-Montes, Beira Litoral, Beira Interior, Ribatejo e Oeste e Alentejo. No ano agrícola 2010/2011 a região de Trás-os-Montes foi a segunda maior produtora de azeite e azeitona de mesa, contribuindo com 25% e 27%, respetivamente, para a produção nacional (Figura 2) (COI, 2012). As cultivares predominantes nesta região são a Cobrançosa, Verdeal, Madural, Negrinha e Santulhana (Alves, 2007).



**Figura 2-** Produção de azeite (A) e de azeitona de mesa (B) por região, em 2010/2011.

Fonte: COI, 2012.

No Alentejo, maior região produtora de azeite e azeitona de mesa, na atualidade, a nível nacional (COI, 2012), predominam as cultivares Galega, Cordovil, Verdeal, Cobrançosa, Maçanilha, Carrasquenha, Bical de Évora, Redondil, Conserva de Elvas e Azeitona (Alves, 2007). No Ribatejo estão presentes maioritariamente as cultivares Galega, Cobrançosa e Lentisca e nas Beiras Litoral e Interior são cultivadas as variedades Galega, Cordovil, Bical, Cobrançosa, Carrasquinha e Cornicabra (Alves, 2007). Em todas estas regiões é possível encontrar alguns exemplares de oliveiras

centenárias, em especial nos olivais tradicionais, cuja identidade da cultivar é praticamente desconhecida. Em particular, na região de Trás-os-Montes, estas oliveiras centenárias são uma característica da paisagem. Contudo, a informação sobre o número de exemplares existentes, bem como o seu potencial de produção e a sua caracterização são ainda desconhecidos. De igual modo, a sua proteção ou mesmo exploração sustentável não é praticada.

### **2.3. Oliveiras centenárias e sua importância**

Na atualidade tem-se assistido à intensificação da produção de azeitonas pela plantação e/ou reconversão de olivais tradicionais por olivais intensivos e super-intensivos. Esta reconversão implica, inevitavelmente, a perda de exemplares de cultivares nacionais, algumas das quais centenárias, devido à sua substituição por variedades exóticas mais adaptadas aos dois novos modos de produção intensiva. Tal prática irá conduzir a uma perda de biodiversidade que afetará todo o ecossistema e favorecerá os processos de degradação como a sobre-exploração dos aquíferos, contaminação do solo por pesticidas e fertilizantes, erosão do solo e alterações da paisagem. A tipicidade dos produtos do olival, provenientes das variedades regionais, ficará igualmente comprometida.

A região de Trás-os-Montes, devido à estrutura minifundiária das explorações olivícolas, é restritiva à implementação de modos de produção intensiva, tendo como resultado a perda da capacidade competitiva nos mercados externos e internos. Deste modo, o uso sustentável deste recurso produtivo só será possível pela exploração de estratégias de diferenciação. As oliveiras centenárias, como referido anteriormente, são uma marca da paisagem associada ao olival tradicional em Trás-os-Montes e a produção de azeites a partir destas oliveiras poderá contribuir para o aumento da viabilidade das explorações olivícolas. A obtenção de produtos com identidade, tipicidade e qualidade contribuirá para que o mercado reconheça os Azeites de Trás-os-Montes como distintos. A manutenção de oliveiras centenárias vai, igualmente, gerar uma multiplicidade de benefícios ambientais pela preservação/aumento de biodiversidade associada a estas cultivares, redução de perda/extinção de cultivares adaptadas ao clima e solo da região, preservação da estrutura e composição da paisagem. Adicionalmente, estas cultivares podem constituir reservas úteis para futuros trabalhos de seleção e melhoramento

genético de cultivares mais resistentes à seca e a outros fatores de stresse biótico e abiótico.

Apesar da sua elevada importância, o património oleícola destas oliveiras centenárias e a sua diversidade genética e fenotípica são totalmente desconhecidos na região de Trás-os-Montes. A valorização económica dos produtos provenientes destas oliveiras centenárias, em modelos de desenvolvimento que privilegiem a sua qualidade e tipificação, só será possível após se ter efetuado a sua identificação e caracterização.

#### **2.4. Importância da certificação varietal**

No mundo encontram-se referenciadas 1275 cultivares de *Olea europaea* L., sendo a sua maioria identificadas em países europeus (Roubos *et al.*, 2010). Em relação a Portugal encontram-se descritas 22 cultivares para a produção dos derivados de oliveira (azeite e azeitonas de mesa), número relativamente baixo quando comparado com outros países europeus como a Itália (538), Espanha (183), França (88) e Grécia (52) (Leitão *et al.*, 1986; Alves, 2007; Ipek *et al.*, 2009; Roubos *et al.*, 2010).

Esta grande diversidade genética de cultivares, resultado da difusão das espécies fora das regiões tradicionais de cultivo, leva ao aparecimento de homónimos (cultivares com o mesmo nome, porém geneticamente diferentes), sinónimos (cultivares com diferentes nomes, mas geneticamente iguais) e, até mesmo, à identificação errada das cultivares (De la Rosa *et al.*, 2002; Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007; Rekik *et al.*, 2008; Rotondi *et al.*, 2011; Zaher *et al.*, 2011; Trujillo *et al.*, 2014). Assim, os erros ocorridos na denominação dos génotipos, o elevado património genético existente e a possibilidade de fecundação cruzada entre cultivares são motivos suficientes para que se proceda à caracterização genética das cultivares de oliveiras existentes em Trás-os-Montes (La Mantia *et al.*, 2006; Cançado *et al.*, 2012). Este aspeto possui elevada importância na atualidade de forma a garantir a segurança, bem como a qualidade e autenticidade dos produtos provenientes do olival. Estes fatores são bastante valorizados pelo consumidor, cada vez mais exigente. Neste âmbito, foi criada a marca de certificação Denominação de Origem Protegida (DOP). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 510/2006, o nome da região que serve para representar um produto agrícola ou género alimentício deve ser originário dessa origem geográfica conhecida, a qualidade ou características do produto agrícola ou género alimentício devem ser unicamente

dessa origem geográfica e a sua produção, transformação e elaboração devem ocorrer na mesma área geográfica [Regulamento (CE) n.º 510/2006].

Em Portugal, no setor do azeite, existem seis DOPs: Azeite de Trás-os-Montes, Azeites da Beira Interior, Azeites do Ribatejo, Azeites do Norte Alentejo, Azeite de Moura e Azeites do Alentejo Interior (Alves, 2007). Para cada azeite DOP são usadas diferentes cultivares. Em particular, no caso da DOP Azeite de Trás-os-Montes são utilizadas as cultivares Verdeal, Madural, Cobrançosa e Negrinha de Freixo (Peres *et al.*, 2011). Pelo simples facto de este azeite possuir mais do que uma cultivar é designado de azeite varietal (Rabiei & Enferadi, 2012). A elevada qualidade e as características únicas (sensação a verde, amargo e picante) do Azeite de Trás-os-Montes faz com que os preços alcancem elevados valores no mercado (Peres *et al.*, 2011). Este facto poderá estimular a prática de adulterações deste azeite utilizando cultivares não permitidas, rotulagem inadequada relativamente à informação sobre a origem geográfica ou à metodologia de produção (Costa *et al.*, 2012). De igual modo, os azeites monovarietais, obtidos apenas por uma cultivar de oliveira (Rabiei & Enferadi, 2012), podem ser sujeitos a adulterações devido ao aumento do seu valor comercial (Peres *et al.*, 2011).

A produção de azeites a partir de oliveiras centenárias é uma prática que começa a surgir na região de Trás-os-Montes. Este produto, de valor acrescido, é elaborado a partir de cultivares que estão frequentemente associadas a práticas e usos ancestrais e, portanto, à riqueza do património cultural. A comercialização deste tipo de produtos que transportam um pouco de história, a paisagem e o saber fazer tradicional, são normalmente muito valorizados economicamente nos mercados e, conseqüentemente, um apetecível alvo de adulterações. Assim sendo, torna-se fundamental assegurar a autenticidade destes azeites. No entanto, a análise química não é suficiente o que leva a um interesse crescente na aplicação de marcadores moleculares (Giménez *et al.*, 2010).

## **2.5. Caracterização de cultivares de oliveira**

*Olea europaea* L. é uma espécie diplóide com 46 cromossomas (Enferadi & Rabiei, 2013). É predominantemente alógama, originando altos níveis de heterozigotia e de polimorfismo de ADN entre cultivares (La Mantia *et al.*, 2006; Roubos *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012).

Devido à elevada diversidade genética tornou-se necessário recorrer a métodos para identificar e caracterizar as diferentes cultivares de oliveira (Alves, 2007). A análise das características morfológicas foi o primeiro método a ser utilizado para discriminar as diferentes cultivares (Díaz *et al.*, 2006; Alves, 2007; Zaher *et al.*, 2011). Posteriormente, e de forma a complementar esta informação, utilizaram-se marcadores moleculares para analisar a diversidade genética, identificar cultivares, determinar as relações genéticas entre si, entre outros (Alves, 2007; Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007; Zaher *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012). De seguida, abordar-se-á cada um dos métodos de forma mais pormenorizada.

### **2.5.1. Caracterização morfológica**

O Conselho Oleícola Internacional (COI) propôs caracteres biométricos para a identificação e caracterização de cultivares, tendo em conta a árvore, a folha, a inflorescência, o fruto e o endocarpo (Cortés & Hernández, 2006; Anónimo, 2008; Saramago, 2009). Estes caracteres organizaram-se de acordo com parâmetros quantitativos e qualitativos (Anónimo, 2008). Em relação ao fruto e ao endocarpo os parâmetros quantitativos avaliados são comprimento, diâmetros (máximo e mínimo) e peso e os qualitativos incluem a forma, simetria, posição do diâmetro transversal máximo, ápice, base, entre outros. Quanto à folha, os parâmetros avaliados incluem o comprimento, largura, forma, curvatura longitudinal do limbo e posição da largura máxima (Adaptado de COI, 1997).

A caracterização morfológica apresenta a vantagem de permitir a identificação das cultivares de forma rápida, económica e de não necessitar de equipamentos sofisticados (Anónimo, 2008; Gomes *et al.*, 2012). Porém, têm alguns inconvenientes uma vez que estes caracteres possuem baixos níveis de polimorfismo (Gomes *et al.*, 2012) e só podem ser estudados na fase adulta da oliveira (Val, 2011; Cançado *et al.*, 2012). Além disso, são também influenciados pelo ambiente, como por exemplo pelo ataque de pragas e doenças, temperatura e disponibilidades de água (Alves, 2007; Val, 2011; Nogueira, 2012).



### 2.5.2. Caracterização genética

A caracterização genética de cultivares de oliveira, descritas até à presente data, é realizada com o auxílio dos marcadores de ADN. Estes marcadores são classificados em marcadores moleculares sem e com recurso à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (Kalia *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012). A primeira classe de marcadores abrange a técnica Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Kalia *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012). A segunda classe inclui as técnicas Amplificação Aleatória de ADN Polimórfico (RAPD, do inglês *Randomly Amplified Polymorphic DNA*), Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Amplificados (AFLP, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*), Região Amplificada de Sequência Caracterizada (SCAR, do inglês *Sequence Characterized Amplified Region*), Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), Sequências Internas Simples Repetidas (ISSR, do inglês *Inter Simple Sequence Repeat*) e Sequências Simples Repetidas (SSR, do inglês *Simple Sequence Repeat*) (Kalia *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012).

A técnica RFLP foi utilizada em estudos filogenéticos (Bracci *et al.*, 2011) e na construção de mapas genéticos em oliveiras (Cançado *et al.*, 2012). Este marcador molecular possui algumas vantagens como elevada reprodutibilidade, permite avaliar um número ilimitado de *loci*, possui natureza codominante e identifica sequências únicas ou com baixo número de cópias sem necessidade do seu conhecimento prévio (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011). Contudo, atualmente, esta técnica não é muito usada pois é complexa e dispendiosa, tem baixo nível de polimorfismo, necessita de grandes quantidades de ADN genómico e requer o uso de material tóxico e/ou radioativo para marcação das sondas (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012).

O marcador molecular RAPD foi aplicado na identificação de cultivares de oliveiras (Bracci *et al.*, 2011), no estudo da diversidade da espécie *Olea europaea* L. (Ben-Ayed *et al.*, 2013), na análise da variabilidade intra-cultivar, em estudos filogenéticos, na construção de mapas genéticos (Bracci *et al.*, 2011) e na autenticidade e rastreabilidade de azeites (Ben-Ayed *et al.*, 2013). Os RAPDs são marcadores de baixo custo e de fácil aplicação, necessitam de reduzida quantidade de ADN, não requerem o conhecimento prévio da sequência e apresentam um polimorfismo

moderado (Cabral, 2008; Bracci *et al.*, 2011; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2012; Ben-Ayed *et al.*, 2013). No entanto, possuem alguns inconvenientes tais como baixa reprodutibilidade, sensibilidade a alterações laboratoriais, detecção frequente de múltiplos *loci*, natureza dominante não permitindo assim a diferenciação entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012).

A técnica AFLP foi utilizada na oliveira para identificar cultivares, construir mapas genéticos, realizar estudos filogenéticos, analisar a variabilidade intra-cultivar (Bracci *et al.*, 2011) e na rastreabilidade e autenticidade de azeites (Ben-Ayed *et al.*, 2013). Os AFLPs possuem elevada reprodutibilidade, são muito polimórficos, possuem elevada resolução de diferenças genéticas, não requerem o conhecimento prévio da sequência e necessitam de pouca quantidade de ADN (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012). Porém, esta técnica possui inconvenientes dado que além de ser dominante, é uma técnica muito complexa e laboriosa (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012).

O marcador SCAR teve uma menor aplicação em oliveira face aos restantes marcadores, tendo sido apenas utilizado na identificação de cultivares e na rastreabilidade de azeites (Bracci *et al.*, 2011). Esta técnica beneficia de vantagens por ser confiável e pouco dispendiosa (Gomes *et al.*, 2012).

O marcador SNP foi utilizado em oliveira com o intuito de identificar cultivares (Bracci *et al.*, 2011) e estudar a diversidade genética (Ben-Ayed *et al.*, 2013). Este marcador tem algumas vantagens uma vez que é geneticamente estável e muito abundante (Consolandi *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2012). No entanto, é uma técnica dispendiosa (Costa *et al.*, 2012) e devido à sua natureza bialélica são pouco informativos quando comparado, por exemplo, com os SSR.

No que concerne ao ISSR, possuem algumas aplicações em oliveira tais como em estudos filogenéticos, detecção da variabilidade intra-cultivar e na rastreabilidade de azeites (Bracci *et al.*, 2011). Este marcador possui elevada reprodutibilidade e grau de polimorfismo, necessita de pequenas quantidades de ADN, é uma técnica robusta e pouco dispendiosa e não requer o conhecimento prévio da sequência (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012). Todavia, apresenta desvantagens por ser uma técnica que é específica para cada espécie e de ter natureza dominante (Cabral, 2008).

Por fim, SSR, também denominado por microssatélite, é um marcador molecular que foi estudado por Morgante e Olivieri no ano 1993 (Bracci *et al.*, 2011; Rabiei &

Enferadi, 2012). A referência a este marcador será feita de uma forma mais pormenorizada, uma vez que foi utilizado no presente trabalho.

Os microssatélites são sequências curtas de nucleótidos (entre 1 e 6 pares de base) que se repetem em *tandem*, isto é, se repetem em um único padrão de nucleótidos, ao longo do genoma de indivíduos eucariotas (Val, 2011). Nas plantas, a unidade de repetição mais abundante é o dinucleótido AT (Kalia *et al.*, 2011). Dependendo do número de nucleótidos, os microssatélites podem ser classificados como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleótidos, sendo exemplos (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (CGT)<sub>n</sub>, (CAGA)<sub>n</sub>, (AAATT)<sub>n</sub>, (CTTTAA)<sub>n</sub>, respetivamente (Kalia *et al.*, 2011). Usualmente, estes marcadores são encontrados em regiões codificantes e não codificantes, apesar de se encontrarem maioritariamente no ADN não codificante (Kalia *et al.*, 2011).

As sequências que flanqueiam os microssatélites geralmente são conservadas nos indivíduos da mesma espécie permitindo a construção de iniciadores oligonucleotídicos (*primers*) que amplificarão, por PCR, as sequências repetidas compreendidas entre as regiões conservadas. Os fragmentos amplificados podem ser separados por eletroforese e observados por fixação em prata, auto-radiografia ou fluorescência (Cabral, 2008; Val, 2011). Na atualidade, a separação dos fragmentos amplificados é feita recorrendo à eletroforese capilar. Nesta técnica, os fragmentos amplificados (microssatélites) na PCR são separados de acordo com o tamanho usando eletroforese e, posteriormente, são detetados com base na fluorescência induzida por laser (Penna, 2010). A deteção por este processo requer a marcação prévia da extremidade 5' do *primer* de orientação direta (*forward*) com um fluoróforo (Alves, 2007).

Este marcador molecular tem sido amplamente utilizado na oliveira para a identificação de cultivares, construção de mapas genéticos, estudos filogenéticos, rastreabilidade de azeites (Bracci *et al.*, 2011), análise da variabilidade intra-cultivar, caracterização dos recursos de germoplasma e diversidade genética (Ben-Ayed *et al.*, 2013). Esta técnica apresenta várias vantagens por ser rápida, robusta e de simples execução. Permite uma vasta cobertura no genoma, é altamente polimórfica (devido à elevada taxa de mutação associada às sequências repetitivas), apresenta grande poder discriminatório, requer reduzidas quantidades de ADN, possui natureza co-dominante, é multi-alélica (identificam vários alelos simultaneamente), apresenta elevada reprodutibilidade (devido às longas sequências dos *primers*) e elevada resolução de diferenças genéticas (Cabral, 2008; Koehmstedt *et al.*, 2010; Roubos *et al.*, 2010; Bracci *et al.*, 2011; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012; Ben-Ayed *et al.*, 2013;). No

entanto, os microssatélites possuem alguns inconvenientes uma vez que é uma técnica bastante dispendiosa, são específicos de espécie para espécie, requerem o conhecimento da sequência e apresenta algumas dificuldades na interpretação dos resultados (Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011).

Devido às suas inúmeras vantagens face aos restantes marcadores moleculares estudados até ao momento, os microssatélites são os marcadores de eleição para a caracterização molecular de espécies de plantas, nomeadamente de *O. europaea* L. (Cipriani *et al.*, 2002; Alves, 2007; Cabral, 2008; Kalia *et al.*, 2011; Cançado *et al.*, 2012).

Alguns estudos indicam que apenas 12 microssatélites são suficientes para distinguir mais de 100 genótipos de *O. europaea* L. (Sarri *et al.*, 2006; Muzzalupo *et al.*, 2008; Val, 2011; Cançado *et al.*, 2012).

# Capítulo 3

## Material e Métodos

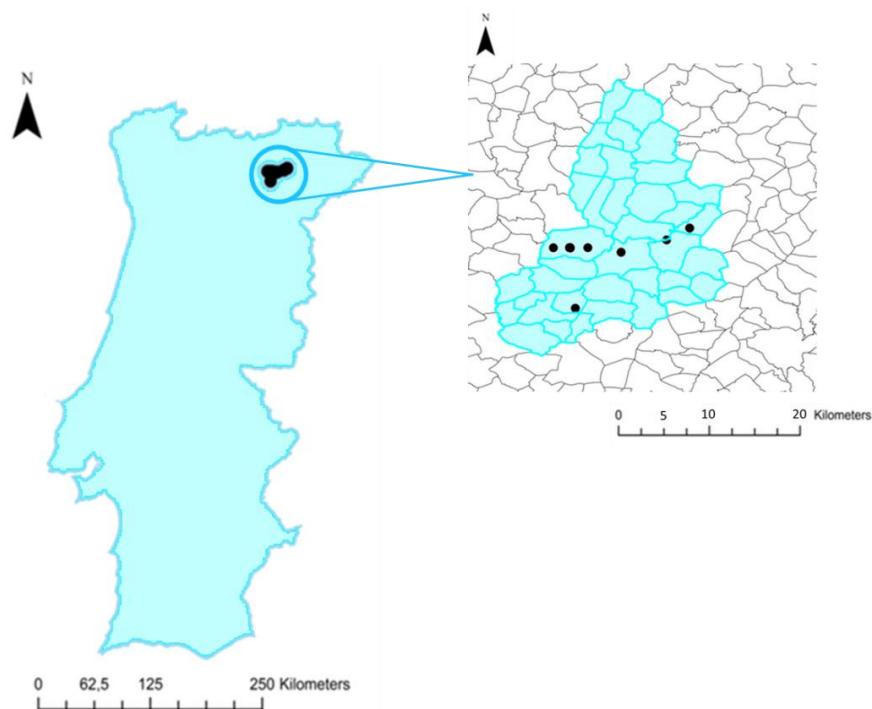




### 3.1. Amostragem

Ramos e frutos de oliveiras tradicionais e de oliveiras centenárias, frequentemente plantadas na região Transmontana, foram colhidos em olivais localizados na região de Mirandela (Figura 3). As amostras de cultivares tradicionais, designadas doravante por oliveiras novas, foram colhidas de 15 árvores, escolhidas aleatoriamente, a 12 de dezembro de 2012. Estas cultivares novas têm uma idade compreendida entre 40 e 80 anos. Por sua vez, as amostras de oliveiras centenárias foram colhidas de 17 árvores, a 28 de outubro de 2013. A localização geográfica das árvores amostradas encontra-se representada na Tabela 1. Em cada árvore colheram-se, aleatoriamente, 10 ramos com menos de 2 anos, localizados à altura de 1,5-2 metros. Da mesma árvore foram colhidos cerca de 50 frutos, à mesma altura.

O material colhido foi colocado em sacos, etiquetado e transportado para o laboratório sob condições refrigeradas. No laboratório, as folhas de cada árvore destinadas à análise morfológica foram destacadas do centro do ramo e armazenadas a 4°C até posterior caracterização, enquanto que as folhas jovens, retiradas da extremidade do ramo, foram maceradas em azoto líquido e, posteriormente, conservadas a -80°C para a caracterização genética por microsatélites. Os frutos foram conservados a -20°C até à sua caracterização morfológica.



**Figura 3-** Mapa de Portugal, com destaque da região de Mirandela e os olivais amostrados (●).

**Tabela 1-** Coordenadas geográficas das oliveiras amostradas.

Oliveiras Novas	Coordenada	Oliveiras Centenárias	Coordenada
N1	41.501897; -7.118308	C1	41.490417; -7.258167
N4	41.501936; -7.118317	C2	41.490117; -7.2579
N5	41.402556; -7.250642	C3	41.490467; -7.2825
N6	41.402558; -7.250736	C4	41.4905; -7.25835
N7	41.402492; -7.250706	C5	41.4906; -7.258425835
N8	41.402419; -7.250669	C6	41.49075; -7.258067
N9	41.483869; -7.184331	C7	41.49085; -7.258317
N10	41.483953; -7.184364	C8	41.4909; -7.258333
N11	41.483964; -7.184381	C9	41.490767; -7.2584
N12	41.483956; -7.184403	C10	41.490833; -7.2586
N13	41.519092; -7.084894	C11	41.490767; -7.2586
N14	41.519103; -7.0849	C12	41.490767; -7.258883
N15	41.519103; -7.084894	C13	41.490817; -7.258917
N16	41.519042; -7.084919	C14	41.490717; -7.258983
N17	41.519022; -7.084939	C15	41.4908; -7.2591
		C16	41.49075; -7.259217
		C18	41.490567; -7.259367

Como podemos constatar na Tabela 1, as oliveiras N2, N3 e C17 estão ausentes, uma vez que foram retiradas deste estudo por apresentarem sintomas de doenças e ataque de pragas.

### 3.2. Caracterização morfológica

Caracterizaram-se morfológicamente as folhas, frutos e endocarpos de cada árvore pela avaliação de diversos parâmetros quantitativos e qualitativos. Foi avaliado em cada árvore um total de 40 frutos, escolhidos de forma aleatória, e os respectivos endocarpos e 40 folhas também escolhidas ao acaso.

Os parâmetros estudados (Anónimo, 2008) encontram-se indicados em seguida.



### 3.2.1. Parâmetros biométricos avaliados no fruto

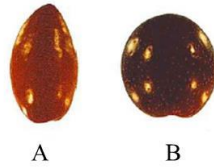
- Comprimento do fruto (cm)
- Diâmetro máximo do fruto (cm)
- Diâmetro mínimo do fruto (cm)
- Peso:
  - Baixo (< 2 g)
  - Médio (2-4 g)
  - Alto (4-6 g)
  - Muito alto (> 6 g)
- Forma - determinada em função da relação entre o comprimento (Comp.) e da largura (Larg.) (Figura 4):
  - Esférica (Comp./Larg. < 1,25)
  - Ovoide (Comp./Larg. = 1,25-1,45)
  - Alongada (Comp./Larg. > 1,45)



**Figura 4-** Forma do fruto: A- Esférica, B- Ovoide, C- Alongada.

Fonte: Anônimo, 2008.

- Simetria:
  - Simétrico
  - Ligeiramente assimétrico
  - Assimétrico
- Posição do diâmetro transversal máximo:
  - Junto à base
  - Central
  - Junto ao ápice
- Ápice (Figura 5):
  - Pontagudo
  - Arredondado

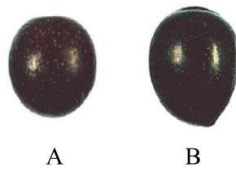


**Figura 5-** Forma do ápice: A- Pontiagudo, B- Arredondado.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Base (Figura 6):

- Truncada
- Arredondada



**Figura 6-** Forma da base: A- Truncada, B- Arredondada.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Mamilo (Figura 7):

- Evidente
- Pouco evidente
- Ausente

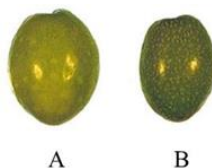


**Figura 7-** Mamilo: A- Evidente, B- Pouco evidente, C- Ausente.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Presença de lentículas (Figura 8):

- Pouco numerosas
- Muito numerosas



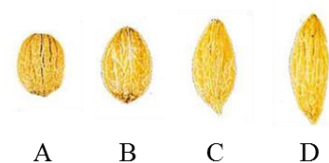
**Figura 8-** Presença de lentículas: A- Pouco numerosas, B- Muito numerosas.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Dimensão das lentículas:
  - Pequenas
  - Grandes
- Cor
  - Negra
  - Outras (especificar)

### 3.2.2. Parâmetros biométricos avaliados no endocarpo

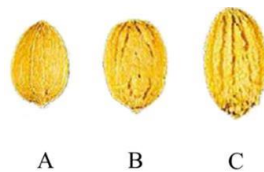
- Comprimento do endocarpo (cm)
- Diâmetro máximo do endocarpo (cm)
- Diâmetro mínimo do endocarpo (cm)
- Peso:
  - Baixo (< 0,3 g)
  - Médio (0,3-0,45 g)
  - Alto (0,45-0,7 g)
  - Muito alto (> 0,7 g)
- Forma (Figura 9):
  - Esférica (Comp./Larg. < 1,4)
  - Ovoide (Comp./Larg. = 1,4-1,8)
  - Elíptica (Comp./Larg. = 1,8-2,2)
  - Alongada (Comp./Larg. > 2,2)



**Figura 9-** Forma do endocarpo: A- Esférica, B- Ovoide, C- Elíptica, D- Alongada.  
 Fonte: Anónimo, 2008.

- Simetria (Posição 1- posição aleatória):
  - Simétrico
  - Ligeiramente assimétrico
  - Assimétrico

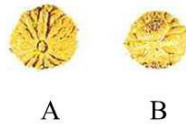
- Simetria (Posição 2- posição aleatória):
  - Simétrico
  - Ligeiramente assimétrico
- Posição do diâmetro transversal máximo:
  - Junto à base
  - Central
  - Junto ao ápice
- Ápice:
  - Pontiagudo
  - Arredondado
- Base:
  - Truncada
  - Pontiaguda
  - Arredondada
- Superfície (Figura 10):
  - Lisa
  - Rugosa
  - Muito rugosa



**Figura 10-** Superfície: A- Lisa, B- Rugosa, C- Muito Rugosa.

Fonte: Anônimo, 2008.

- Número de sulcos fibrovasculares:
  - Reduzido (< 7)
  - Médio (7-10)
  - Elevado (> 10)
- Distribuição dos sulcos fibrovasculares (Figura 11):
  - Uniforme
  - Agrupados na proximidade da sutura



**Figura 11-** Distribuição dos sulcos fibrovasculares: A- Uniforme, B- Agrupados.  
Fonte: Anônimo, 2008.

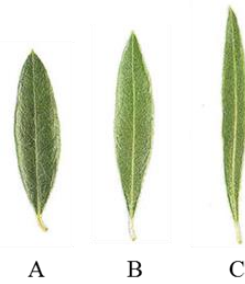
- Extremidade do ápice (Figura 12):
  - Sem mucrão
  - Com mucrão



**Figura 12-** Extremidade do ápice: A- Sem mucrão, B- Com mucrão.  
Fonte: Anônimo, 2008.

### 3.2.3. Parâmetros biométricos avaliados na folha

- Comprimento:
  - Reduzido (< 5 cm)
  - Médio (5-7 cm)
  - Elevado (> 7 cm)
- Largura:
  - Reduzida (< 1 cm)
  - Média (1-1,5 cm)
  - Larga (> 1,5 cm)
- Forma (Figura 13):
  - Elíptica (Comp./Larg. < 4)
  - Elíptica-lanceolada (Comp./Larg. = 4-6)
  - Lanceolada (Comp./Larg. > 6)



**Figura 13-** Forma da folha: A- Elíptica, B- Elíptica-lanceolada, C- Lanceolada.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Curvatura longitudinal do limbo (Figura 14):
  - Epinástica
  - Plana
  - Hiponástica
  - Helicoidal



**Figura 14-** Curvatura longitudinal do limbo: A- Epinástica, B- Plana, C- Hiponástica, D- Helicoidal.

Fonte: Anónimo, 2008.

- Posição da largura máxima:
  - Central
  - Basal
  - Apical

### 3.3. Caracterização genética

#### 3.3.1. Extração de ADN

A extração de ADN de folhas foi efetuada utilizando a metodologia descrita por Sá *et al.* (2011), com algumas modificações. A cerca de 0,1 g de folha, previamente macerada em azoto líquido, foram adicionados 1300 µl do tampão de extração CTAB

[3% (p/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0 e 2M NaCl], pré-aquecido em banho-maria a 65°C. De seguida, adicionou-se 2% (p/v) PVPP e, após mistura da solução em vórtex durante 2 minutos, incubou-se à temperatura ambiente durante 2 minutos. Adicionou-se de seguida 10 µl de proteínase K (20 mg/ml, -20°C) e agitou-se no vórtex durante 1 minuto. Após incubação em banho-maria a 70°C durante 30 minutos, com homogeneização de 5 em 5 minutos, recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo por centrifugação a 10000 rpm (4°C) durante 5 minutos. Adicionou-se de seguida um volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v), e homogeneizou-se a solução por inversão durante 5 minutos. Após incubação no gelo durante 10 minutos, recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo por centrifugação a 10000 rpm (4°C) durante 5 minutos. O ADN no sobrenadante foi precipitado com igual volume de isopropanol (-20°C) por inversão suave e, de seguida, incubado a -20°C durante 1 hora. O ADN foi recolhido por centrifugação a 13000 rpm (4°C), durante 20 minutos, lavado duas vezes com 500 µl etanol 70% (-20°C) e seco à temperatura ambiente. Após a secagem à temperatura ambiente, o ADN foi dissolvido em 40 µl de água ultrapura pré-aquecida a 65°C. Após quantificação, as amostras de ADN foram diluídas para que todas ficassem com uma concentração aproximada de 2,5 µg/ml e armazenadas a -20°C até posterior amplificação.

### **3.3.2. Concentração, pureza e qualidade do ADN extraído/amplificado**

A concentração de ADN foi estimada pela determinação do valor da absorvância a 260 nm num espectrofotómetro *Genesys 10 UV (Thermo Electron Corporation)*, considerando que uma solução com  $A_{260} = 1,0$  corresponde a uma concentração de ADN de 50 µg/ml. A razão  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada como indicador da pureza do ADN, atendendo a que soluções de ADN de elevada pureza exibem razões com valores entre 1,8 e 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

A qualidade do ADN extraído/amplificado foi avaliada por eletroforese efetuada em tinas horizontais (*BioRad*), através de géis de agarose 1% (p/v) em 1x TAE (TAE 10x - 0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 20 mM EDTA pH 8,0) contendo *GelRed (Biotium)* nas proporções indicadas pelo fabricante. As amostras de ADN assim como os marcadores de massa molecular 1 Kb ou 100 pb (DNA *Ladder*, Promega) foram aplicados nos poços dos géis, após adição de 4 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura e 2 µl de

Blue/Orange 6x *Loading Dye* (Promega). A separação eletroforética foi efetuada em tampão 1x TAE, a uma diferença de potencial de 80 V. O ADN foi visualizado por fluorescência, sob radiação ultravioleta, utilizando um transiluminador. O registo da separação eletroforética foi analisado no sistema vídeo Eagle Eye II Still Vídeo System (Stratagene), utilizando o programa Eagle Sight 3.2 (Stratagene).

### **3.3.3. Caracterização genética por microssatélites**

#### **3.3.3.1. Seleção de iniciadores oligonucleotídicos**

Inicialmente foram escolhidos um total de 18 pares de iniciadores oligonucleotídicos (correspondente a 18 *loci*) desenvolvidos previamente em *O. europaea* L. por diversos autores (Tabelas 2 e 3). A síntese destes iniciadores oligonucleotídicos foi efetuada recorrendo aos serviços da Frilabo (Portugal). Foram escolhidos aleatoriamente 3 genótipos de oliveiras centenárias e 3 de oliveiras novas que foram utilizados para testar o grau de polimorfismo destes 18 pares de iniciadores oligonucleotídicos e otimizar as condições de amplificação (em especial da temperatura de emparelhamento). Os resultados obtidos permitiram reduzir para 12 o número de *loci* avaliados (indicados nas Tabelas 2 e 3 com um asterisco), por terem sido os que apresentaram melhor capacidade de discriminação e polimorfismo, facilidade de avaliação do tamanho dos fragmentos amplificados e reprodutibilidade. Do total dos pares de iniciadores oligonucleotídicos testados, apenas um (responsável pela amplificação do *locus* DQ386902) não originou amplificação. Os valores de temperatura de emparelhamento otimizados para cada um dos pares de iniciadores oligonucleotídicos encontram-se indicados nas Tabelas 2 e 3. O tamanho dos fragmentos amplificados nesta primeira análise foi avaliado por eletroforese horizontal, em géis de agarose (NuSieve® 3:1 Agarose) 2% (p/v), utilizando as mesmas condições acima referidas (ponto 3.3.2.). A reprodutibilidade dos resultados obtidos foi avaliada através da repetição da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).



**Tabela 2-** Descrição dos *loci* e os respectivos fluoróforos e temperaturas de emparelhamento.

<i>Locus</i>	Sequência (5' → 3')	Fluoróforo	Temperatura de emparelhamento	Repetições	Referências
EM013	F: AGGGTGGGGATAAAGAAGAAGTCAC R:TCTTTTACCCCATATACCCCGATTCATT	HEX	56,4°C	(CT) <sub>4</sub> (CA) <sub>8</sub>	De la Rosa <i>et al.</i> , 2002
EM090*	F: CATCCGGATTTCTTGCTTTT R: AGCGAATGTAGCTTTGCATGT	HEX	54,8°C	(CA) <sub>10</sub>	De la Rosa <i>et al.</i> , 2002
UDO-011*	F: TGA CTCCCTTTAAACTCATCAGG R: TGC GCATGTAGATGTGAATATG	HEX	52,9°C	(CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>10</sub> (CT) <sub>2</sub> (CA) <sub>2</sub> CT(CA) <sub>2</sub> CT(CA) <sub>9</sub>	Cipriani <i>et al.</i> , 2002
UDO-043*	F: TCGGCTTTACAACCCATTTT R: TGCCAATTATGGGGCTAACT	6-FAM	54,8°C	(GT) <sub>12</sub>	Cipriani <i>et al.</i> , 2002
DCA3*	F: CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R: TGCTTTTGTCGTGTTTGAGATGTTG	6-FAM	50,0°C	(GA) <sub>19</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
DCA5*	F: AACAAATCCCATACGAACTGCC R: CGTGTTGCTGTGAAGAAAATCG	6-FAM	50,0°C	(GA) <sub>15</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
DCA9*	F: AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG R:GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	HEX	54,8°C	(GA) <sub>23</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
DCA14*	F: AATTTTTTAATGCACTATAATTTAC R: TTGAGGTCTCTATATCTCCCAGGGG	HEX	50,0°C	(CA) <sub>18</sub> A <sub>6</sub> (TAA) <sub>7</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
DCA16*	F: TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	6-FAM	50,0°C	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>29</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
DCA18*	F: AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	6-FAM	50,0°C	(CA) <sub>4</sub> CT(CA) <sub>3</sub> (GA) <sub>19</sub>	Sefc <i>et al.</i> , 2000
GAPU103 A	F: TGAATTTAACTTTAAACCCACACA R: GCATCGCTCGATTTTATCC	6-FAM	52,9°C	(TC) <sub>26</sub>	Carriero <i>et al.</i> , 2002

**Tabela 3-** Descrição dos *loci* e os respectivos fluoróforos e temperaturas de emparelhamento (Continuação).

<i>Locus</i>	Sequência (5'→ 3')	Fluoróforo	Temperatura de emparelhamento	Repetições	Referências
GAPU71B*	F: GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA R: ACAACAAATCCGTACGCTTG	6-FAM	58,0°C	GA(AG) <sub>6</sub> (AAG) <sub>8</sub>	Carriero <i>et al.</i> , 2002
GAPU101*	F: CATGAAAGGAGGGGGACATA R: GGCACCTTGTGTGCAGATTG	HEX	58,0°C	(GA) <sub>8</sub> (G) <sub>3</sub> (AG) <sub>3</sub>	Carriero <i>et al.</i> , 2002
IAS-oli23	F: CCCCCATGTTTTTAATTCAATGAAAAATTAAGTGG R: ACCACCACCGTCTGGAAGGGATG	6-FAM	54,8°C	(AG) <sub>18</sub>	Diaz <i>et al.</i> , 2006
IAS-oli26	F: TCGGAGAGTTGCTACAGAACA R: CCCTTCCAAGTCGAGCAATAAA	6-FAM	54,8°C	(GA) <sub>14</sub>	Diaz <i>et al.</i> , 2006
DQ386902	F: TGGACTAACCCATCTTTATGA R: CCTCACATAAACTAAAGAATC	HEX	50,0°C	(CA) <sub>24</sub> (AT) <sub>3</sub> (ATTT) <sub>5</sub>	Sabino Gil <i>et al.</i> , 2006
DQ386904	F: CTATGATGGCTTTTGGGGCG R: TATCAAAGCCATCCAGGGG	HEX	56,4°C	(TTA) <sub>3</sub> T <sub>9</sub> G <sub>4</sub>	Sabino Gil <i>et al.</i> , 2006
DQ386912*	F: AGAGGAAGAGTAATGATGAGATC R: TATGCGACTCTGTGTGTGTTCC	HEX	56,4°C	(CA) <sub>9</sub> (GA) <sub>2</sub>	Sabino Gil <i>et al.</i> , 2006

\* *Loci* selecionados para a caracterização genética das duas populações de oliveiras (novas e centenárias).

Legenda: F- Orientação direta (*Forward*); R- Orientação reversa (*Reverse*)

### 3.3.3.2. Condições de amplificação

A amplificação termocíclica dos 12 *loci* selecionados foi efetuada no termociclador *MyCycler* (BioRad). A mistura de reação, para um volume final de 20  $\mu$ l, continha 2  $\mu$ l de tampão *Flexi Buffer* (5x color less Go Taq, Promega), 2  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (25mM, Promega), 0,2  $\mu$ l de dNTPs (10 mM, Promega), 0,5  $\mu$ l de cada iniciador oligonucleotídicos (10  $\mu$ M, Frilabo), 0,1  $\mu$ l de Go Taq ADN polimerase (5U/ $\mu$ l, Promega) e 4  $\mu$ l de ADN (2,5  $\mu$ g/ml). Os iniciadores oligonucleotídicos *forward* foram marcados com um dos fluoróforos, HEX ou 6-FAM, na extremidade 5' (Tabelas 2 e 3). O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação foi 94°C durante 4 minutos (1 ciclo); 92°C durante 30 segundos, 50-55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto (39 ciclos); e 72°C durante 30 minutos (1 ciclo).

### 3.3.3.3. Análise de fragmentos

Inicialmente confirmou-se a amplificação por eletroforese horizontal, em géis de agarose, utilizando as mesmas condições acima referidas (ponto 3.3.2.). Com base nestes resultados, misturou-se em microtubos entre dois a quatro produtos de PCR relativos à mesma amostra, em concentrações equimolares, de acordo com o fluoróforo e tamanho dos fragmentos amplificados. Fragmentos com tamanhos similares só eram misturados caso tivessem marcados com fluoróforos diferentes. Este procedimento pretende evitar a sobreposição dos picos correspondentes aos alelos amplificados das duas amostras na eletroforese capilar. O tamanho dos alelos amplificados, presentes em cada uma destas misturas, foi determinado por eletroforese capilar com deteção multicolor de fluorescência, recorrendo aos serviços da Stabvida (Portugal). Na eletroforese capilar, os produtos de PCR, marcados com fluoróforos, migram nos capilares e são separados com base no seu tamanho. Para medir o tamanho dos produtos de PCR utilizam-se fragmentos de ADN de tamanho conhecido, marcados com um fluoróforo (padrão interno), sendo estes detetados durante a eletroforese juntamente com os produtos de PCR. A comparação da fluorescência emitida pelos produtos de PCR com o marcador padrão interno (GS500), permitiu determinar o tamanho de cada alelo após a sua separação. Os resultados obtidos, em forma de eletroferogramas, contêm picos correspondentes aos alelos amplificados. Como os indivíduos em estudo são diplóides, no eletroferograma

pode estar representado apenas um pico, caso o indivíduo seja homozigótico (ambos os alelos são dominantes ou recessivos). Caso seja heterozigótico (um alelo dominante e outro recessivo) o eletroferograma apresenta dois picos. A análise por eletroforese capilar permite a detecção de alelos com apenas uma base de diferença.

### **3.3.4. Análise de dados**

#### **3.3.4.1. Morfológica**

Os resultados referentes à análise morfológica dos parâmetros quantitativos dos frutos, endocarpos e folhas são apresentados para cada árvore e para o total da população, sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão e os respectivos valores mínimos e máximos. No que se refere à análise dos parâmetros qualitativos, procedeu-se à determinação da sua percentagem de ocorrência para cada árvore, cujos resultados para o total da população são apresentados sob a forma de média. As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa SPSS, versão 20, e calculadas pelo teste de Tukey, para probabilidades  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  considerando-se, respetivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

A relação fenotípica entre as 32 árvores estudadas (15 oliveiras novas e 17 centenárias) foi avaliada pela construção de 4 dendrogramas, relativos ao fruto, endocarpo, folha e total de órgãos avaliados. Para tal, foram calculadas matrizes de semelhança entre os 32 indivíduos utilizando como medida a distância Euclidiana. A distância Euclidiana avalia a semelhança em termos de distância entre pares de indivíduos, quanto menor for o valor observado, maior a semelhança entre os dois indivíduos. Para a elaboração dos dendrogramas foram utilizados todos os parâmetros morfológicos (quantitativos e qualitativos) avaliados para cada órgão. Porém, devido à natureza qualitativa de alguns dos parâmetros morfológicos, foi necessário proceder previamente à sua codificação para um valor numérico. Os dendrogramas foram produzidos utilizando o método de agrupamento de dados hierárquico aglomerativo Ligação Completa (*complete linkage*) e a medida de similaridade distâncias Euclidianas, recorrendo ao programa *Statistica* 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Com o intuito de reduzir o número de variáveis quantitativas avaliadas nos diferentes órgãos (forma, comprimento, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e peso) a

um número inferior de novas variáveis derivadas da componente principal (fatores), procedeu-se a uma Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando o programa *SPSS* versão 19.0 (SPSS, Inc.). A ACP possibilita também conhecer padrões nos dados colocando-os num espaço multidimensional, usando assim as novas variáveis derivadas como dimensões. Nesta análise, pretende-se averiguar se existem características morfológicas determinantes na delimitação dos grupos de indivíduos que se obtém. O número de fatores a manter no tratamento de dados foi avaliado pelo *Screen Plot*, tendo em conta os *eigenvalues* e a consistência interna através do valor do  $\alpha$  de *Cronbach's* (Rencher, 1995).

### 3.3.4.2. Genética

A genotipagem dos 12 microssatélites foi efetuada usando o programa *GeneMapper* versão 3.7 (Applied Biosystems), sendo que a matriz inicial foi elaborada através deste programa. A matriz obtida foi, posteriormente, convertida para o formato dos programas utilizados, com o auxílio do programa *PGDSpider* versão 2.0.1.2 (Lischer & Excoffier, 2012).

Os programas *GenAlex* versão 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) e *Arlequin* versão 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005) foram utilizados para calcular vários parâmetros genéticos, tais como frequências alélicas, número médio de alelos por *locus* ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), índice de *Shannon* (I), heterozigotia observada ( $H_o$ ), heterozigotia esperada ( $H_e$ ) (Nei, 1987) e número de alelos privados (A privados). Os mesmos programas foram ainda utilizados para estimar a diferenciação genética entre as populações ( $F_{ST}$ ).

Para analisar a estrutura genética foi ainda utilizada uma abordagem *Bayesiana* implementada no programa *Structure* versão 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Os modelos utilizados foram o *admixture model* com as frequências alélicas correlacionadas. Foram efetuadas 20 corridas independentes para cada K (1-6), de forma a verificar se havia consistência entre as corridas. Cada corrida foi efetuada com 750.000 iterações (cadeias MCMC) e com um *burn-in* de 250.000. O K ótimo foi determinado usando o teste de *Evanno*  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2007) implementado no *Structure Harvester* versão 0.6.93 (Earl & Von Holdt, 2012). O algoritmo *Greedy*, implementado no *software Clumpp* versão 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007), foi utilizado para calcular o coeficiente de

similaridade simétrica entre as 20 corridas de cada K, sendo que valores elevados (superiores a 0.90) mostram a consistência entre corridas. A média das 20 corridas fornecidas pelo *Clumpp* foi representada graficamente usando o programa *Distruct* versão 1.1 (Rosenberg, 2004).

A similaridade genética entre os indivíduos estudados (32 árvores) foi avaliada pela construção de dendrogramas. Para tal, construiu-se uma matriz de presença (1) e ausência (0) (matriz binária) com base no tamanho dos alelos amplificados para cada árvore. Para a elaboração do dendrograma foi aplicado o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic*), que utiliza a média aritmética não ponderada, e como medida de semelhança o índice de similaridade *Jaccard*. Esta análise foi efetuada recorrendo ao programa *Past* versão 3 (Hammer *et al.*, 2001).

Para verificar a existência de correlação entre os resultados da análise morfológica com os da genética, em ambas as populações de oliveiras (centenárias e novas), procedeu-se à aplicação do teste de *Mantel* (Mantel, 1967). Para tal, foram construídas matrizes de similaridade dos dados morfológicos de todos os órgãos analisados (fruto, endocarpo e folha) e dos dados moleculares, com base nos índices de similaridade *Bray-Curtis* (Bray & Curtis, 1957) e distâncias Euclidianas. As matrizes obtidas foram correlacionadas utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* (r), com 10000 permutações, no programa *XLSTAT* (Addinsoft, 2008).

# Capítulo 4

## Resultados e Discussão







#### **4.1. Análise morfológica**

##### **4.1.1. Parâmetros biométricos**

##### **4.1.1.1. Parâmetros avaliados no fruto**

Nas Tabelas 4 e 5 estão representados os resultados alusivos à determinação dos parâmetros quantitativos nos frutos de oliveiras novas e centenárias, respetivamente. Em ambas as populações, o peso do fruto foi o caractere morfológico que apresentou um maior coeficiente de variação ( $\geq 15\%$ ), indicando ser este o parâmetro que mais variabilidade apresentou. Nas oliveiras novas e centenárias, o peso do fruto variou entre 1,20 g (árvore N1) e 3,70 g (árvore N9), e entre 2,83 g (árvore C16) e 5,17 g (árvore C3), respetivamente (Tabelas 4 e 5).

Por sua vez, o comprimento do fruto, bem como os diâmetros máximo e mínimo apresentaram coeficientes de variação baixos ( $< 10\%$ ), indicando a existência de uma maior uniformidade destes parâmetros morfológicos ao nível das árvores de cada uma das populações estudadas. O comprimento do fruto variou entre 1,63 cm (árvore N1) e 2,52 cm (árvore N9) na população de oliveiras novas (Tabela 4; Figura 1- Anexo II) e entre 2,18 cm (árvore C12) e 2,61 cm (árvore C11) na população de oliveiras centenárias (Tabela 5; Figura 1- Anexo II). No que concerne aos diâmetros máximos e mínimos, verificou-se que na população de oliveiras novas a árvore N1 apresentou os valores mais baixos (1,10 cm e 0,93 cm para o diâmetro máximo e mínimo, respetivamente) e a árvore N8 os valores mais altos (1,63 cm e 1,36 cm para o diâmetro máximo e mínimo, respetivamente) (Tabela 4; Figura 1- Anexo II). Na população de oliveiras centenárias foi a árvore C16 que apresentou valores de diâmetros máximos e mínimos mais baixos (1,51 cm e 1,36 cm, respetivamente) e a árvore C3 os valores mais altos (1,94 cm e 1,67 cm, respetivamente) (Tabela 5; Figura 1- Anexo II).

As oliveiras centenárias apresentaram, em média, frutos com peso (3,80 g,  $p < 0,001$ ), comprimento (2,32 cm,  $p < 0,01$ ) e diâmetros máximo (1,71 cm,  $p < 0,001$ ) e mínimo (1,51 cm,  $p < 0,001$ ) estatisticamente superior face às oliveiras novas (2,84 g, 2,15 cm, 1,46 cm e 1,21 cm, respetivamente).

**Tabela 4-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos de oliveiras novas. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

Árvore	Comprimento (cm)	Diâmetro Máx. (cm)	Diâmetro Min. (cm)	Peso (g)
<b>N1</b>	1,63 ± 0,12 (1,33 - 1,82)	1,10 ± 0,08 (0,92 - 1,28)	0,93 ± 0,08 (0,78 - 1,14)	1,20 ± 0,21 (0,74 - 1,77)
<b>N4</b>	2,19 ± 0,17 (1,90 - 2,60)	1,38 ± 0,09 (1,17 - 1,58)	1,16 ± 0,07 (1,04 - 1,30)	2,54 ± 0,50 (1,63 - 3,90)
<b>N5</b>	2,35 ± 0,12 (2,07 - 2,69)	1,63 ± 0,08 (1,46 - 1,84)	1,29 ± 0,11 (1,06 - 1,52)	3,37 ± 0,43 (2,35 - 4,29)
<b>N6</b>	2,15 ± 0,15 (1,82 - 2,50)	1,62 ± 0,09 (1,47 - 1,86)	1,28 ± 0,09 (1,08 - 1,47)	3,49 ± 0,55 (2,46 - 5,30)
<b>N7</b>	2,13 ± 0,14 (1,79 - 2,36)	1,48 ± 0,10 (1,27 - 1,67)	1,21 ± 0,08 (1,05 - 1,37)	2,97 ± 0,47 (1,97 - 3,90)
<b>N8</b>	2,14 ± 0,17 (1,75 - 2,47)	1,63 ± 0,13 (1,30 - 1,87)	1,36 ± 0,13 (1,10 - 1,56)	3,35 ± 0,68 (1,91 - 4,44)
<b>N9</b>	2,52 ± 0,25 (1,63 - 2,82)	1,62 ± 0,14 (1,22 - 1,85)	1,32 ± 0,13 (0,99 - 1,53)	3,70 ± 0,77 (1,43 - 4,90)
<b>N10</b>	2,19 ± 0,13 (1,87 - 2,44)	1,49 ± 0,08 (1,26 - 1,60)	1,28 ± 0,07 (1,13 - 1,40)	2,91 ± 0,45 (1,91 - 3,85)
<b>N11</b>	2,17 ± 0,12 (1,91 - 2,51)	1,47 ± 0,08 (1,30 - 1,67)	1,25 ± 0,07 (1,11 - 1,40)	2,81 ± 0,38 (2,05 - 3,86)
<b>N12</b>	2,28 ± 0,13 (1,91 - 2,57)	1,55 ± 0,07 (1,35 - 1,71)	1,31 ± 0,07 (1,18 - 1,48)	3,25 ± 0,45 (1,92 - 4,46)
<b>N13</b>	2,31 ± 0,17 (1,80 - 2,55)	1,51 ± 0,09 (1,29 - 1,78)	1,23 ± 0,05 (1,12 - 1,39)	3,25 ± 0,55 (1,83 - 4,88)
<b>N14</b>	2,04 ± 0,12 (1,71 - 2,28)	1,34 ± 0,09 (1,13 - 1,51)	1,09 ± 0,08 (0,91 - 1,40)	2,34 ± 0,39 (1,48 - 3,12)
<b>N15</b>	2,10 ± 0,10 (1,79 - 2,29)	1,31 ± 0,06 (1,07 - 1,42)	1,11 ± 0,06 (0,93 - 1,24)	2,28 ± 0,25 (1,38 - 2,68)
<b>N16</b>	2,03 ± 0,13 (1,77 - 2,25)	1,40 ± 0,08 (1,22 - 1,59)	1,17 ± 0,06 (1,03 - 1,33)	2,55 ± 0,37 (1,76 - 3,28)
<b>N17</b>	2,10 ± 0,13 (1,84 - 2,37)	1,41 ± 0,08 (1,24 - 1,56)	1,17 ± 0,05 (1,06 - 1,29)	2,58 ± 0,40 (1,78 - 3,58)
<b>Média ± DP</b>	2,15 ± 0,14	1,46 ± 0,09	1,21 ± 0,08	2,84 ± 0,46
<b>CV</b>	0,07	0,06	0,07	0,16

**Tabela 5-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos de oliveiras centenárias. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

Árvore	Comprimento (cm)	Diâmetro Máx. (cm)	Diâmetro Mín. (cm)	Peso (g)
C1	2,23 ± 0,17 (1,90 - 2,53)	1,80 ± 0,09 (1,58 - 1,96)	1,53 ± 0,10 (1,30 - 1,73)	4,03 ± 0,67 (2,59 - 5,28)
C2	2,41 ± 0,16 (2,13 - 2,77)	1,82 ± 0,15 (1,56 - 2,14)	1,57 ± 0,15 (1,34 - 1,99)	4,36 ± 0,95 (2,91 - 6,35)
C3	2,53 ± 0,17 (2,14 - 2,82)	1,94 ± 0,15 (1,68 - 2,19)	1,67 ± 0,13 (1,46 - 1,91)	5,17 ± 1,03 (3,31 - 7,07)
C4	2,30 ± 0,13 (1,96 - 2,62)	1,86 ± 0,09 (1,68 - 2,04)	1,64 ± 0,09 (1,47 - 1,85)	4,41 ± 0,54 (3,24 - 5,90)
C5	2,29 ± 0,08 (2,07 - 2,47)	1,67 ± 0,06 (1,51 - 1,82)	1,44 ± 0,06 (1,32 - 1,55)	3,44 ± 0,31 (2,78 - 4,24)
C6	2,55 ± 0,17 (2,24 - 2,95)	1,91 ± 0,11 (1,68 - 2,16)	1,65 ± 0,10 (1,41 - 1,92)	5,11 ± 0,86 (3,42 - 7,02)
C7	2,31 ± 0,10 (2,11 - 2,52)	1,63 ± 0,07 (1,42 - 1,80)	1,41 ± 0,06 (1,27 - 1,53)	3,41 ± 0,37 (2,66 - 4,21)
C8	2,23 ± 0,17 (1,88 - 2,67)	1,85 ± 0,11 (1,65 - 2,06)	1,65 ± 0,11 (1,43 - 1,94)	4,23 ± 0,74 (2,96 - 5,85)
C9	2,32 ± 0,13 (2,05 - 2,58)	1,62 ± 0,09 (1,47 - 1,86)	1,45 ± 0,10 (1,29 - 1,71)	3,35 ± 0,52 (2,52 - 4,54)
C10	2,33 ± 0,10 (2,17 - 2,51)	1,68 ± 0,08 (1,52 - 1,92)	1,48 ± 0,09 (1,33 - 1,78)	3,61 ± 0,41 (2,91 - 4,76)
C11	2,61 ± 0,19 (2,14 - 3,11)	1,83 ± 0,11 (1,62 - 2,10)	1,65 ± 0,09 (1,40 - 1,88)	4,89 ± 0,86 (3,20 - 7,21)
C12	2,18 ± 0,13 (1,91 - 2,62)	1,57 ± 0,10 (1,40 - 1,76)	1,42 ± 0,09 (1,24 - 1,60)	3,09 ± 0,51 (2,29 - 4,51)
C13	2,21 ± 0,11 (1,91 - 2,48)	1,54 ± 0,07 (1,34 - 1,73)	1,39 ± 0,09 (1,19 - 1,56)	2,91 ± 0,37 (2,05 - 4,00)
C14	2,24 ± 0,12 (2,03 - 2,69)	1,60 ± 0,10 (1,41 - 1,93)	1,39 ± 0,10 (1,21 - 1,69)	3,07 ± 0,52 (2,22 - 5,25)
C15	2,29 ± 0,10 (2,13 - 2,66)	1,67 ± 0,08 (1,52 - 1,88)	1,47 ± 0,08 (1,32 - 1,72)	3,45 ± 0,39 (2,71 - 5,03)
C16	2,21 ± 0,15 (1,84 - 2,43)	1,51 ± 0,09 (1,35 - 1,73)	1,36 ± 0,08 (1,19 - 1,58)	2,83 ± 0,49 (1,97 - 4,03)
C18	2,25 ± 0,11 (2,05 - 2,60)	1,62 ± 0,08 (1,43 - 1,82)	1,44 ± 0,06 (1,34 - 1,67)	3,23 ± 0,44 (2,44 - 4,69)
<b>Média ± DP</b>	2,32 ± 0,13	1,71 ± 0,10	1,51 ± 0,09	3,80 ± 0,59
<b>CV</b>	0,06	0,06	0,06	0,15

Nas Tabelas de 6 a 11 encontram-se os resultados relativos à determinação de alguns parâmetros biométricos avaliados nos frutos de oliveiras novas e centenárias.

A classificação dos frutos nas diferentes formas é feita de acordo com o valor obtido da relação entre o comprimento e o diâmetro máximo apresentado pelo fruto. Quando esta relação é inferior a 1,25, entre 1,25 e 1,45 ou superior a 1,45, o fruto é classificado como tendo forma esférica, ovoide ou alongada, respetivamente. A maioria das oliveiras novas amostradas caracterizavam-se por apresentar frutos de forma alongada (62%) e, em menor número, frutos de forma ovoide (36%) e esférica (1%) (Tabela 6; Figura 2- Anexo II). Pelo contrário, os frutos na população de oliveiras centenárias apresentavam na sua maioria (68%) forma ovoide, seguida pelas formas alongada (18%) e esférica (14%) (Tabela 7; Figura 2- Anexo II).

Os frutos são classificados quanto ao seu peso em quatro grupos: peso baixo (< 2 g), médio (entre 2 g a 4 g), alto (entre 4 g a 6 g) ou muito alto (> 6 g). Verificou-se que na população de oliveiras novas, cerca de 82% dos frutos possuíam um peso médio (Tabela 6; Figura 2- Anexo II). De igual forma, na população de oliveiras centenárias destacam-se os frutos com peso médio, possuindo 66% do total dos frutos (Tabela 7; Figura 2- Anexo II).

Ambas as populações de oliveiras, novas e centenárias, caracterizavam-se por apresentarem, em média, uma maior ocorrência de frutos simétricos (45% e 61%, respetivamente) (Tabelas 6 e 7; Figura 2- Anexo II), com diâmetro transversal máximo central (85% e 95%, respetivamente) (Tabela 8 e 9; Figura 3- Anexo II), ápice (88% e 96%, respetivamente) e base (57% e 87%, respetivamente) arredondadas (Tabelas 8 e 9; Figura 3- Anexo II). No que concerne ao mamilo do fruto, nas oliveiras novas predominam frutos com mamilo ausente (60%) e pouco evidente (27%) (Tabela 8; Figura 3- Anexo II), enquanto que nas centenárias observou-se uma maior ocorrência de frutos com mamilo evidente (42%) e ausente (38%) (Tabela 9; Figura 3- Anexo II). Contudo, estas características não se observaram para todas as árvores pertencentes a cada uma das populações estudadas. Por exemplo, ao nível das oliveiras novas os frutos das árvores N5, N6 e N9 eram, na sua maioria, ligeiramente assimétricos e das árvores N13 e N15 eram assimétricos (Tabela 6). De igual modo, a maioria dos frutos da árvore N9 apresentavam o ápice pontiagudo, enquanto que as árvores N5, N8, N11, N14 e N15 apresentavam a maioria dos frutos com base truncada. Por sua vez, as árvores N4 e N9 apresentavam uma maior ocorrência de frutos com mamilo evidente (Tabela 8). Ao nível das oliveiras centenárias, foram observadas apenas exceções na simetria e no

mamilo dos frutos. As árvores C3 e C6 exibiram uma maior ocorrência de frutos assimétricos e ligeiramente assimétricos, respectivamente (Tabela 7), e as árvores C2 e C6 possuíam uma maior ocorrência de frutos com mamilo pouco evidente (Tabela 9).

A abundância e a dimensão de lentículas (pontuações) na epiderme do fruto variaram entre as duas populações de oliveiras estudadas (Tabelas 10 e 11; Figura 4- Anexo II). A maioria dos frutos das oliveiras novas apresentava, em média, poucas lentículas (76%) e de reduzidas dimensões (89%), à exceção das árvores N5, N8 e N9 que apresentavam numerosas lentículas e N9 que possuía lentículas de grandes dimensões (Tabela 10; Figura 4- Anexo II). Pelo contrário, nas oliveiras centenárias, os frutos tinham na sua maioria lentículas abundantes (61%) e pequenas (68%) (Tabela 11; Figura 4- Anexo II). Algumas árvores desta população foram exceção por apresentarem lentículas pouco numerosas (árvores C1, C3, C4, C6, C8, C9, C11) e de grandes dimensões (árvores C1, C7, C14) (Tabela 11).

No que concerne à cor da epiderme do fruto, as oliveiras novas apresentavam, na generalidade, frutos de cor violácea (51%) e verde + violácea (30%) (Tabela 10; Figura 4- Anexo II). Nesta população, apenas as árvores N1 e N8 e N6 exibiam, maioritariamente, frutos de cor verde e negra, respectivamente (Tabela 10; Figura 4- Anexo II). Na população de oliveiras centenárias observou-se uma maior variabilidade da cor da epiderme do fruto entre as diferentes árvores (Tabela 11; Figura 4- Anexo II). Apesar da maioria das árvores terem apresentado, em média, frutos de cor violácea (30% das amostras), observou-se igualmente árvores que exibiam maioritariamente frutos verdes (árvores C8, C14, C15), verde + violáceo (árvores C13, C16), negro (árvores C2, C3, C6) e verde-roxo (árvores C7, C18) (Tabela 11).

Nogueira (2012) ao caracterizar morfologicamente frutos de cultivares transmontanas (Cobrançosa e Negrinha de Freixo) obteve valores médios de comprimento, diâmetros máximo e mínimo e peso superiores ao observado na população de oliveiras novas, analisadas no presente estudo. Porém, no que diz respeito às oliveiras centenárias, os parâmetros biométricos atrás referidos, com exceção do peso, apresentaram valores superiores aos referidos por Nogueira (2012). Analisando os restantes parâmetros, apenas a posição do diâmetro transversal máximo e o tipo de base de ambas as populações e a forma das cultivares centenárias é que coincidem com o estudo de Nogueira (2012), porém com diferentes percentagens.



**Tabela 6-** Características morfológicas do fruto, em porcentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Forma			Peso				Simetria		
	Esférica	Ovoide	Alongada	Baixo	Médio	Alto	Muito alto	Simétrico	Ligeiramente assimétrico	Assimétrico
<b>N1</b>	0,0%	37,5%	62,5%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%	37,5%	12,5%
<b>N4</b>	0,0%	5,0%	95,0%	15,0%	85,0%	0,0%	0,0%	47,5%	27,5%	25,0%
<b>N5</b>	0,0%	52,5%	47,5%	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	32,5%	47,5%	20,0%
<b>N6</b>	12,5%	80,0%	7,5%	0,0%	82,5%	17,5%	0,0%	35,0%	47,5%	17,5%
<b>N7</b>	0,0%	62,5%	37,5%	5,0%	95,0%	0,0%	0,0%	60,0%	15,0%	25,0%
<b>N8</b>	7,5%	90,0%	2,5%	2,5%	82,5%	15,0%	0,0%	47,5%	42,5%	10,0%
<b>N9</b>	0,0%	15,0%	85,0%	5,0%	55,0%	40,0%	0,0%	27,5%	45,0%	27,5%
<b>N10</b>	0,0%	37,5%	62,5%	2,5%	97,5%	0,0%	0,0%	55,0%	15,0%	30,0%
<b>N11</b>	0,0%	27,5%	72,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	67,5%	20,0%	12,5%
<b>N12</b>	0,0%	32,5%	67,5%	2,5%	92,5%	5,0%	0,0%	50,0%	25,0%	25,0%
<b>N13</b>	0,0%	12,5%	87,5%	2,5%	95,0%	2,5%	0,0%	27,5%	15,0%	57,5%
<b>N14</b>	0,0%	10,0%	90,0%	15,0%	85,0%	0,0%	0,0%	47,5%	30,0%	22,5%
<b>N15</b>	0,0%	5,0%	95,0%	10,0%	90,0%	0,0%	0,0%	35,0%	12,5%	52,5%
<b>N16</b>	0,0%	52,5%	47,5%	12,5%	87,5%	0,0%	0,0%	52,5%	25,0%	22,5%
<b>N17</b>	0,0%	25,0%	75,0%	7,5%	92,5%	0,0%	0,0%	42,5%	40,0%	17,5%
<b>Média</b>	1,33%	36,33%	62,33%	12,00%	82,00%	6,00%	0,00%	45,17%	29,67%	25,17%

**Tabela 7-** Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Forma			Peso			Simetria			
	Esférica	Ovoide	Alongada	Baixo	Médio	Alto	Muito alto	Simétrico	Ligeiramente assimétrico	Assimétrico
<b>C1</b>	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%	47,5%	52,5%	0,0%	60,0%	15,0%	25,0%
<b>C2</b>	12,5%	85,0%	2,5%	0,0%	35,0%	60,0%	5,0%	47,5%	22,5%	30,0%
<b>C3</b>	15,0%	80,0%	5,0%	0,0%	17,5%	60,0%	22,5%	27,5%	27,5%	45,0%
<b>C4</b>	62,5%	37,5%	0,0%	0,0%	20,0%	80,0%	0,0%	67,5%	17,5%	15,0%
<b>C5</b>	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	52,5%	17,5%	30,0%
<b>C6</b>	12,5%	82,5%	5,0%	0,0%	7,5%	75,0%	17,5%	32,5%	47,5%	20,0%
<b>C7</b>	0,0%	75,0%	25,0%	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	80,0%	7,5%	12,5%
<b>C8</b>	77,5%	22,5%	0,0%	0,0%	47,5%	52,5%	0,0%	70,0%	12,5%	17,5%
<b>C9</b>	0,0%	52,5%	47,5%	0,0%	85,0%	15,0%	0,0%	65,0%	17,5%	17,5%
<b>C10</b>	0,0%	87,5%	12,5%	0,0%	80,0%	20,0%	0,0%	70,0%	12,5%	17,5%
<b>C11</b>	0,0%	72,5%	27,5%	0,0%	15,0%	75,0%	10,0%	57,5%	7,5%	35,0%
<b>C12</b>	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	87,5%	10,0%	2,5%
<b>C13</b>	0,0%	52,5%	47,5%	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	82,5%	5,0%	12,5%
<b>C14</b>	2,5%	77,5%	20,0%	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	50,0%	15,0%	35,0%
<b>C15</b>	2,5%	87,5%	10,0%	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	57,5%	17,5%	25,0%
<b>C16</b>	0,0%	35,0%	65,0%	2,5%	95,0%	2,5%	0,0%	60,0%	17,5%	22,5%
<b>C18</b>	0,0%	87,5%	12,5%	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	70,0%	15,0%	15,0%
<b>Média</b>	14,41%	67,94%	17,65%	0,15%	66,03%	30,59%	3,24%	61,03%	16,76%	22,21%



**Tabela 8-** Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Posição do diâmetro transversal máximo			Ápice		Base		Mamilo		
	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Arredondada	Evidente	Pouco Evidente	Ausente
<b>N1</b>	7,5%	77,5%	15,0%	22,5%	77,5%	40,0%	60,0%	5,0%	52,5%	42,5%
<b>N4</b>	0,0%	85,0%	15,0%	15,0%	85,0%	35,0%	65,0%	50,0%	42,5%	7,5%
<b>N5</b>	22,5%	65,0%	12,5%	40,0%	60,0%	60,0%	40,0%	12,5%	27,5%	60,0%
<b>N6</b>	30,0%	70,0%	0,0%	22,5%	77,5%	25,0%	75,0%	2,5%	20,0%	77,5%
<b>N7</b>	2,5%	95,0%	2,5%	0,0%	100,0%	27,5%	72,5%	5,0%	12,5%	82,5%
<b>N8</b>	2,5%	60,0%	37,5%	10,0%	90,0%	52,5%	47,5%	17,5%	45,0%	37,5%
<b>N9</b>	10,0%	62,5%	27,5%	67,5%	32,5%	47,5%	52,5%	47,5%	35,0%	17,5%
<b>N10</b>	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	100,0%	37,5%	62,5%	0,0%	17,5%	82,5%
<b>N11</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	65,0%	35,0%	0,0%	15,0%	85,0%
<b>N12</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	30,0%	70,0%	0,0%	12,5%	87,5%
<b>N13</b>	0,0%	82,5%	17,5%	0,0%	100,0%	22,5%	77,5%	12,5%	30,0%	57,5%
<b>N14</b>	0,0%	80,0%	20,0%	5,0%	95,5%	60,0%	40,0%	7,5%	27,5%	65,0%
<b>N15</b>	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	100,0%	77,5%	22,5%	40,0%	45,0%	15,0%
<b>N16</b>	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	100,0%	35,0%	65,0%	0,0%	7,5%	92,5%
<b>N17</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	25,0%	75,0%	0,0%	17,5%	82,5%
<b>Média</b>	5,00%	84,50%	10,50%	12,17%	87,87%	42,67%	57,33%	13,33%	27,17%	59,50%

**Tabela 9-** Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Posição do diâmetro transversal máximo			Ápice		Base		Mamilo		
	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Arredondada	Evidente	Pouco Evidente	Ausente
<b>C1</b>	2,5%	97,5%	0,0%	0,0%	100,0%	45,0%	55,0%	2,5%	30,0%	67,5%
<b>C2</b>	7,5%	92,5%	0,0%	0,0%	100,0%	5,0%	95,0%	25,0%	40,0%	35,0%
<b>C3</b>	5,0%	95,0%	0,0%	10,0%	90,0%	25,0%	75,0%	60,0%	25,0%	15,0%
<b>C4</b>	5,0%	95,0%	0,0%	0,0%	100,0%	25,0%	75,0%	20,0%	22,5%	57,5%
<b>C5</b>	0,0%	92,5%	7,5%	0,0%	100,0%	25,0%	75,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C6</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	20,0%	80,0%	37,5%	40,0%	22,5%
<b>C7</b>	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	82,5%	17,5%	0,0%
<b>C8</b>	12,5%	87,5%	0,0%	0,0%	100,0%	20,0%	80,0%	5,0%	20,0%	75,0%
<b>C9</b>	2,5%	95,0%	2,5%	25,0%	75,0%	0,0%	100,0%	37,5%	37,5%	25,0%
<b>C10</b>	0,0%	87,5%	12,5%	2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	97,5%	2,5%	0,0%
<b>C11</b>	0,0%	100,0%	0,0%	17,5%	82,5%	20,0%	80,0%	17,5%	40,0%	42,5%
<b>C12</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	5,0%	95,0%	0,0%	2,5%	97,5%
<b>C13</b>	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	100,0%	12,5%	87,5%	7,5%	7,5%	85,0%
<b>C14</b>	2,5%	95,0%	2,5%	2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	85,0%	12,5%	2,5%
<b>C15</b>	0,0%	100,0%	0,0%	2,5%	97,5%	0,0%	100,0%	77,5%	17,5%	5,0%
<b>C16</b>	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>C18</b>	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	100,0%	7,5%	92,5%	52,5%	27,5%	20,0%
<b>Média</b>	2,21%	95,00%	2,79%	3,53%	96,47%	12,65%	87,35%	41,62%	20,15%	38,24%

**Tabela 10-** Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Presença de lentículas		Dimensão das lentículas		Cor				
	Pouco numerosas	Muito numerosas	Pequenas	Grandes	Negra	Verde	Verde + Violácea	Violácea	Verde-roxa
<b>N1</b>	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	65,0%	35,0%	0,0%	0,0%
<b>N4</b>	85,0%	15,0%	97,5%	2,5%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N5</b>	22,5%	77,5%	95,5%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N6</b>	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	92,5%	7,5%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>N7</b>	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	17,5%	82,5%	0,0%
<b>N8</b>	40,0%	60,0%	70,0%	30,0%	27,5%	72,5%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>N9</b>	25,0%	75,0%	47,5%	52,5%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N10</b>	52,5%	47,5%	90,0%	10,0%	0,0%	2,5%	0,0%	97,5%	0,0%
<b>N11</b>	62,5%	37,5%	70,0%	30,0%	0,0%	5,0%	95,0%	0,0%	0,0%
<b>N12</b>	100,0%	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	2,5%	97,5%	0,0%	0,0%
<b>N13</b>	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%	90,0%	0,0%
<b>N14</b>	80,0%	20,0%	95,0%	5,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N15</b>	80,0%	20,0%	70,0%	30,0%	0,0%	2,5%	97,5%	0,0%	0,0%
<b>N16</b>	95,0%	5,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N17</b>	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>Média</b>	76,17%	23,83%	88,87%	11,17%	8,00%	10,50%	30,17%	51,33%	0,00%

**Tabela 11-** Características morfológicas do fruto, em porcentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Presença de lentículas		Dimensão das lentículas		Cor				
	Pouco numerosas	Muito numerosas	Pequenas	Grandes	Negra	Verde	Verde + violácea	Violácea	Verde- roxa
<b>C1</b>	55,0%	45,0%	32,5%	67,5%	2,5%	40,0%	10,0%	47,5%	0,0%
<b>C2</b>	47,5%	52,5%	57,5%	42,5%	72,5%	10,0%	10,0%	7,5%	0,0%
<b>C3</b>	65,0%	35,0%	87,5%	12,5%	80,0%	0,0%	5,0%	15,0%	0,0%
<b>C4</b>	90,0%	10,0%	65,0%	35,0%	0,0%	35,0%	12,5%	52,5%	0,0%
<b>C5</b>	2,5%	97,5%	50,0%	50,0%	0,0%	15,0%	7,5%	77,5%	0,0%
<b>C6</b>	62,5%	37,5%	82,5%	17,5%	90,0%	0,0%	2,5%	7,5%	0,0%
<b>C7</b>	12,5%	87,5%	25,0%	75,0%	0,0%	42,5%	0,0%	0,0%	57,5%
<b>C8</b>	65,0%	35,0%	90,0%	10,0%	0,0%	52,5%	15,0%	32,5%	0,0%
<b>C9</b>	92,5%	7,5%	85,0%	15,0%	5,0%	7,5%	42,5%	45,0%	0,0%
<b>C10</b>	7,5%	92,5%	57,5%	42,5%	0,0%	35,0%	2,5%	60,0%	2,5%
<b>C11</b>	72,5%	27,5%	77,5%	22,5%	0,0%	17,5%	2,5%	80,0%	0,0%
<b>C12</b>	35,0%	65,0%	82,5%	17,5%	20,0%	0,0%	40,0%	40,0%	0,0%
<b>C13</b>	5,0%	95,0%	92,5%	7,5%	0,0%	0,0%	57,5%	42,5%	0,0%
<b>C14</b>	2,5%	97,5%	47,5%	52,5%	0,0%	45,0%	27,5%	0,0%	27,5%
<b>C15</b>	7,5%	92,5%	65,0%	35,0%	0,0%	40,0%	25,0%	0,0%	35,0%
<b>C16</b>	35,0%	65,0%	100,0%	0,0%	42,5%	0,0%	57,5%	0,0%	0,0%
<b>C18</b>	2,5%	97,5%	62,5%	37,5%	0,0%	35,0%	20,0%	0,0%	45,0%
<b>Média</b>	38,82%	61,18%	68,24%	31,76%	18,38%	22,06%	19,85%	29,85%	9,85%

#### 4.1.1.2. Parâmetros avaliados no endocarpo

As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados alusivos à determinação dos parâmetros quantitativos nos endocarpos de oliveiras novas e centenárias, respetivamente. De entre os caracteres quantitativos avaliados, o peso do endocarpo foi o que apresentou um maior coeficiente de variação ( $\geq 17\%$ ), indicando ser este o parâmetro que mais variabilidade apresentou em cada uma das populações de oliveiras. O peso médio deste caracter variou entre 0,29 g (árvore N1) e 0,72 g (árvore N13) nas oliveiras novas, e entre 0,53 g (árvore C16) e 1,02 g (árvore C6) nas oliveiras centenárias (Tabelas 12 e 13).

O comprimento e os diâmetros máximos e mínimos do endocarpo apresentaram coeficientes de variação inferiores a 10%, indicando a existência de uma maior uniformidade destes parâmetros morfológicos ao nível das árvores de cada uma das populações estudadas. O comprimento médio do endocarpo variou entre 1,34 cm (árvore N1) e 1,93 cm (árvore N9) na população de oliveiras novas (Tabela 12; Figura 5- Anexo II) e entre 1,45 cm (árvore C8) e 1,77 cm (árvore C11) na população de oliveiras centenárias (Tabela 13; Figura 5- Anexo II). Os valores médios de diâmetros máximo e mínimo do endocarpo apresentaram, na população de oliveiras novas, valores mínimos na oliveira N1 (0,62 cm e 0,50 cm, respetivamente) e valores máximos na oliveira N6 (0,84 cm e 0,69 cm, respetivamente). À semelhança da árvore N6 também a N8 apresentou um diâmetro mínimo médio, no valor de 0,69 cm (Tabela 12; Figura 5- Anexo II). Na população de oliveiras centenárias foi a árvore C6 que apresentou valores de diâmetros máximo e mínimo mais altos (0,98 cm e 0,81 cm, respetivamente). Os valores mais baixos foram registados na árvore C16 (0,76 cm) para o diâmetro máximo e na árvore C13 (0,62 cm) para o diâmetro mínimo (Tabela 13; Figura 5- Anexo II).

As oliveiras centenárias apresentaram, em média, endocarpos com peso (0,73 g,  $p < 0,001$ ) e com diâmetros máximo (0,86 cm,  $p < 0,001$ ) e mínimo (0,70 cm,  $p < 0,001$ ) estatisticamente superior face às oliveiras novas (0,59 g, 0,77 cm e 0,61 cm, respetivamente). Por sua vez, o valor médio do comprimento do endocarpo não diferiu estatisticamente nas duas populações de oliveiras (1,68 cm e 1,65 cm nas oliveiras novas e centenárias, respetivamente).

**Tabela 12-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nos endocarpos de oliveiras novas. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

Árvore	Comprimento (cm)	Diâmetro Máx. (cm)	Diâmetro Min. (cm)	Peso (g)
N1	1,34 ± 0,11 (1,12 - 1,50)	0,62 ± 0,05 (0,51 - 0,72)	0,50 ± 0,04 (0,43 - 0,62)	0,29 ± 0,06 (0,16 - 0,40)
N4	1,82 ± 0,18 (1,50 - 2,24)	0,75 ± 0,07 (0,55 - 0,90)	0,58 ± 0,06 (0,44 - 0,71)	0,58 ± 0,12 (0,26 - 0,88)
N5	1,73 ± 0,11 (1,51 - 1,93)	0,77 ± 0,04 (0,66 - 0,85)	0,63 ± 0,05 (0,51 - 0,71)	0,60 ± 0,07 (0,36 - 0,76)
N6	1,56 ± 0,14 (1,20 - 1,88)	0,84 ± 0,05 (0,73 - 1,04)	0,69 ± 0,05 (0,61 - 0,82)	0,67 ± 0,12 (0,45 - 1,03)
N7	1,63 ± 0,12 (1,33 - 1,79)	0,74 ± 0,05 (0,59 - 0,81)	0,58 ± 0,05 (0,43 - 0,67)	0,52 ± 0,09 (0,29 - 0,68)
N8	1,53 ± 0,16 (1,14 - 1,85)	0,83 ± 0,08 (0,60 - 0,98)	0,69 ± 0,06 (0,54 - 0,78)	0,68 ± 0,16 (0,26 - 0,98)
N9	1,93 ± 0,23 (1,10 - 2,22)	0,78 ± 0,08 (0,50 - 0,95)	0,58 ± 0,07 (0,36 - 0,71)	0,70 ± 0,17 (0,15 - 1,04)
N10	1,71 ± 0,11 (1,44 - 1,90)	0,79 ± 0,06 (0,66 - 0,93)	0,61 ± 0,04 (0,52 - 0,71)	0,63 ± 0,11 (0,38 - 0,85)
N11	1,71 ± 0,12 (1,44 - 2,01)	0,74 ± 0,05 (0,67 - 0,90)	0,58 ± 0,05 (0,48 - 0,66)	0,55 ± 0,09 (0,41 - 0,86)
N12	1,74 ± 0,15 (1,29 - 2,07)	0,77 ± 0,04 (0,62 - 0,87)	0,62 ± 0,05 (0,52 - 0,71)	0,61 ± 0,10 (0,32 - 0,92)
N13	1,82 ± 0,16 (1,35 - 2,04)	0,82 ± 0,07 (0,60 - 0,95)	0,61 ± 0,05 (0,48 - 0,69)	0,72 ± 0,14 (0,29 - 1,07)
N14	1,65 ± 0,12 (1,30 - 1,91)	0,74 ± 0,05 (0,59 - 0,84)	0,61 ± 0,04 (0,47 - 0,68)	0,53 ± 0,09 (0,30 - 0,71)
N15	1,81 ± 0,09 (1,63 - 2,00)	0,81 ± 0,03 (0,73 - 0,87)	0,63 ± 0,03 (0,54 - 0,70)	0,66 ± 0,06 (0,44 - 0,76)
N16	1,61 ± 0,12 (1,33 - 1,83)	0,75 ± 0,04 (0,63 - 0,84)	0,58 ± 0,04 (0,49 - 0,66)	0,52 ± 0,08 (0,28 - 0,72)
N17	1,70 ± 0,12 (1,46 - 2,02)	0,75 ± 0,05 (0,61 - 0,83)	0,59 ± 0,03 (0,50 - 0,66)	0,57 ± 0,09 (0,34 - 0,81)
<b>Média ± DP</b>	1,68 ± 0,14	0,77 ± 0,05	0,61 ± 0,05	0,59 ± 0,10
<b>CV</b>	0,08	0,07	0,08	0,18

**Tabela 13-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nos endocarpos de oliveiras centenárias. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

Árvore	Comprimento (cm)	Diâmetro Máx. (cm)	Diâmetro Min. (cm)	Peso (g)
C1	1,51 ± 0,16 (1,17 - 1,78)	0,89 ± 0,07 (0,73 - 1,00)	0,72 ± 0,06 (0,56 - 0,82)	0,77 ± 0,18 (0,38 - 1,03)
C2	1,65 ± 0,10 (1,42 - 1,85)	0,93 ± 0,06 (0,77 - 1,06)	0,71 ± 0,05 (0,58 - 0,80)	0,77 ± 0,12 (0,51 - 1,01)
C3	1,64 ± 0,15 (1,31 - 1,98)	0,94 ± 0,08 (0,77 - 1,09)	0,74 ± 0,06 (0,63 - 0,89)	0,88 ± 0,20 (0,50 - 1,46)
C4	1,55 ± 0,11 (1,31 - 1,82)	0,93 ± 0,05 (0,77 - 1,04)	0,78 ± 0,05 (0,68 - 0,89)	0,84 ± 0,14 (0,49 - 1,17)
C5	1,66 ± 0,09 (1,43 - 1,88)	0,85 ± 0,03 (0,78 - 0,93)	0,66 ± 0,04 (0,56 - 0,76)	0,71 ± 0,07 (0,55 - 0,86)
C6	1,76 ± 0,14 (1,52 - 2,15)	0,98 ± 0,06 (0,84 - 1,10)	0,81 ± 0,05 (0,68 - 0,90)	1,02 ± 0,16 (0,66 - 1,36)
C7	1,73 ± 0,10 (1,53 - 2,04)	0,85 ± 0,04 (0,76 - 0,93)	0,67 ± 0,03 (0,60 - 0,73)	0,76 ± 0,08 (0,54 - 0,93)
C8	1,45 ± 0,14 (1,13 - 1,70)	0,90 ± 0,09 (0,72 - 1,06)	0,77 ± 0,07 (0,64 - 0,93)	0,74 ± 0,19 (0,39 - 1,03)
C9	1,67 ± 0,10 (1,49 - 1,89)	0,79 ± 0,04 (0,69 - 0,89)	0,66 ± 0,04 (0,57 - 0,78)	0,66 ± 0,10 (0,49 - 0,84)
C10	1,69 ± 0,07 (1,53 - 1,82)	0,85 ± 0,04 (0,76 - 0,94)	0,68 ± 0,04 (0,61 - 0,83)	0,67 ± 0,08 (0,51 - 0,84)
C11	1,77 ± 0,18 (1,38 - 2,30)	0,82 ± 0,06 (0,71 - 0,98)	0,71 ± 0,04 (0,64 - 0,80)	0,73 ± 0,17 (0,50 - 1,21)
C12	1,63 ± 0,13 (1,37 - 1,97)	0,78 ± 0,06 (0,69 - 0,92)	0,65 ± 0,05 (0,59 - 0,79)	0,57 ± 0,12 (0,41 - 0,92)
C13	1,62 ± 0,13 (1,30 - 1,84)	0,77 ± 0,04 (0,65 - 0,87)	0,62 ± 0,05 (0,53 - 0,73)	0,54 ± 0,08 (0,34 - 0,78)
C14	1,71 ± 0,13 (1,42 - 2,09)	0,87 ± 0,05 (0,78 - 1,08)	0,70 ± 0,05 (0,63 - 0,87)	0,74 ± 0,11 (0,57 - 1,25)
C15	1,68 ± 0,10 (1,46 - 1,96)	0,85 ± 0,05 (0,69 - 0,99)	0,70 ± 0,04 (0,62 - 0,85)	0,72 ± 0,09 (0,56 - 1,08)
C16	1,65 ± 0,14 (1,43 - 1,88)	0,76 ± 0,06 (0,69 - 0,92)	0,63 ± 0,05 (0,52 - 0,72)	0,53 ± 0,11 (0,37 - 0,79)
C18	1,70 ± 0,12 (1,49 - 2,05)	0,85 ± 0,05 (0,77 - 1,02)	0,70 ± 0,04 (0,61 - 0,84)	0,73 ± 0,11 (0,53 - 1,16)
<b>Média ± DP</b>	1,65 ± 0,12	0,86 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,73 ± 0,12
<b>CV</b>	0,07	0,06	0,07	0,17

Nas Tabelas de 14 a 19 estão representados os resultados relativos à determinação de alguns parâmetros biométricos avaliados nos endocarpos de oliveiras novas e centenárias.

A forma do endocarpo pode ser esférica, ovoide, elíptica ou alongada, caso a relação entre o comprimento e diâmetro máximo seja menor que 1,4 cm, entre 1,4 cm e 1,8 cm, entre 1,8 cm e 2,2 cm ou maior que 2,2 cm, respectivamente. Na população de oliveiras novas, predominavam endocarpos de forma alongada (53%) e elíptica (42%) (Tabela 14; Figura 6- Anexo II). Pelo contrário, na população de oliveiras centenárias a maioria dos endocarpos apresentavam forma elíptica (61%), com exceção das árvores C1, C2, C3, C4 e C8 com endocarpos maioritariamente de forma ovoide (Tabela 15; Figura 6- Anexo II).

O peso do endocarpo pode variar entre baixo, médio, alto e muito alto, se apresentar valores menores que 0,3 g, entre 0,3 g e 0,45 g, entre 0,45 g e 0,7 g ou maior que 0,7 g, respectivamente. Os resultados obtidos ao nível das oliveiras novas indicam que a maioria apresentava endocarpos com peso alto (64%) a muito alto (21%), à exceção da árvore N1 cujos endocarpos eram na sua maioria de peso baixo/médio (Tabela 14; Figura 6- Anexo II). Na população de oliveiras centenárias, os endocarpos eram maioritariamente de peso muito alto (54%) a alto (42%) (Tabela 15; Figura 6- Anexo II).

No que concerne à simetria do endocarpo ambas as populações de oliveiras, novas e centenárias, caracterizavam-se por apresentarem em média, na posição 1, uma maior ocorrência de endocarpos simétricos (50% e 61%, respectivamente) e na posição 2 endocarpos ligeiramente assimétricos (68% e 71%, respectivamente) (Tabelas 14 e 15; Figura 6- Anexo II).

Observou-se igualmente nas duas populações de oliveiras, novas e centenárias, uma maior incidência de endocarpos com diâmetro transversal máximo central (71% e 91%, respectivamente), ápice arredondado (67% e 85%, respectivamente), base pontiaguda (48% e 49%, respectivamente) e superfície rugosa (76% e 91%, respectivamente) (Tabelas 16 e 17; Figura 7- Anexo II). Na população de oliveiras novas, a percentagem de endocarpos com base pontiaguda era idêntica à de endocarpos com base truncada (Tabela 16; Figura 7- Anexo II). Porém, estas características não se observaram ao nível de todas as árvores de cada uma das populações, havendo assim algumas exceções. Por exemplo, nas oliveiras novas, os endocarpos da árvore N9 apresentavam na sua maioria uma posição do diâmetro transversal máximo junto ao ápice. Grande parte dos



endocarpos das árvores N1, N5, N8 e N9 possuíam o ápice pontiagudo. Enquanto que as árvores N13, N15 e N17 tinham, maioritariamente, endocarpos com superfície lisa (Tabela 16). No que diz respeito às oliveiras centenárias, as árvores C14 e C15 apresentavam, na sua maioria, endocarpos com o ápice pontiagudo e as árvores C1, C2, C3, C4, C5 e C6 possuíam endocarpos com a base truncada. A árvore C9 apresenta a totalidade dos endocarpos com superfície lisa (Tabela 17).

O número de sulcos fibrovasculares presente na superfície dos endocarpos podem surgir em número reduzido ( $< 7$ ), médio (entre 7 e 10) e elevado ( $> 10$ ). Verificou-se que, na população de oliveiras novas, a maioria dos endocarpos apresentavam sulcos fibrovasculares em número reduzido e com uma distribuição uniforme (74% e 81%, respetivamente), com exceção das árvores N6 e N8 que tinham um número de sulcos médio e as N1, N4 e N9 que possuíam uma distribuição dos sulcos agrupada (Tabela 18; Figura 8- Anexo II). Contrariamente, a população de oliveiras centenárias detinha em média 61% de endocarpos com um número de sulcos fibrovasculares médio, com a exceção das árvores C1, C4, C5, C7 e C9 que apresentavam, na sua maioria, um reduzido número de sulcos (Tabela 19; Figura 8- Anexo II). Nesta população, a maioria dos endocarpos apresentavam os sulcos com distribuição uniforme (80%), com exceção das árvores C1 e C4 que possuíam uma distribuição agrupada (Tabela 19; Figura 8- Anexo II).

No que concerne à extremidade do ápice, nas populações de oliveiras novas e centenárias, destacavam-se os endocarpos com extremidade com mucrão (89% e 82%, respetivamente) (Tabelas 18 e 19; Figura 8- Anexo II).

Face à população de oliveiras novas analisadas no presente estudo, Nogueira (2012) indica valores médios de comprimento e diâmetro mínimo do endocarpo inferiores, mas valores médios de diâmetro máximo e peso superiores, nas cultivares transmontanãs Cobrançosa e Negrinha de Freixo. Pelo contrário, todos os parâmetros biométricos avaliados no endocarpo da população de oliveiras centenárias apresentaram valores superiores aos reportados por Nogueira (2012). Os parâmetros simetria (posição 1 e 2), posição do diâmetro transversal máximo, o tipo de base, a superfície, a distribuição dos sulcos fibrovasculares e a extremidade do ápice de ambas as populações e o número de sulcos fibrovasculares das cultivares centenárias coincidem com o estudo de Nogueira (2012), porém com diferentes percentagens.



**Tabela 14-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Forma				Peso			Simetria (Posição 1)			Simetria (Posição 2)		
	Esférica	Ovoide	Elíptica	Alongada	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto	Simétrico	Ligeiramente assimétrico	Assimétrico	Simétrico	Ligeiramente assimétrico
<b>N1</b>	0,0%	0,0%	62,5%	37,5%	57,5%	42,5%	0,0%	0,0%	37,5%	22,5%	40,0%	15,0%	85,0%
<b>N4</b>	0,0%	0,0%	12,5%	87,5%	2,5%	10,0%	77,5%	10,0%	57,5%	15,0%	27,5%	10,0%	90,0%
<b>N5</b>	0,0%	0,0%	32,5%	67,5%	0,0%	5,0%	92,5%	2,5%	37,5%	42,5%	20,0%	45,0%	55,0%
<b>N6</b>	0,0%	37,5%	60,0%	2,5%	0,0%	2,5%	62,5%	35,0%	40,0%	27,5%	32,5%	22,5%	77,5%
<b>N7</b>	0,0%	0,0%	47,5%	52,5%	2,5%	12,5%	85,0%	0,0%	42,5%	12,5%	45,0%	47,5%	52,5%
<b>N8</b>	0,0%	45,0%	55,0%	0,0%	2,5%	10,0%	32,5%	55,0%	42,5%	37,5%	20,0%	45,0%	55,0%
<b>N9</b>	0,0%	0,0%	2,5%	97,5%	2,5%	5,0%	32,5%	60,0%	22,5%	30,0%	47,5%	32,5%	67,5%
<b>N10</b>	0,0%	0,0%	55,0%	45,0%	0,0%	5,0%	67,5%	27,5%	80,0%	0,0%	20,0%	15,0%	85,0%
<b>N11</b>	0,0%	0,0%	27,5%	72,5%	0,0%	12,5%	82,5%	5,0%	92,5%	0,0%	7,5%	17,5%	82,5%
<b>N12</b>	0,0%	0,0%	37,5%	62,5%	0,0%	5,0%	82,5%	12,5%	65,0%	5,0%	30,0%	37,5%	62,5%
<b>N13</b>	0,0%	0,0%	47,5%	52,5%	2,5%	2,5%	32,5%	62,5%	42,5%	7,5%	50,0%	47,5%	52,5%
<b>N14</b>	0,0%	0,0%	42,5%	57,5%	2,5%	15,0%	80,0%	2,5%	40,0%	15,0%	45,0%	37,5%	62,5%
<b>N15</b>	0,0%	0,0%	42,5%	57,5%	0,0%	2,5%	65,0%	32,5%	50,0%	7,5%	42,5%	42,5%	57,5%
<b>N16</b>	0,0%	0,0%	67,5%	32,5%	2,5%	7,5%	87,5%	2,5%	55,0%	17,5%	27,5%	27,5%	72,5%
<b>N17</b>	0,0%	0,0%	37,5%	62,5%	0,0%	7,5%	85,0%	7,5%	47,5%	17,5%	35,0%	32,5%	67,5%
<b>Média</b>	0,00%	5,50%	42,00%	52,50%	5,00%	9,67%	64,33%	21,00%	50,17%	17,17%	32,67%	31,67%	68,33%

**Tabela 15-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Forma				Peso				Simetria (Posição 1)			Simetria (Posição 2)	
	Esférica	Ovoide	Elíptica	Alongada	Baixo	Médio	Alto	Muito alto	Simétrico	Ligeiramente assimétrico	Assimétrico	Simétrico	Ligeiramente assimétrico
<b>C1</b>	5,0%	82,5%	12,5%	0,0%	0,0%	5,0%	25,0%	70,0%	40,0%	35,0%	25,0%	50,0%	50,0%
<b>C2</b>	0,0%	57,5%	42,5%	0,0%	0,0%	0,0%	25,0%	75,0%	65,0%	12,5%	22,5%	12,5%	87,5%
<b>C3</b>	0,0%	67,5%	32,5%	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%	80,0%	37,5%	22,5%	40,0%	30,0%	70,0%
<b>C4</b>	2,5%	85,0%	12,5%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%	90,0%	72,5%	17,5%	10,0%	25,0%	75,0%
<b>C5</b>	0,0%	5,0%	95,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%	50,0%	40,0%	12,5%	47,5%	40,0%	60,0%
<b>C6</b>	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	97,5%	57,5%	17,5%	25,0%	20,0%	80,0%
<b>C7</b>	0,0%	0,0%	92,5%	7,5%	0,0%	0,0%	22,5%	77,5%	65,0%	2,5%	32,5%	32,5%	67,5%
<b>C8</b>	2,5%	95,0%	2,5%	0,0%	0,0%	12,5%	25,0%	62,5%	62,5%	5,0%	32,5%	32,5%	67,5%
<b>C9</b>	0,0%	0,0%	75,0%	25,0%	0,0%	0,0%	72,5%	27,5%	75,0%	7,5%	17,5%	30,0%	70,0%
<b>C10</b>	0,0%	5,0%	95,0%	0,0%	0,0%	0,0%	70,0%	30,0%	65,0%	5,0%	30,0%	12,5%	87,5%
<b>C11</b>	0,0%	5,0%	65,0%	30,0%	0,0%	0,0%	50,0%	50,0%	55,0%	2,5%	42,5%	45,0%	55,0%
<b>C12</b>	0,0%	0,0%	77,5%	22,5%	0,0%	12,5%	75,0%	12,5%	67,5%	0,0%	32,5%	32,5%	67,5%
<b>C13</b>	0,0%	5,0%	57,5%	37,5%	0,0%	7,5%	90,0%	2,5%	77,5%	5,0%	17,5%	17,5%	82,5%
<b>C14</b>	0,0%	7,5%	90,0%	2,5%	0,0%	0,0%	32,5%	67,5%	57,5%	2,5%	40,0%	32,5%	67,5%
<b>C15</b>	0,0%	7,5%	87,5%	5,0%	0,0%	0,0%	45,0%	55,0%	62,5%	7,5%	30,0%	22,5%	77,5%
<b>C16</b>	0,0%	0,0%	62,5%	37,5%	0,0%	25,0%	65,0%	10,0%	65,0%	2,5%	32,5%	22,5%	77,5%
<b>C18</b>	0,0%	7,5%	87,5%	5,0%	0,0%	0,0%	32,5%	67,5%	67,5%	5,0%	27,5%	27,5%	72,5%
<b>Média</b>	0,59%	28,24%	61,03%	10,15%	0,00%	3,68%	41,91%	54,41%	60,74%	9,56%	29,71%	28,53%	71,47

**Tabela 16-** Características morfológicas do endocarpo, em porcentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Posição do diâmetro transversal máximo			Ápice			Base		Superfície		
	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Pontiaguda	Arredondada	Lisa	Rugosa	Muito Rugosa
<b>N1</b>	2,5%	85,0%	12,5%	52,5%	47,5%	27,5%	70,0%	2,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N4</b>	0,0%	57,5%	42,5%	50,0%	50,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N5</b>	2,5%	47,5%	50,0%	97,5%	2,5%	42,5%	47,5%	10,0%	27,5%	62,5%	10,0%
<b>N6</b>	17,5%	80,0%	2,5%	32,5%	67,5%	45,0%	35,0%	20,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N7</b>	0,0%	82,5%	17,5%	2,5%	97,5%	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N8</b>	12,5%	65,0%	22,5%	52,5%	47,5%	50,0%	30,0%	20,0%	0,0%	82,5%	17,5%
<b>N9</b>	0,0%	47,5%	52,5%	85,0%	15,0%	42,5%	52,5%	5,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N10</b>	0,0%	67,5%	32,5%	0,0%	100,0%	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N11</b>	0,0%	62,5%	37,5%	7,5%	92,5%	30,0%	70,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N12</b>	0,0%	77,5%	22,5%	17,5%	82,5%	65,0%	35,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N13</b>	0,0%	70,0%	30,0%	10,0%	90,0%	67,5%	32,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N14</b>	0,0%	87,5%	12,5%	42,5%	57,5%	22,5%	77,5%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N15</b>	0,0%	75,0%	25,0%	10,0%	90,0%	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>N16</b>	2,5%	77,5%	20,0%	10,0%	90,0%	62,5%	37,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N17</b>	0,0%	77,5%	22,5%	25,0%	75,0%	62,5%	35,0%	2,5%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>Média</b>	2,50%	70,67%	26,83%	33,00%	67,00%	47,83%	48,17%	4,00%	21,83%	76,33%	1,83%

**Tabela 17-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias .

Árvore	Posição do diâmetro transversal máximo			Ápice			Base		Superfície		
	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Pontiaguda	Arredondada	Lisa	Rugosa	Muito Rugosa
<b>C1</b>	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	75,0%	2,5%	22,5%	15,0%	85,0%	0,0%
<b>C2</b>	7,5%	87,5%	5,0%	7,5%	92,5%	65,0%	12,5%	22,5%	0,0%	95,0%	5,0%
<b>C3</b>	20,0%	80,0%	0,0%	27,5%	72,5%	80,0%	7,5%	12,5%	0,0%	70,0%	30,0%
<b>C4</b>	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	100,0%	55,0%	12,5%	32,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C5</b>	0,0%	80,0%	20,0%	0,0%	100,0%	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C6</b>	0,0%	100,0%	0,0%	12,5%	87,5%	62,5%	0,0%	37,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C7</b>	0,0%	85,0%	15,0%	0,0%	100,0%	35,0%	65,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C8</b>	2,5%	97,5%	0,0%	0,0%	100,0%	35,0%	0,0%	65,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C9</b>	0,0%	95,0%	5,0%	17,5%	82,5%	30,0%	70,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C10</b>	0,0%	77,5%	22,5%	15,0%	85,0%	15,0%	80,0%	5,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C11</b>	0,0%	95,0%	5,0%	47,5%	52,5%	45,0%	52,5%	2,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C12</b>	0,0%	85,0%	15,0%	0,0%	100,0%	7,5%	92,5%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C13</b>	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	100,0%	32,5%	67,5%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C14</b>	0,0%	100,0%	0,0%	65,0%	35,0%	0,0%	90,0%	10,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C15</b>	0,0%	95,0%	5,0%	55,0%	45,0%	0,0%	62,5%	37,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C16</b>	0,0%	100,0%	0,0%	2,5%	97,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>C18</b>	0,0%	87,5%	12,5%	0,0%	100,0%	0,0%	82,5%	17,5%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>Média</b>	1,76%	91,32%	6,91%	14,71%	85,29%	35,15%	49,26%	15,59%	6,76%	91,18%	2,06%

**Tabela 18-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Número de sulcos fibrovasculares			Distribuição de sulcos fibrovasculares		Extremidade do Ápice	
	Reduzido	Médio	Elevado	Uniformes	Agrupados na proximidade da sutura	Sem mucrão	Com mucrão
<b>N1</b>	60,0%	37,5%	2,5%	32,5%	67,5%	40,0%	60,0%
<b>N4</b>	87,5%	12,5%	0,0%	10,0%	90,0%	0,0%	100,0%
<b>N5</b>	45,0%	40,0%	15,0%	65,0%	35,0%	0,0%	100,0%
<b>N6</b>	0,0%	90,0%	10,0%	95,0%	5,0%	0,0%	100,0%
<b>N7</b>	95,0%	5,0%	0,0%	97,5%	2,5%	10,0%	90,0%
<b>N8</b>	5,0%	62,5%	32,5%	75,0%	25,0%	0,0%	100,0%
<b>N9</b>	72,5%	25,0%	2,5%	32,5%	67,5%	0,0%	100,0%
<b>N10</b>	87,5%	12,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>N11</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	5,0%	95,0%
<b>N12</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	7,5%	92,5%
<b>N13</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>N14</b>	87,5%	12,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>N15</b>	72,5%	27,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>N16</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>N17</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%
<b>Média</b>	74,17%	21,67%	4,17%	80,50%	19,50%	10,83%	89,17%

**Tabela 19-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Número de sulcos fibrovasculares			Distribuição de sulcos fibrovasculares		Extremidade do Ápice	
	Reduzido	Médio	Elevado	Uniformes	Agrupados na proximidade da sutura	Sem mucrão	Com mucrão
<b>C1</b>	100,0%	0,0%	0,0%	15,0%	85,0%	87,5%	12,5%
<b>C2</b>	37,5%	62,5%	0,0%	72,5%	27,5%	45,0%	55,0%
<b>C3</b>	7,5%	60,0%	32,5%	72,5%	27,5%	42,5%	57,5%
<b>C4</b>	65,0%	35,0%	0,0%	42,5%	57,5%	65,0%	35,0%
<b>C5</b>	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>C6</b>	22,5%	77,5%	0,0%	90,0%	10,0%	42,5%	57,5%
<b>C7</b>	92,5%	7,5%	0,0%	92,5%	7,5%	0,0%	100,0%
<b>C8</b>	10,0%	90,0%	0,0%	65,0%	35,0%	30,0%	70,0%
<b>C9</b>	97,5%	2,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>C10</b>	0,0%	90,0%	10,0%	75,0%	25,0%	0,0%	100,0%
<b>C11</b>	0,0%	67,5%	32,5%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>C12</b>	0,0%	77,5%	22,5%	95,0%	5,0%	0,0%	100,0%
<b>C13</b>	0,0%	95,0%	5,0%	82,5%	17,5%	0,0%	100,0%
<b>C14</b>	0,0%	100,0%	0,0%	75,0%	25,0%	0,0%	100,0%
<b>C15</b>	0,0%	90,0%	10,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
<b>C16</b>	0,0%	82,5%	17,5%	92,5%	7,5%	0,0%	100,0%
<b>C18</b>	0,0%	92,5%	7,5%	87,5%	12,5%	0,0%	100,0%
<b>Média</b>	31,32%	60,59%	8,09%	79,85%	20,15%	18,38%	81,62%



#### 4.1.1.3. Parâmetros avaliados na folha

Os resultados alusivos ao comprimento e largura das folhas encontram-se apresentados na Tabela 20 para a população de oliveiras novas e na Tabela 21 para a população de oliveiras centenárias.

Nas duas populações de oliveiras, quer a largura como o comprimento da folha apresentaram coeficientes de variação muito similares e cujo valor, superior a 12%, sugere que ambos os parâmetros variam ao nível dos indivíduos de cada população. O comprimento da folha oscilou entre 5,87 cm (árvore N11) e 6,91 cm (árvore N15) na população de oliveiras novas (Tabela 20; Figura 9- Anexo II) e entre 5,54 cm (árvore C1) e 7,40 cm (árvore C13) na população de oliveiras centenárias (Tabela 21; Figura 9- Anexo II). Por sua vez, a largura da folha variou, na população de oliveiras novas, entre 0,87 cm (árvore N1) e 1,16 cm (árvore N15) (Tabela 20; Figura 9- Anexo II), enquanto que nas oliveiras centenárias oscilou entre 0,88 cm (árvores C4 e C14) e 1,51 cm (árvore C6) (Tabela 21; Figura 9- Anexo II).

O comprimento médio das folhas das oliveiras centenárias (6,6 cm), apesar de ser ligeiramente superior ao das oliveiras novas (6,4 cm), não possui uma diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Pelo contrário, a largura das folhas das oliveiras centenárias (1,10 cm) foi, em média, estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) face às oliveiras novas (0,99 cm).

**Tabela 20-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de oliveiras novas. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

<b>Árvore</b>	<b>Comprimento (cm)</b>	<b>Largura (cm)</b>
<b>N1</b>	6,72 ± 0,93 (5,20 - 8,40)	0,87 ± 0,13 (0,60 - 1,10)
<b>N4</b>	6,81 ± 1,07 (4,90 - 9,00)	0,96 ± 0,16 (0,60 - 1,30)
<b>N5</b>	6,67 ± 0,87 (4,90 - 8,50)	1,00 ± 0,14 (0,70 - 1,20)
<b>N6</b>	6,12 ± 0,84 (4,40 - 7,60)	0,94 ± 0,21 (0,60 - 1,50)
<b>N7</b>	6,63 ± 1,05 (5,00 - 9,00)	0,99 ± 0,22 (0,60 - 1,90)
<b>N8</b>	5,88 ± 0,75 (4,40 - 7,50)	0,88 ± 0,13 (0,60 - 1,10)
<b>N9</b>	6,21 ± 0,87 (4,70 - 8,40)	0,97 ± 0,14 (0,70 - 1,30)
<b>N10</b>	6,27 ± 0,84 (4,60 - 8,50)	1,05 ± 0,16 (0,70 - 1,40)
<b>N11</b>	5,87 ± 0,78 (4,40 - 7,80)	1,00 ± 0,16 (0,60 - 1,20)
<b>N12</b>	6,03 ± 0,90 (4,80 - 8,60)	1,04 ± 0,13 (0,80 - 1,30)
<b>N13</b>	6,39 ± 0,98 (4,80 - 8,20)	0,99 ± 0,13 (0,80 - 1,30)
<b>N14</b>	6,45 ± 0,88 (5,10 - 8,40)	1,10 ± 0,14 (0,80 - 1,40)
<b>N15</b>	6,91 ± 1,09 (5,00 - 9,80)	1,16 ± 0,22 (0,80 - 1,70)
<b>N16</b>	6,73 ± 1,10 (4,80 - 8,70)	1,04 ± 0,13 (0,80 - 1,40)
<b>N17</b>	6,26 ± 0,83 (5,10 - 8,80)	0,91 ± 0,12 (0,70 - 1,10)
<b>Média ± DP</b>	6,40 ± 0,92	0,99 ± 0,16
<b>C.V.</b>	0,14	0,16

**Tabela 21-** Valores médios, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de oliveiras centenárias. Os valores máximos e mínimos observados são igualmente apresentados entre parêntesis.

Árvore	Comprimento (cm)	Largura (cm)
C1	5,54 ± 0,61 (4,40 - 6,90)	0,89 ± 0,11 (0,70 - 1,10)
C2	6,67 ± 0,95 (4,40 - 8,00)	1,32 ± 0,20 (1,00 - 1,80)
C3	6,31 ± 1,10 (4,70 - 8,60)	1,34 ± 0,18 (1,00 - 1,70)
C4	5,99 ± 0,69 (4,80 - 7,30)	0,88 ± 0,15 (0,60 - 1,30)
C5	6,86 ± 0,85 (5,60 - 8,90)	1,06 ± 0,13 (0,90 - 1,40)
C6	7,01 ± 1,12 (5,10 - 8,90)	1,51 ± 0,23 (1,10 - 2,10)
C7	6,80 ± 0,63 (5,70 - 8,50)	1,15 ± 0,18 (0,90 - 1,60)
C8	6,44 ± 0,56 (5,50 - 7,70)	0,93 ± 0,15 (0,60 - 1,20)
C9	6,85 ± 0,65 (5,50 - 8,10)	0,97 ± 0,16 (0,70 - 1,50)
C10	6,29 ± 0,82 (4,60 - 8,00)	1,01 ± 0,09 (0,80 - 1,20)
C11	6,35 ± 0,73 (4,90 - 7,60)	1,03 ± 0,11 (0,80 - 1,20)
C12	6,81 ± 0,71 (4,90 - 8,50)	1,16 ± 0,13 (1,00 - 1,60)
C13	7,40 ± 0,72 (6,30 - 9,10)	1,32 ± 0,14 (1,00 - 1,60)
C14	6,46 ± 0,70 (5,20 - 8,10)	0,88 ± 0,14 (0,70 - 1,40)
C15	6,81 ± 0,92 (5,20 - 9,00)	0,99 ± 0,12 (0,80 - 1,40)
C16	6,97 ± 0,84 (5,00 - 9,00)	1,27 ± 0,18 (0,60 - 1,60)
C18	6,70 ± 0,72 (5,40 - 8,30)	0,99 ± 0,11 (0,80 - 1,20)
<b>Média ± DP</b>	6,60 ± 0,78	1,10 ± 0,15
<b>C.V.</b>	0,12	0,13

Das Tabelas 22 à 25 estão representados os resultados, em percentagem, de alguns parâmetros biométricos determinados nas folhas de oliveiras novas e centenárias.

A forma da folha pode ser, de acordo com a relação entre o seu comprimento e largura, elíptica (< 4 cm), elíptica-lanceolada (entre 4 cm e 6 cm) ou lanceolada (> 6 cm). A população de oliveiras novas caracterizava-se por apresentar, maioritariamente, folhas de forma lanceolada (64%), exceto as árvores N11, N12, N14 e N15 que tinham sobretudo folhas de forma elíptica-lanceolada (Tabela 22; Figura 10- Anexo II). A população de oliveiras centenárias possuía, na maioria, folhas de forma lanceolada (52%) e elíptica-lanceolada (46%) (Tabela 23; Figura 10- Anexo II).

No que diz respeito ao comprimento da folha, estas caracterizam-se por possuírem um comprimento reduzido (< 5 cm), médio (entre 5 cm e 7 cm) ou elevado (> 7 cm). A maioria das oliveiras novas caracterizam-se por apresentarem folhas de comprimento médio (71%) (Tabela 22; Figura 10- Anexo II). Similarmente, cerca de 67% das folhas das oliveiras centenárias apresentavam um comprimento médio, sendo exceção a árvore C13 que possuía grande parte das suas folhas com comprimento elevado (Tabela 23; Figura 10- Anexo II).

Em relação à largura da folha, estas podem apresentar uma largura reduzida (< 1 cm), média (entre 1 cm e 1,5 cm) ou larga (> 1,5 cm). Ambas as populações de oliveiras, novas e centenárias, caracterizam-se por apresentarem, em média, uma maior ocorrência de folhas de largura média (59% e 68%, respetivamente). Porém, observaram-se algumas exceções ao nível das oliveiras novas (N1, N6, N8 e N17) e centenárias (C1, C4, C8, C9 e C14), caracterizadas por apresentarem folhas de largura reduzida (Tabela 22 e 23; Figura 10- Anexo II).

A curvatura longitudinal do limbo pode ser epinástica, plana, hiponástica ou helicoidal, de acordo com a disposição da curvatura do limbo. Os resultados obtidos ao nível das oliveiras novas indicam que a maioria apresentava folhas com curvatura longitudinal plana (47%) e hiponástica (42%) (Tabela 24; Figura 11- Anexo II). Na população de oliveiras centenárias, as folhas tinham maioritariamente uma curvatura longitudinal plana (68%), sendo exceção a árvore C16 que apresentavam uma curvatura hiponástica (Tabela 25; Figura 11- Anexo II).

No que concerne à posição da largura máxima da folha, verificou-se que em ambas as populações, novas e centenárias, as folhas possuíam uma posição máxima central (99% e 97%, respetivamente) (Tabelas 24 e 25; Figura 11- Anexo II).

No estudo realizado por Sousa (2005), nas cultivares Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana registaram-se valores superiores de comprimento e largura das folhas face às observadas, no presente estudo, para ambas as populações de oliveiras. A mesma autora para os parâmetros forma, curvatura longitudinal do limbo e posição da largura máxima da folha verificou, à semelhança do presente estudo, que apresentavam forma lanceolada, curvatura central e posição central, respetivamente, porém em diferentes percentagens.



**Tabela 22-** Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Forma			Comprimento			Largura		
	Elíptica	Elíptica-lanceolada	Lanceolada	Reduzido	Médio	Elevado	Reduzida	Média	Larga
<b>N1</b>	0,0%	10,0%	90,0%	0,0%	65,0%	35,0%	70,0%	30,0%	0,0%
<b>N4</b>	0,0%	17,5%	82,5%	5,0%	50,0%	45,0%	42,5%	57,5%	0,0%
<b>N5</b>	0,0%	25,0%	75,0%	2,5%	62,5%	35,0%	30,0%	70,0%	0,0%
<b>N6</b>	2,5%	37,5%	60,0%	10,0%	77,5%	12,5%	57,5%	42,5%	0,0%
<b>N7</b>	2,5%	22,5%	75,0%	0,0%	60,0%	40,0%	42,5%	55,0%	2,5%
<b>N8</b>	0,0%	25,0%	75,0%	10,0%	82,5%	7,5%	70,0%	30,0%	0,0%
<b>N9</b>	0,0%	35,0%	65,0%	2,5%	82,5%	15,0%	45,0%	55,0%	0,0%
<b>N10</b>	0,0%	50,0%	50,0%	2,5%	77,5%	20,0%	30,0%	70,0%	0,0%
<b>N11</b>	0,0%	55,0%	45,0%	10,0%	82,5%	7,5%	32,5%	67,5%	0,0%
<b>N12</b>	0,0%	55,0%	45,0%	7,5%	82,5%	10,0%	25,0%	75,0%	0,0%
<b>N13</b>	0,0%	32,5%	67,5%	5,0%	65,0%	30,0%	40,0%	60,0%	0,0%
<b>N14</b>	0,0%	60,0%	40,0%	0,0%	77,5%	22,5%	12,5%	87,5%	0,0%
<b>N15</b>	0,0%	60,0%	40,0%	0,0%	60,0%	40,0%	20,0%	75,0%	5,0%
<b>N16</b>	0,0%	40,0%	60,0%	2,5%	57,5%	40,0%	25,0%	75,0%	0,0%
<b>N17</b>	0,0%	17,5%	82,5%	0,0%	85,0%	15,0%	60,0%	40,0%	0,0%
<b>Média</b>	0,33%	36,17%	63,50%	3,83%	71,17%	25,00%	40,17%	59,33%	0,50%

**Tabela 23-** Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

Árvore	Forma			Comprimento			Largura		
	Elíptica	Elíptica-lanceolada	Lanceolada	Reduzido	Médio	Elevado	Reduzida	Média	Larga
<b>C1</b>	0,0%	42,5%	57,5%	15,0%	85,0%	0,0%	65,0%	35,0%	0,0%
<b>C2</b>	5,0%	82,5%	12,5%	7,5%	50,0%	42,5%	0,0%	90,0%	10,0%
<b>C3</b>	7,5%	87,5%	5,0%	7,5%	62,5%	30,0%	0,0%	90,0%	10,0%
<b>C4</b>	0,0%	15,0%	85,0%	7,5%	82,5%	10,0%	70,0%	30,0%	0,0%
<b>C5</b>	0,0%	22,5%	77,5%	0,0%	62,5%	37,5%	22,5%	77,5%	0,0%
<b>C6</b>	15,0%	85,0%	0,0%	0,0%	57,5%	42,5%	0,0%	62,5%	37,5%
<b>C7</b>	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	65,0%	35,0%	7,5%	90,0%	2,5%
<b>C8</b>	0,0%	25,0%	75,0%	0,0%	85,0%	15,0%	57,5%	42,5%	0,0%
<b>C9</b>	0,0%	12,5%	87,5%	0,0%	60,0%	40,0%	52,5%	47,5%	0,0%
<b>C10</b>	0,0%	45,0%	55,0%	2,5%	75,0%	22,5%	25,0%	75,0%	0,0%
<b>C11</b>	0,0%	37,5%	62,5%	2,5%	80,0%	17,5%	22,5%	77,5%	0,0%
<b>C12</b>	2,5%	65,0%	32,5%	2,5%	62,5%	35,0%	0,0%	97,5%	2,5%
<b>C13</b>	0,0%	72,5%	27,5%	0,0%	40,0%	60,0%	0,0%	97,5%	2,5%
<b>C14</b>	0,0%	12,5%	87,5%	0,0%	82,5%	17,5%	77,5%	22,5%	0,0%
<b>C15</b>	0,0%	30,0%	70,0%	0,0%	60,0%	40,0%	35,0%	65,0%	0,0%
<b>C16</b>	2,5%	75,0%	22,5%	0,0%	62,5%	37,5%	2,5%	95,0%	2,5%
<b>C18</b>	0,0%	17,5%	82,5%	0,0%	65,0%	35,0%	37,5%	62,5%	0,0%
<b>Média</b>	1,91%	45,74%	52,35%	2,65%	66,91%	30,44%	27,94%	68,09%	3,97%



**Tabela 24-** Características morfológicas da folha, em porcentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras novas.

Árvore	Curvatura longitudinal do limbo				Posição da largura máxima		
	Epinástica	Plana	Hiponástica	Helicoidal	Central	Basal	Apical
<b>N1</b>	22,5%	47,5%	30,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N4</b>	20,0%	45,0%	32,5%	2,5%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>N5</b>	2,5%	22,5%	75,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N6</b>	2,5%	80,0%	2,5%	15,0%	92,5%	0,0%	7,5%
<b>N7</b>	5,0%	65,0%	27,5%	2,5%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N8</b>	2,5%	27,5%	65,0%	5,0%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>N9</b>	15,0%	65,0%	20,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N10</b>	17,5%	25,0%	57,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N11</b>	5,0%	37,5%	57,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N12</b>	5,0%	50,0%	45,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N13</b>	2,5%	77,5%	20,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N14</b>	2,5%	45,0%	52,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>N15</b>	5,0%	52,5%	40,0%	2,5%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>N16</b>	2,5%	17,5%	75,0%	5,0%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>N17</b>	20,0%	52,5%	25,0%	2,5%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>Média</b>	8,67%	47,33%	41,67%	2,33%	98,83%	0,00%	1,17%

**Tabela 25-** Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência, nas oliveiras centenárias.

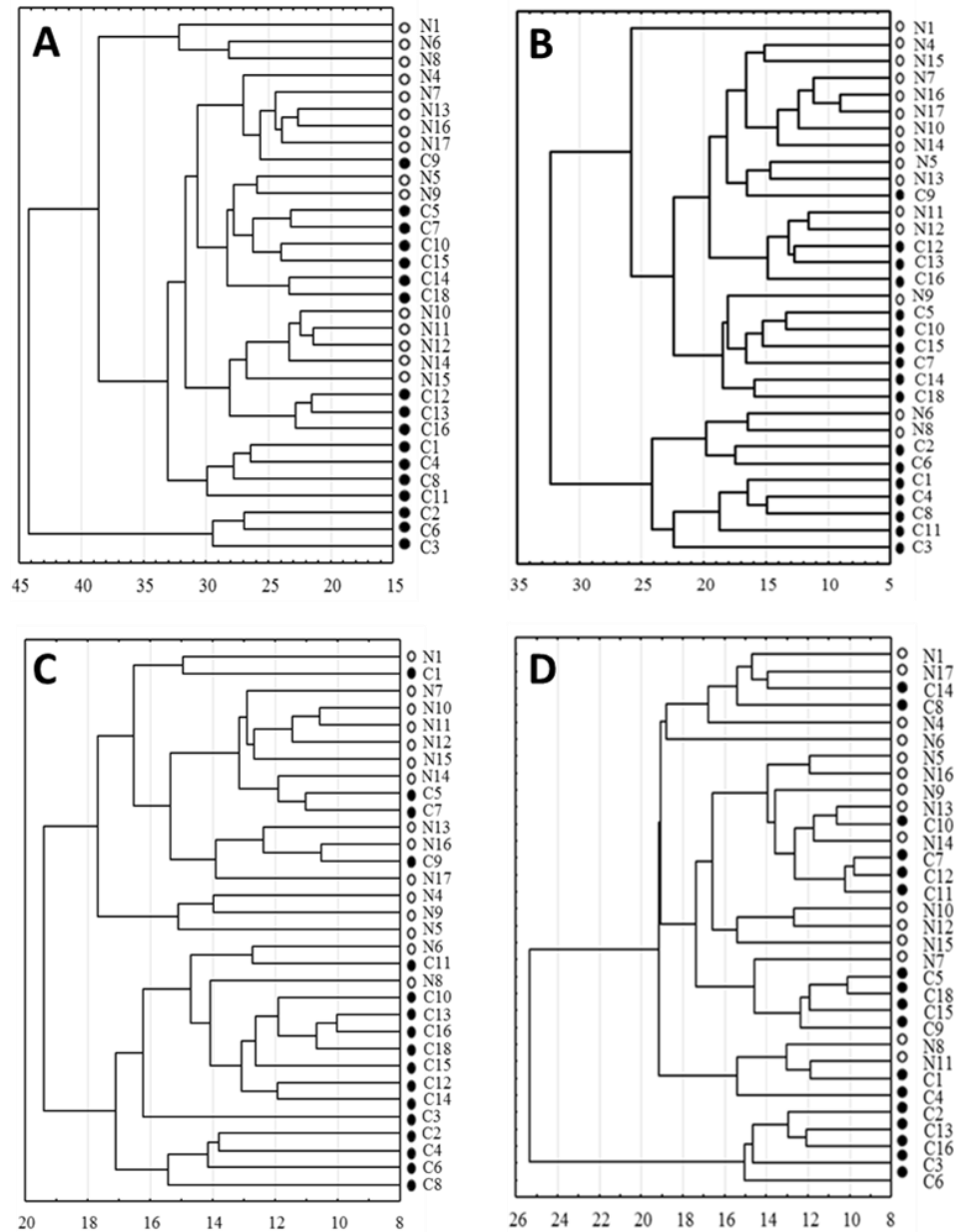
Árvore	Curvatura longitudinal do limbo				Posição da largura máxima		
	Epinástica	Plana	Hiponástica	Helicoidal	Central	Basal	Apical
<b>C1</b>	0,0%	95,0%	5,0%	0,0%	92,5%	0,0%	7,5%
<b>C2</b>	10,0%	50,0%	37,5%	2,5%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>C3</b>	0,0%	50,0%	47,5%	2,5%	95,0%	0,0%	5,0%
<b>C4</b>	25,0%	55,0%	20,0%	0,0%	82,5%	0,0%	17,5%
<b>C5</b>	10,0%	80,0%	10,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C6</b>	10,0%	67,5%	17,5%	5,0%	95,0%	0,0%	5,0%
<b>C7</b>	10,0%	77,5%	12,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C8</b>	12,5%	75,0%	12,5%	0,0%	92,5%	0,0%	7,5%
<b>C9</b>	12,5%	67,5%	20,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C10</b>	7,5%	67,5%	22,5%	2,5%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C11</b>	0,0%	65,0%	35,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C12</b>	5,0%	55,0%	40,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C13</b>	0,0%	87,5%	12,5%	0,0%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>C14</b>	20,0%	57,5%	22,5%	0,0%	97,5%	0,0%	2,5%
<b>C15</b>	7,5%	90,0%	2,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C16</b>	2,5%	30,0%	67,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>C18</b>	10,0%	82,5%	7,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
<b>Média</b>	8,38%	67,79%	23,09%	0,74%	97,06%	0,00%	2,94%

#### 4.1.2. Análise filogenética com base nos caracteres morfológicos

Com base nos resultados morfológicos relativos ao total de órgãos avaliados (fruto, endocarpo e folhas) das oliveiras novas e centenárias, obteve-se a matriz de distâncias Euclidianas, a partir da qual se gerou o dendrograma representado na Figura 15A. Os resultados obtidos indicam que as características morfológicas dos três órgãos analisados, quando considerados em conjunto, não permitem a separação das oliveiras novas das centenárias em dois grupos distintos. Este resultado poderá dever-se à elevada variabilidade das características morfológicas observadas dentro e entre populações.

Vários estudos têm demonstrado que, ao nível das plantas, as características morfológicas individuais de um genótipo podem alterar-se de acordo com as condições ambientais (Gratani, 2014). Assim sendo, a variabilidade morfológica observada entre as oliveiras estudadas podem dever-se, em grande parte, a diferenças das condições ambientais onde se desenvolvem, em especial as relacionadas com as condições edáficas e mesmo de manejo. Por exemplo, Royer *et al.*, (2009) e Li & Yu (2009) verificaram que o tamanho e a forma das folhas podem sofrer alterações resultantes dos fatores ambientais, como por exemplo temperatura, disponibilidade da água, altitude, latitude, longitude, entre outros. Similarmente, Gregoriou *et al.*, (2007) verificou que a radiação solar (exposição *vs.* sombreamento) influenciava a morfologia e a anatomia das folhas de oliveira, bem como o peso e o número de frutos por oliveira.

Apesar da não diferenciação das duas populações de oliveiras, considerando os três órgãos avaliados, observou-se a formação de três grupos distintos (Figura 15A). O primeiro grupo inclui apenas as oliveiras centenárias C2, C3 e C6, caracterizadas por apresentarem frutos com comprimentos e pesos muito similares. O segundo grupo abrange oliveiras centenárias e novas e encontra-se subdividido em quatro grupos. Por fim, o terceiro grupo inclui apenas as oliveiras novas N1, N6 e N8 que se caracterizam por possuírem a forma da folha idêntica. As árvores morfologicamente mais similares são N11 e N12 ao nível da população de oliveiras novas e C12 e C13 ao nível da população de oliveiras centenárias. Estas árvores têm em comum o comprimento das folhas.



**Figura 15-** Dendrogramas de dissimilaridade morfológica nas oliveiras novas (○) e centenárias (●), estabelecido pelo método hierárquico aglomerativo Ligação Completa (*complete linkage*) utilizando a distância Euclidiana.

Legenda: A- Dendrograma total, B- Dendrograma do fruto, C- Dendrograma do endocarpo, D- Dendrograma da folha.

O dendrograma obtido com base nos resultados morfológicos do fruto (Figura 15B) evidenciou a formação de dois grupos distintos. O primeiro grupo é constituído, maioritariamente, por oliveiras centenárias e o segundo grupo inclui oliveiras novas e centenárias. Este último encontra-se, por sua vez, subdividido em três grupos: o

primeiro inclui, maioritariamente, oliveiras centenárias (C5, C7, C10, C14, C15, C18 e N9) que têm em comum o diâmetro máximo dos frutos, o segundo grupo inclui, na sua maioria, oliveiras novas e, por fim, o terceiro grupo abrange apenas a oliveira N1. As árvores com frutos morfológicamente mais semelhantes, na população de oliveiras novas, são N16 e N17, que se caracterizam por possuírem os diâmetros máximo e mínimo dos frutos similares. Enquanto que na população de oliveiras centenárias as mais semelhantes são C12 e C13. Estas árvores têm em comum o comprimento, os diâmetros máximo e mínimo dos frutos.

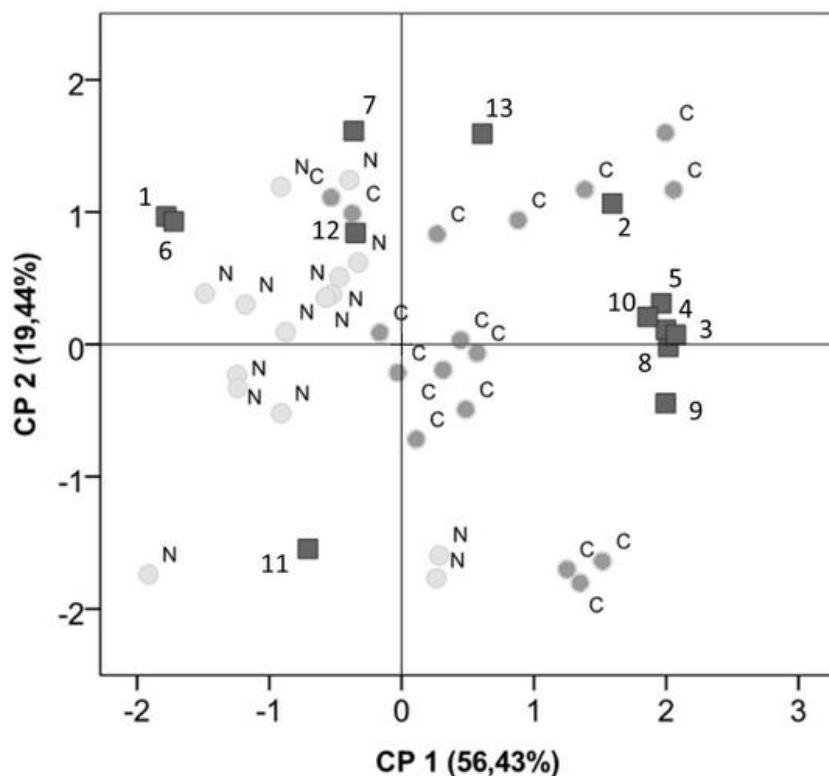
De entre os diferentes órgãos analisados, o endocarpo foi o que permitiu um melhor agrupamento das oliveiras novas e centenárias. O dendrograma obtido a partir das características morfológicas do endocarpo originou dois grupos (Figura 15C). O primeiro grupo é formado, maioritariamente, por oliveiras centenárias e apenas por duas oliveiras novas (N6 e N8). Este grupo subdivide-se em três grupos, o primeiro subgrupo contém apenas oliveiras centenárias (C2, C4, C6 e C8) e caracterizam-se por terem valores de diâmetro máximo dos endocarpos similares. O segundo grupo é constituído por 13 oliveiras novas e 4 oliveiras centenárias. As árvores que apresentam endocarpos com características morfológicas mais similares ao nível das oliveiras novas são N10 e N11 e ao nível das oliveiras centenárias são C13 e C16, que se caracterizam por apresentarem o comprimento e o diâmetro mínimo dos endocarpos similares. Adicionalmente, observou-se um elevado grau de similaridade nas características morfológicas dos endocarpos entre a árvore N16 e C9, provavelmente pelo facto de terem em comum o diâmetro máximo e peso dos endocarpos.

Por fim, o dendrograma obtido a partir das características morfológicas da folha (Figura 15D) permitiu separar as oliveiras estudadas em dois grupos distintos. O primeiro grupo é formado, exclusivamente, por oliveiras centenárias (C2, C3, C6, C13 e C16), caracterizadas por exibirem a largura das folhas semelhantes. O segundo grupo encontra-se subdividido em três grupos contendo, todos eles, oliveiras novas e centenárias.

#### **4.1.3. Análise de Componentes Principais (ACP) com base nos caracteres morfológicos**

Procedeu-se à realização de uma ACP, considerando as variáveis quantitativas avaliadas nos 40 frutos, endocarpos e folhas das oliveiras centenárias e novas. O

resultado obtido encontra-se representado na Figura 16. Com a aplicação desta análise foi possível explicar um total de 75,87% da variabilidade observada nos dados morfológicos [56,43% na primeira componente (CP 1) e 19,44% na segunda componente (CP 2)], utilizando apenas duas componentes principais. A variabilidade observada na CP 1 deve-se sobretudo aos parâmetros morfológicos relacionadas com o peso, diâmetros mínimo e máximo dos frutos e endocarpos. Na CP 2, a variabilidade observada está relacionada com características dos parâmetros forma e comprimento dos frutos e endocarpos, e comprimento e largura das folhas. Pela análise da Figura 16 podemos constatar que a distribuição espacial das oliveiras permitiu diferenciar os dois grupos principais em estudo, oliveiras novas (N) e oliveiras centenárias (C), sendo que a CP 1 foi a componente principal que permitiu separar as duas populações em estudo. Na Figura 16 é possível observar uma separação entre as oliveiras novas (representadas maioritariamente na região negativa da CP 1) e as oliveiras centenárias (representadas maioritariamente na região positiva da CP 1). As oliveiras novas foram caracterizadas, essencialmente, devido a caracteres morfológicos relacionados com o endocarpo e as folhas, nomeadamente a forma e comprimento de ambos, bem como da forma do fruto (Figura 16; Tabelas 12, 20 e 4, respetivamente). As oliveiras centenárias foram caracterizadas, fundamentalmente, por caracteres morfológicos associados ao fruto e também ao endocarpo. Estas árvores exibiram valores médios superiores relativamente aos frutos nos seguintes caracteres: comprimento, diâmetros máximo e mínimo e peso dos frutos (Tabela 5). No que respeita ao endocarpo, as oliveiras centenárias apresentaram valores superiores nos diâmetros máximo e mínimo e no peso (Tabela 13). No que respeita aos parâmetros relacionados com as folhas, as oliveiras centenárias apresentam maior largura comparativamente às oliveiras novas (Tabela 21). No entanto, duas oliveiras centenárias (C7 e C13) apresentaram valores superiores de comprimento de folha, comparativamente às restantes amostras do mesmo grupo (Figura 16; Tabela 21).



**Figura 16-** ACP usando as variáveis quantitativas avaliadas nos frutos, endocarpos e folhas de oliveiras novas (N) e centenárias (C).

Legenda: 1- Forma do fruto; 2- Comprimento do fruto; 3- Diâmetro máximo do fruto; 4- Diâmetro mínimo do fruto; 5- Peso do fruto; 6- Forma do endocarpo; 7- Comprimento do endocarpo; 8- Diâmetro máximo do endocarpo; 9- Diâmetro mínimo do endocarpo; 10- Peso do endocarpo; 11- Forma da folha; 12- Comprimento da folha; 13- Largura da folha.

## 4.2. Análise genética

### 4.2.1. Análise da diversidade genética

A diversidade genética de cada população de oliveiras (novas e centenárias) foi avaliada pela estimativa das frequências alélicas e por diversos índices de diversidade.

#### 4.2.1.1. Frequências alélicas

Geneticamente, uma população é um grupo de indivíduos que se reproduzem e deixam descendentes. Deste modo, a caracterização da variabilidade genética de uma população inclui não só o conhecimento da constituição genética dos indivíduos dessa

população, mas também o modo como os genes são transmitidos às próximas gerações. Na descendência são formados novos genótipos a partir da combinação dos alelos transmitidos pelos gametas dos progenitores e, desta forma, a constituição genética da população em relação aos alelos, que são transmitidos a cada geração, pode ser descrita pelas frequências alélicas. As frequências alélicas indicam a abundância de cada um dos alelos (Tavares, 2007). Quando a frequência alélica é menor ou igual a 5% (0,05) os alelos são considerados raros (Alves, 2007).

Após a análise da Tabela 26, podemos constatar que na população de oliveiras novas as frequências alélicas variaram entre 0,033 (*loci* EM090, DCA9, DCA14 e DCA18) e 0,769 (*locus* DCA5). Dos 47 alelos identificados nesta população, cerca de 74% apresentaram frequência igual ou superior a 0,10 e 13% correspondem a alelos raros (6 alelos no total, assinalados com um asterisco na Tabela 26). Na população de oliveiras centenárias, as frequências alélicas variaram entre 0,029 (*loci* EM090, UDO-011, UDO-043, DCA3, DCA5, DCA14, DCA18 e DQ386912) e 0,794 (*locus* DCA5). Nesta população de oliveiras, a percentagem de alelos raros foi superior (cerca de 25%, assinalados com um asterisco na Tabela 26) e cerca de 56% dos alelos apresentaram uma frequência igual ou superior a 0,10. Bandelj *et al.* (2004) ao analisarem 14 *loci*, cinco dos quais semelhantes aos do presente estudo (DCA3, DCA5, DCA9, DCA14 e DCA16), obtiveram valores de frequência alélica entre 0,026 e 0,815, muito similares aos obtidos no presente estudo. Pelo contrário, Cicutelli e colaboradores (2013) para os 8 *loci* analisados, dois dos quais (GAPU71B e GAPU101) idênticos aos do presente estudo, obtiveram valores de frequência alélica mais baixos, variando entre 0,005 e 0,560, inclusive para os *loci* GAPU71B e GAPU101, com frequências alélicas a variar entre 0,015 - 0,465 e 0,014 - 0,290, respetivamente. Similarmente, Bracci e seus colaboradores (2009) obtiveram valores de frequência alélica baixos, variando entre 0,008 e 0,483, inclusivamente para cinco dos *loci* (DCA9, DCA16, DCA18, UDO-011 e UDO-043) também avaliados no presente estudo. Estes *loci* apresentaram frequências alélicas a variar entre 0,009 - 0,224, 0,008 - 0,175, 0,008 - 0,282, 0,008 - 0,230 e 0,008 - 0,302, respetivamente.

A análise da Tabela 26 revela ainda que os *loci* DCA5 e DCA14, em ambas as populações de oliveiras, e o *locus* EM090 na população de oliveiras centenárias tiveram uma distribuição menos uniforme, apresentando um alelo com uma frequência muito elevada. Nos restantes *loci*, as frequências foram mais uniformes, predominando 2 a 3 alelos por cada *locus* em cada uma das populações estudadas.



**Tabela 26-** Frequência alélica para as populações de oliveiras novas e centenárias.

<i>Locus</i>	<i>Alelos</i>	<b>Frequência Alélica</b>	
		<b>Oliveiras Novas</b>	<b>Oliveiras Centenárias</b>
<b>EM090</b>	184	0,400	0,647
	185	0,167	0,147
	186	0,400	0,176
	187	0,033*	0,029*
<b>UDO-011</b>	112	-	0,088
	113	0,071	0,059
	114	-	0,324
	115	-	0,029*
	122	0,500	0,324
	127	0,393	0,147
	128	0,036*	0,029*
<b>UDO-043</b>	172	-	0,029*
	174	0,500	0,471
	175	0,100	0,088
	212	-	0,029*
	218	0,200	0,147
	219	0,100	0,147
	221	0,100	0,088
<b>DCA3</b>	239	-	0,029*
	240	-	0,206
	243	-	0,029*
	246	0,500	0,235
	249	0,107	0,059
	250	-	0,118
	254	0,286	0,235
	257	0,107	0,088
<b>DCA5</b>	204	0,769	0,794
	205	0,231	0,176
	212	-	0,029*
<b>DCA9</b>	161	-	0,206
	163	0,100	0,118
	183	-	0,088
	193	0,400	0,206
	194	0,033*	0,059
	205	0,400	0,324
	207	0,067	-

	178	-	0,088
	180	-	0,029*
<b>DCA14</b>	184	0,033*	-
	188	0,767	0,706
	189	0,200	0,176
	121	0,286	0,219
	122	0,143	0,125
	123	0,286	0,281
<b>DCA16</b>	124	0,214	0,094
	154	-	0,156
	155	0,071	0,031*
	174	-	0,063
	175	-	0,031*
	163	-	0,029*
	167	-	0,235
	168	0,067	0,059
	169	0,500	0,235
<b>DCA18</b>	170	0,033*	0,029*
	173	-	0,118
	174	-	0,029*
	175	-	0,029*
	177	0,300	0,176
	178	0,100	0,059
	117	-	0,118
	120	-	0,088
<b>GAPU71B</b>	123	0,429	0,206
	126	0,071	0,235
	140	0,500	0,353
	192	0,067	0,233
<b>GAPU101</b>	194	-	0,033*
	198	0,433	0,233
	200	0,500	0,500
	191	-	0,147
	192	-	0,029*
<b>DQ386912</b>	193	0,393	0,412
	194	0,179	0,118
	199	0,393	0,265
	200	0,036*	0,029*
<b>Nº total de alelos</b>	74	47	72

Legenda: \* Alelos raros.

#### 4.2.1.2. Estimativas da diversidade genética

Frequentemente são utilizados vários estimadores de diversidade genética com o intuito de se conhecer a diversidade genética molecular de populações naturais. De entre os estimadores, os mais utilizados na análise por microsatélite são: número médio de alelos por *locus* ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), Índice de *Shannon* (ou de informatividade -  $I$ ), heterozigotia observada ( $H_o$ ), heterizigotia esperada ( $H_e$ ) e alelos privados ( $A$  privados).

##### 4.2.1.2.1. Número de alelos por *locus* ( $N_a$ )

O número de alelos por *locus* corresponde ao número total de alelos distintos que cada *locus* apresenta nas populações em estudo. Este cálculo dá-nos uma ideia do estado de uma população, uma vez que quanto maior for o número de alelos por *locus* e por população maior diversidade apresenta essa população. O número médio de alelos por *locus* é a média aritmética do número de alelos distintos que cada *locus* apresenta, calculada para cada *loci* nas populações em estudo (Tavares, 2007).

A maioria dos 12 *loci* avaliados no presente estudo revelaram ser muito polimórficos, ao permitiram detetar um total de 74 alelos nas 32 oliveiras (novas e centenárias) amostradas (Tabela 26), com uma média total de 4,96 alelos por *locus* (Tabela 27). De entre os *loci* avaliados, DCA5 foi o menos polimórfico (2 alelos) e DCA18 foi o mais polimórfico (10 alelos). O número total de alelos obtidos neste estudo é comparável com o referido por outros autores (Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Bandelj *et al.*, 2004; Sabino Gil *et al.*, 2006; Khadari *et al.*, 2008; Cicutelli *et al.*, 2013), apesar do número de oliveiras estudadas e de *loci* analisados serem diferentes. Por exemplo, Sabino Gil *et al.* (2006) identificaram um total de 81 alelos em 33 cultivares de oliveira, utilizando 12 marcadores microsatélites. Polimorfismos superiores foram obtidos por Cipriani *et al.* (2002) ao identificarem um total de 104 alelos em 12 cultivares, usando 30 marcadores microsatélites, e por Bandelj *et al.* (2004) com a identificação de 96 alelos em 19 cultivares de oliveira e com o uso de 14 marcadores microsatélites. De igual modo, Cicutelli e seus colaboradores (2013) numa população de 136 oliveiras, utilizando 8 marcadores microsatélites identificaram um total de 83 alelos e Khadari *et al.*, (2008) identificaram um total de 105 alelos em 215 cultivares de oliveiras, com a aplicação de 15 marcadores

microssatélites. Pelo contrário, Charafi *et al.*, (2008) referem polimorfismos inferiores, ao identificarem um total de 70 alelos com recurso a 15 marcadores microssatélites, em 128 oliveiras e no estudo De la Rosa *et al.*, (2002) numa população de 23 oliveiras e utilizando 7 marcadores microssatélites, identificaram um total de 45 alelos. Igualmente, Carriero e seus colaboradores (2002) identificaram na totalidade 57 alelos em 20 cultivares de oliveira, com o uso de 10 marcadores microssatélites.

Ao nível das 15 oliveiras novas, para os 12 *loci* avaliados, foram obtidos 47 alelos, com um valor médio de 3,92 alelos por *locus* (Tabela 27). Nesta população, o número de alelos por *locus* variou entre 2 (DCA5) e 5 alelos (UDO-043, DCA9, DCA16 e DCA18). A população de oliveiras centenárias apresentou um maior número de alelos (72), com um valor médio de 6,00 alelos por *locus*, para os 17 indivíduos amostrados (Tabela 27). Dos *loci* analisados nesta população, o DCA18 revelou-se o mais polimórfico, com um número de alelos de 10 e o DCA5 foi o menos polimórfico, com apenas 3 alelos. Estes resultados são similares com os de outros autores, onde referem que os *loci* UDO-11 e UDO-43 possuem 5 alelos (Cipriani *et al.*, 2002), o *locus* DCA3 e DCA5 é variável entre 4 e 5 (Charafi *et al.*, 2008), 7 e 5 (Bandelj *et al.*, 2004) e 8 e 10 alelos (Khadari *et al.*, 2008), respetivamente. Por sua vez, os *loci* DCA9, DCA14 e DCA16 possuem 9, 7 e 9 alelos (Bandelj *et al.*, 2004), de forma respetiva. O *locus* GAPU71B possui 5 alelos (Charafi *et al.*, 2008; Khadari *et al.*, 2008), em diversas cultivares de oliveira.

**Tabela 27-** Estimativas da diversidade genética nas duas populações de oliveiras amostradas (oliveiras novas e centenárias).

População	SSR	Na	Ne	I	Ho	He
Oliveiras Novas	EM090	4	2,866	1,145	0,867	0,651
	UDO-011	4	2,435	1,021	1,000	0,589
	UDO-043	5	3,125	1,359	0,800	0,680
	DCA3	4	2,820	1,183	0,786	0,645
	DCA5	2	1,550	0,540	0,000	0,355
	DCA9	5	2,980	1,257	0,933	0,664
	DCA14	3	1,590	0,639	0,067	0,371
	DCA16	5	4,261	1,512	1,000	0,765
	DCA18	5	2,813	1,232	0,800	0,644
	GAPU71B	3	2,279	0,898	1,000	0,561
GAPU101	3	2,261	0,889	1,000	0,558	

	DQ386912	4	2,925	1,161	0,857	0,658
	<b>Média ± DP</b>	3,92 ± 1,00	2,66 ± 0,72	1,07 ± 0,29	0,76 ± 0,35	0,60 ± 0,12
	EM090	4	2,117	0,973	0,412	0,528
	UDO-011	7	4,099	1,600	0,647	0,756
	UDO-043	7	3,546	1,554	0,824	0,718
	DCA3	8	5,558	1,846	0,765	0,820
	DCA5	3	1,509	0,593	0,059	0,337
<b>Oliveiras</b>	DCA9	6	4,661	1,649	0,824	0,785
<b>Centenárias</b>	DCA14	4	1,859	0,870	0,235	0,462
	DCA16	8	5,505	1,851	1,000	0,818
	DCA18	10	6,021	1,987	0,824	0,834
	GAPU71B	5	4,099	1,499	1,000	0,756
	GAPU101	4	2,778	1,139	1,000	0,640
	DQ386912	6	3,613	1,458	0,765	0,723
	<b>Média ± DP</b>	6,00 ± 2,09	3,78 ± 1,50	1,42 ± 0,43	0,70 ± 0,31	0,68 ± 0,16
	<b>Média Total ± DP Total</b>	4,96 ± 1,92	3,22 ± 1,29	1,24 ± 0,40	0,73 ± 0,32	0,64 ± 0,15

Legenda:  $N_a$ - Nº médio de alelos por *locus*,  $N_e$ - Nº de alelos efetivos, I- Índice de *Shannon*,  $H_o$ - Heterozigotia observada,  $H_e$ - Heterozigotia esperada.

#### 4.2.1.2.2. Número de alelos efetivos ( $N_e$ )

O número de alelos efetivos reflete o número de alelos necessários dentro de um *locus* para manter o nível atual de heterozigotia. Este parâmetro está dependente do número de indivíduos de uma população que efetivamente participam na reprodução e na contribuição relativa para a geração seguinte. Quanto maior o seu valor, menor é a probabilidade de alteração das frequências alélicas numa população devido ao acaso (deriva genética). Na prática, o  $N_e$  é estimado com base no tamanho amostral e no índice de fixação, duas medidas indiretas da sensibilidade da população à perda de alelos por deriva genética.

O número médio de alelos efetivos nas 32 oliveiras (novas e centenárias) analisadas, com recurso aos 12 *loci*, variou entre 1,509 e 6,021, com um valor médio de 3,22 (Tabela 27). Este valor é considerado alto e concordante com o trabalho de Cicutelli *et al.*, (2013) que ao analisarem 8 *loci* para 49 oliveiras centenárias e 22 oliveiras novas, estimaram um número médio de alelos efetivos de 3,557. No estudo realizado por Baldoni e seus colaboradores (2009), dos 11 *loci* analisados para um

conjunto de 77 cultivares de oliveiras, estimou-se um valor superior de alelos efetivos (5,83).

Na população de oliveiras novas, o  $N_e$  possui um valor médio de 2,66, tendo variado entre 1,550 (*locus* DCA5) e 4,261 (*locus* DCA16). Em contrapartida, na população de oliveiras centenárias, o valor médio de  $N_e$  foi superior (3,78) com uma variação entre 1,509 (*locus* DCA5) e 6,021 (*locus* DCA18).

#### 4.2.1.2.3. Índice de Shannon (I)

O índice de informatividade, também designado por índice de *Shannon*, é utilizado para medir a diversidade.

Assim sendo, dos 12 *loci* estudados, os *loci* DCA16 e DCA18 foram os mais informativos ao nível da população de oliveiras novas ( $I= 1,512$ ) e centenárias ( $I= 1,987$ ), respetivamente (Tabela 27). Este resultado deve-se ao fato destes *loci* serem os mais polimórficos ao nível das duas populações de oliveiras. Tal como podemos verificar na Tabela 27, a média do índice de informatividade é superior nas oliveiras centenárias (1,42) em relação às oliveiras novas (1,07), podendo assim afirmar que a população de oliveiras centenárias possui maior diversidade. Baldoni e seus colaboradores (2009), utilizando 11 *loci*, dos quais 10 iguais ao presente estudo (UDO-043, DCA3, DCA5, DCA9, DCA14, DCA16, DCA18, GAPU71B, GAPU101 e EM090), obtiveram índices de informatividade superiores. Estes autores verificaram que os *loci* UDO-043 e DCA9 foram os mais informativos (2,425 e 2,306, respetivamente), e não o DCA16 e DCA18 tal como observado no presente estudo.

#### 4.2.1.2.4. Heterozigotia

A heterozigotia é a proporção de indivíduos heterozigóticos numa população. Esta proporção exhibe um valor observado (heterozigotia observada,  $H_o$ ) que pode diferir do seu valor esperado ( $H_e$ ). A  $H_o$  é o número observado de heterozigóticos que foi calculado para cada *locus* como a razão entre o número de indivíduos heterozigóticos e o número total de indivíduos estudados. A  $H_e$  é o número de heterozigóticos esperados a partir das frequências alélicas estimadas (Alves, 2007; Tavares, 2007).

Os valores de  $H_e$  nas 32 oliveiras amostradas (centenárias e novas) variaram entre 0,337 e 0,834, com um valor médio de 0,64, ligeiramente inferior à  $H_o$  (valor médio de 0,73) (Tabela 27). Similarmente, Cicatelli *et al.* (2013) em várias cultivares de oliveira e utilizando 8 *loci* observaram valores médios de  $H_e$  e  $H_o$  iguais a 0,690 e 0,658, respetivamente. De igual forma, Bandelj *et al.*, (2004), usando 14 *loci* alcançaram valores médios de  $H_e$  e  $H_o$  iguais a 0,705 e 0,769, respetivamente. Baldoni e seus colaboradores (2009), com o uso de 11 *loci* obtiveram valores médios de  $H_e$  e  $H_o$  superiores ao presente estudo (0,81 e 0,85, respetivamente). Geralmente, os microsatélites desenvolvidos em oliveira são caracterizados por apresentarem valores de heterozigotia esperada médios, isto é, na ordem de 0,66 (Díaz *et al.* 2006; Alves, 2007), tal como observado no presente estudo.

Na população de oliveiras novas os valores de  $H_e$ , obtidos nos 12 *loci* analisados, variaram entre 0,355 (*locus* DCA5) e 0,765 (*locus* DCA16), com um valor médio de 0,60 (Tabela 27). Por sua vez, os valores  $H_o$  foram superiores (média igual a 0,76), variando entre 0,000 (*locus* DCA5) e 1,000 (*loci* UDO-011, DCA16, GAPU71B, GAPU101). Na população de oliveiras centenárias os valores de  $H_e$  estão compreendidos entre 0,337 (*locus* DCA5) e 0,834 (*locus* DCA18), com um valor médio de 0,68 (Tabela 27). Os valores de  $H_o$  variaram de 0,059 (*locus* DCA5) a 1,00 (*loci* DCA16, GAPU71B e GAPU101), sendo o valor médio (0,70) ligeiramente superior à  $H_e$ . A superioridade dos valores médios da  $H_o$  face à  $H_e$  sugere um excesso de heterozigóticos em cada uma das populações de oliveiras estudadas, em especial nas oliveiras novas onde a diferença é mais notória. Pelo contrário, os *loci* DCA5, DCA14 (população oliveiras novas), EMO90, UDO-11, DCA3, DCA5, DCA14 e DCA18 (população oliveiras centenárias) apresentaram um valor de  $H_o$  inferior ao de  $H_e$ .

#### 4.2.1.2.5. Alelos privados (A privados)

Alelos privados são os alelos presentes exclusivamente numa população, e normalmente apresentam frequências baixas (Tavares, 2007). Estes alelos podem ser interessantes para distinguir as duas populações de oliveiras amostradas, ao permitirem melhorar a imputação de um indivíduo a uma das populações.

Nas duas populações de oliveiras existe um total de 29 alelos privados, sendo que 2 deles pertencem à população de oliveiras novas e os restantes 27 à população de oliveiras centenárias, podendo afirmar assim que estas contêm maior diversidade

(Tabela 28). Ao nível da população de oliveiras novas, os *loci* DCA9 e DCA14 apresentam apenas um alelo privado, enquanto que na população de oliveiras centenárias o número de alelos privados por *locus* varia entre 1 (*loci* DCA5 e GAPU-101) e 5 (*locus* DCA18). Verifica-se ainda que o *locus* DCA14 apresenta um alelo privado para a população de oliveiras novas e dois alelos privados para a população de oliveiras centenárias. Salimonti e seus colaboradores (2013), ao utilizarem 9 *loci* para a identificação de 36 cultivares de oliveiras centenárias em regiões da Itália, obtiveram um menor número de alelos privados. Do total dos 54 alelos obtidos pelos autores, apenas 14 correspondiam a alelos privados. Estes encontravam-se presentes em 7 *loci*, dos quais 6 eram semelhantes ao presente estudo (GAPU71B, DCA5, DCA9, DCA16, EM090 e DCA14), com um número de alelos privados de 1, 1, 2, 2, 4 e 3, respetivamente. Bracci *et al.* (2009) num total de 95 alelos, pertencentes às 23 cultivares da Liguria (região da Itália), obteve 22 alelos privados relativos a 12 *loci*, sendo 4 deles idênticos ao atual estudo (DCA9, DCA16, DCA18 e UDO-011), com um número de alelos privados de 1, 2, 1, 2, respetivamente.

A elevada quantidade de alelos privados observados, ao nível da população de oliveiras centenárias, associado à sua baixa frequência (cerca de 41% dos alelos privados possuíam uma frequência de 0,029; Tabela 28) aumenta o risco de ocorrência da sua perda. Estes alelos devem, por conseguinte, ser monitorizados ao nível desta população por poderem representar algum tipo de endemismo. A presença destes alelos pode estar relacionada com o mecanismo da deriva genética.

**Tabela 28-** *Locus* e os respetivos alelos privados (A privados) e as suas frequências (F privados), nas duas populações de oliveiras amostradas (oliveiras novas e centenárias).

População	<i>Locus</i>	A privados	F privados
Oliveiras centenárias		239	0,029
Oliveiras centenárias	DCA3	240	0,206
Oliveiras centenárias		243	0,029
Oliveiras centenárias		250	0,118
Oliveiras centenárias	DCA5	212	0,029
Oliveiras novas		207	0,067
Oliveiras centenárias	DCA9	161	0,206
Oliveiras centenárias		183	0,088



Oliveiras novas		184	0,033
Oliveiras centenárias	DCA14	178	0,088
Oliveiras centenárias		180	0,029
Oliveiras centenárias		154	0,156
Oliveiras centenárias	DCA16	174	0,063
Oliveiras centenárias		175	0,031
Oliveiras centenárias		163	0,029
Oliveiras centenárias		167	0,235
Oliveiras centenárias	DCA18	173	0,118
Oliveiras centenárias		174	0,029
Oliveiras centenárias		175	0,029
Oliveiras centenárias	GAPU-101	194	0,033
Oliveiras centenárias	GAPU71B	117	0,118
Oliveiras centenárias		120	0,088
Oliveiras centenárias		112	0,088
Oliveiras centenárias	UDO-011	114	0,324
Oliveiras centenárias		115	0,029
Oliveiras centenárias	UDO-043	172	0,029
Oliveiras centenárias		212	0,029
Oliveiras centenárias	DQ386912	191	0,147
Oliveiras centenárias		192	0,029
<b>Total de A privados</b>		29	

#### 4.2.2. Análise da estrutura genética

A estrutura genética de populações refere-se à heterogeneidade na distribuição dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas como a mutação, migração, seleção e deriva genética. Existem diferentes métodos estatísticos para caracterizar a estrutura genética populacional sendo as estatísticas  $F$  (Wright, 1951) uma das mais utilizadas. As estatísticas de  $F$  permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ).

Para verificar a presença de estrutura nas duas populações de oliveiras estudadas e alocar os diferentes indivíduos a agrupamentos, em função dos seus genótipos em múltiplos *loci*, realizou-se uma análise no *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000).

#### 4.2.2.1. Índice $F_{ST}$

O índice  $F_{ST}$  mede a redução de heterozigotia devido à deriva genética dentro de subpopulações, refletindo a diferenciação genética entre subpopulações. Na prática, corresponde à proporção de variância genética de uma subpopulação relativamente à variância genética total. Os seus valores variam de 0 a 1, sendo que um valor de  $F_{ST}$  alto corresponde a uma diferenciação genética considerável entre populações. De facto, quando  $F_{ST}= 1$  indica que as subpopulações são completamente homozigóticas com a fixação de alelos distintos entre elas. Se  $F_{ST}= 0$  indica subpopulações com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as subpopulações.

O valor de  $F_{ST}$  médio, estimado entre as duas populações de oliveiras (novas e centenárias), foi de 0,030 (Tabela 29), indicando que existe 3% de variação interpopulacional. De acordo com Wright (1965), valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 são indicativos de pouca diferenciação genética. Este resultado não é surpreendente uma vez que, nesta espécie, o método tradicional para a obtenção de novas plantas é feito por multiplicação vegetativa. Segundo o mesmo autor, valores de  $F_{ST}$  entre 0,05 e 0,25 indicam a existência de uma diferenciação moderada. No presente estudo, os *loci* UDO-011 e DCA18 apresentaram valores de  $F_{ST}$  iguais a 0,071 e 0,051, respetivamente (Tabela 29), sugerindo uma diferenciação entre as duas populações de oliveiras. Desta forma, estes *loci* podem ser úteis para discriminar a população de oliveiras centenárias das novas.

Baldoni *et al.* (2009) obteve valores de  $F_{ST}$  entre 0,027 e 0,053, sendo o valor médio de 0,04. Tal como no presente estudo, os valores de  $F_{ST}$  obtidos por Baldoni *et al.* (2009) são inferiores a 0,05, com a exceção de 2 *loci* que apresentaram valores de  $F_{ST}$  superiores a 0,05.

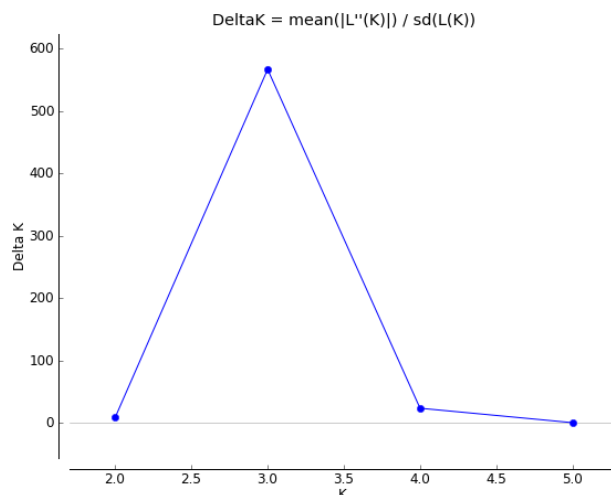
**Tabela 29-** Grau de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as duas populações de oliveiras amostradas (oliveiras novas e centenárias).

População	SSR	$F_{ST}$
	EM090	0,045
	UDO-011	0,071
	UDO-043	0,003
	DCA3	0,043
	DCA5	0,003
<b>Oliveiras Novas e Centenárias</b>	DCA9	0,033
	DCA14	0,008
	DCA16	0,016
	DCA18	0,051
	GAPU71B	0,043
	GAPU101	0,028
	DQ386912	0,015
	<b>Média ± DP</b>	<b>0,030 ± 0,02</b>

#### 4.2.2.2. *Structure*

De forma a analisar a estrutura genética das populações de oliveiras foi utilizado o programa *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000). Este aplicativo permite analisar todos os indivíduos, assinalando-os com uma percentagem de probabilidade a cada K populações consideradas. O programa para discriminar a estrutura populacional tem como base que, em cada população, os *loci* estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e que não estão em desequilíbrio de ligação (*Linkage Disequilibrium*) dentro das populações.

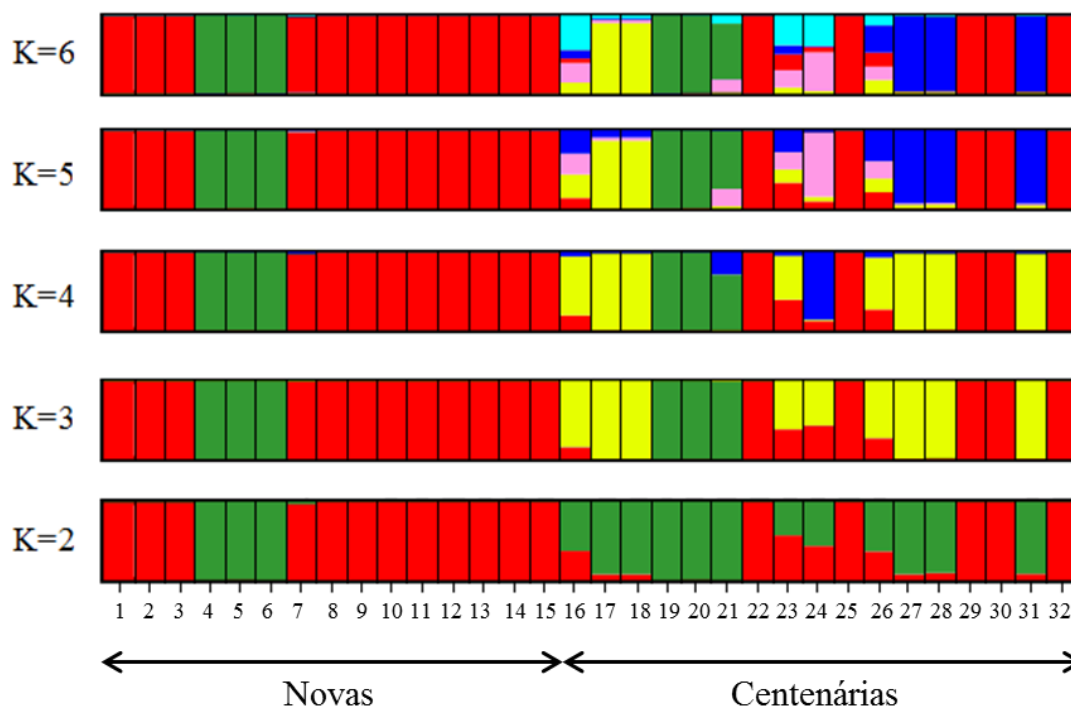
Para verificar qual o número de populações (K) mais provável utilizou-se o teste de *Evanno*  $\Delta K$ . Após a análise da Figura 17 e da Tabela 1 (Anexo I) podemos afirmar que o  $\Delta K$  ótimo foi conseguido quando  $K=3$ , valor alusivo ao pico mais alto (566.96).



**Figura 17-** Valores de  $\Delta K$  em função do número de grupos formados (K).

Após a análise da Figura 18, podemos verificar a diferenciação da população de oliveiras novas das centenárias. Para  $K=2$ , existe a divisão dos indivíduos em dois grupos, representados a cores vermelha (que inclui a maioria das oliveiras novas) e verde (que inclui a maioria das oliveiras centenárias). De  $K=3$  até  $K=6$  vão surgindo componentes novas apenas nos indivíduos pertencentes à população de oliveiras centenárias, indicando a existência de uma maior diversidade genética ao nível destas oliveiras. Este resultado é corroborado pelos valores de estimativa de diversidade, anteriormente calculados para esta população de oliveiras (e.g.  $N_a$ ,  $N_e$ ,  $I$ ,  $H_e$  e  $H_o$ , Tabela 27). As oliveiras centenárias, devido à sua maior variabilidade genética, tem maior probabilidade de perpetuação quando comparada com as oliveiras novas. Desta forma, considera-se ser de extrema importância a sua conservação.

A Figura 18 evidencia ainda a existência de um relacionamento entre as oliveiras centenárias e oliveiras novas. De  $K=3$  a  $K=6$  é possível verificar que as oliveiras novas N6, N7 e N8 parecem ter tido origem das centenárias C4, C5 e C6, por partilharem a componente verde; e as restantes oliveiras novas, provavelmente, tiveram origem das centenárias C7, C10, C14, C15 e C18, por partilharem a componente vermelha. Na oliveira, o processo mais utilizado para a obtenção de novas plantas é através da multiplicação vegetativa de estacas semi-lenhosas. Desta forma, as novas plantas obtidas constituem clones das plantas mãe, onde se recolhe o material vegetal. É provável que algumas das oliveiras centenárias amostradas neste estudo tenham sido plantas mãe de algumas oliveiras novas, por partilharem a mesma componente genética.



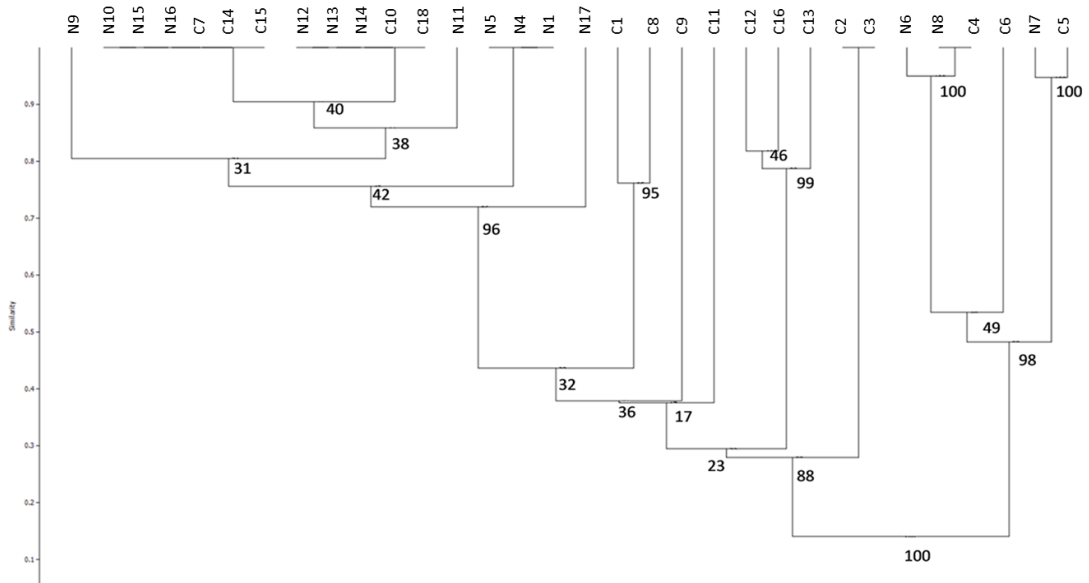
**Figura 18-** Análise da estrutura genética das 15 oliveiras novas e das 17 oliveiras centenárias. Cada cor representa uma população e as barras verticais representam as oliveiras, cujo comprimento indica a proporção do genoma atribuído ao respetivo genótipo.

Legenda: 1- N1, 2- N4, 3- N5, 4- N6, 5- N7, 6- N8, 7- N9, 8- N10, 9- N11, 10- N12, 11- N13, 12- N14, 13- N15, 14- N16, 15- N17, 16- C1, 17- C2, 18- C3, 19- C4, 20- C5, 21- C6, 22- C7, 23- C8, 24- C9, 25- C10, 26- C11, 27- C12, 28- C13, 29- C14, 30- C15, 31- C16, 32- C18.

#### 4.2.3. Relações filogenéticas

Os grupos, nos métodos hierárquicos, são vulgarmente representados por um diagrama bi-dimensional designado por dendrograma ou diagrama de árvore (Doni, 2004). No dendrograma, cada ramo representa um indivíduo, enquanto a raiz representa o agrupamento de todos os indivíduos.

Após a análise do dendrograma da Figura 19, baseado no índice de similaridade *Jaccard*, podemos verificar que esta se divide em dois grandes grupos. O primeiro subdivide-se em dois subgrupos, em que um apresenta as árvores N7 e C5 e o outro as árvores N6, N8, C4 e C6. O segundo grupo divide-se em dois, sendo que o primeiro contém as árvores C2 e C3 e o segundo grupo contém as restantes árvores. O agrupamento observado pelo dendrograma comprova os resultados obtidos pelo *Struture* (Figura 18).



**Figura 19-** Dendrograma obtido a partir do método UPGMA baseado no índice de similaridade *Jaccard*, mostrando as relações genéticas entre as 32 oliveiras estudadas (oliveiras centenárias - C e novas - N). Os valores de *bootstrapping* encontram-se indicados no início de cada agrupamento.

#### 4.3. Correlação entre as análises morfológica e genética

De forma a avaliar a existência de uma correlação entre as características morfológicas e a análise genética nas duas populações de oliveiras (centenárias e novas), procedeu-se à aplicação do teste de *Mantel* (Mantel, 1967). As matrizes de distâncias dos dados morfológicos de todos os órgãos analisados (fruto, endocarpo e folha) e dos dados genéticos foram estimadas utilizando os índices de similaridade *Bray-Curtis* e distâncias Euclidianas. As matrizes obtidas foram correlacionadas utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* ( $r$ ).

Os resultados obtidos indicam que, para ambas as populações de oliveiras, a análise morfológica dos três órgãos avaliados se correlacionam positivamente, de forma altamente significativa, com a análise genética ( $> 0,89$  para o fruto,  $> 0,62$  para a folha e  $> 0,56$  para o endocarpo; Tabela 30).

No que concerne à população de oliveiras centenárias, as características morfológicas do fruto ( $> 0,84$ ;  $p < 0,001$ ) foram as que apresentaram maior coeficiente de correlação com a análise genética, seguida pela folha ( $> 0,73$ ;  $p < 0,001$ ) e o endocarpo ( $> 0,57$ ;  $p < 0,001$ ). Esta correlação diminuiu quando considerado a totalidade dos três órgãos avaliados ( $> 0,47$ ;  $p < 0,001$ ).

Por sua vez, na população de oliveiras novas, as características relacionadas com o fruto ( $> 0,93$ ;  $p < 0,001$ ) foram as que apresentaram maior coeficiente de correlação com a análise genética, seguida pelo endocarpo ( $> 0,70$ ;  $p < 0,001$ ) e a folha ( $> 0,39$ ;  $p < 0,001$ ). Quando consideradas as características morfológicas dos três órgãos no seu conjunto, a correlação com a análise morfológica não se verificou. Esta alta correlação entre as características morfológicas, em especial relacionadas com o fruto, e a análise genética das duas populações significa a existência de uma certa dependência entre os caracteres morfológicos e moleculares utilizados neste estudo. A alta correlação observada pode ser explicada pelo elevado número de caracteres morfológicos avaliados. Apesar dos marcadores morfológicos se encontrarem relacionados com os moleculares, os segundos apresentam a vantagem de permitir a análise de marcas polimórficas sem a influência do ambiente, num curto espaço de tempo.

**Tabela 30-** Coeficiente de correlação de *Pearson* ( $r$ ) para o fruto, endocarpo, folha e total dos órgãos, para a população de oliveiras centenárias, novas e ambas as populações, com base no índice de similaridade *Bray -Curtis* e nas distâncias Euclidianas.

		$r$ ( <i>Bray-Curtis</i> )	$r$ ( <i>Distância Euclidiana</i> )
Oliveiras Centenárias	Fruto	0,844***	0,860***
	Endocarpo	0,775***	0,570***
	Folha	0,734***	0,770***
	Total órgãos	0,469***	0,466***
Oliveiras Novas	Fruto	0,931***	0,927***
	Endocarpo	0,757***	0,697***
	Folha	0,388***	0,567***
	Total órgãos	0,176 <sup>NS</sup>	-0,024 <sup>NS</sup>
Oliveiras Novas e Centenárias	Fruto	0,886***	0,909***
	Endocarpo	0,736***	0,563***
	Folha	0,616***	0,695***
	Total órgãos	0,265***	0,155***

Legenda: \*\*\*  $p < 0,001$ ; NS- Não Significativo

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam ainda o maior poder discriminante do marcador molecular (microssatélites), o que pode ser atribuído à possibilidade de uma maior cobertura do genoma, ao contrário dos marcadores morfológicos, que ocorrem em menor número.





# Capítulo 5

## Conclusão





O presente estudo tinha como objetivo geral caracterizar morfológicamente (fruto, endocarpo e folha) e molecularmente (por análise de microssatélites) oliveiras centenárias e cultivares tradicionais presentes em Trás-os-Montes, especificamente na região de Mirandela. Tanto quanto se sabe, este é o primeiro estudo realizado em Portugal, cujos resultados esperam-se que contribuam para um melhor conhecimento da diversidade genética e das relações filogenéticas entre os indivíduos das duas populações de oliveiras amostradas, centenárias e tradicionais (designadas doravante por novas).

Os resultados obtidos da análise morfológica dos três órgãos mostraram que, quando considerados em conjunto, não permitiam a completa diferenciação das duas populações de oliveiras (centenárias e novas). De entre os órgãos avaliados, o endocarpo foi o que mais contribuiu para a diferenciação das duas populações. A população de oliveiras novas diferenciou-se, adicionalmente, devido a caracteres morfológicos relacionados com as folhas, nomeadamente a forma (lanceolada) e o seu comprimento, bem como a forma do fruto (alongada). As oliveiras centenárias diferenciaram-se, fundamentalmente, devido a características relacionadas com o fruto, para além do endocarpo. Estas árvores apresentavam, em média, frutos com peso, comprimento, diâmetros máximo e mínimo superior e endocarpos com peso, diâmetros máximo e mínimo superior.

A nível genético, os 12 *loci* utilizados neste estudo permitiram detetar 74 alelos nas 32 oliveiras, obtendo uma média de 4,96 alelos por *locus*. Os *loci* mais polimórficos foram o UDO-043, DCA9, DCA16 e DCA18 (5 alelos) nas oliveiras novas e o *locus* DCA18 (10 alelos) nas oliveiras centenárias. A elevada diversidade genética observada ao nível das 32 oliveiras foi ainda confirmada pelos diversos parâmetros de diversidade calculados ( $N_a = 4,96$ ;  $N_e = 3,22$ ;  $I = 1,24$ ;  $H_o = 0,73$  e  $H_e = 0,64$ ).

Relativamente à diversidade genética intra-populacional, os resultados mostraram que a população de oliveiras centenárias foi a que apresentou maior diversidade genética entre os indivíduos ( $N_a = 6,00$ ;  $N_e = 3,78$ ;  $I = 1,42$ ;  $H_o = 0,70$ ;  $H_e = 0,68$ ), comparativamente com a população de oliveiras novas ( $N_a = 3,92$ ;  $N_e = 2,66$ ;  $I = 1,07$ ;  $H_o = 0,76$ ;  $H_e = 0,60$ ). Similarmente, foi observado um maior número de alelos (72 alelos, 6 alelos/*locus*), inclusive privados (27 alelos), na população de oliveiras centenárias face à população de oliveiras novas (47 alelos, 3,92 alelos/*locus*, com apenas 2 alelos privados). A elevada quantidade de alelos privados, associados à sua baixa frequência (41% dos alelos privados apresentavam frequências  $\leq 0,029$ ), registados ao nível das

oliveiras centenárias sugere que estes alelos possam ter tido origem de fenómenos de deriva genética.

A observação de valores  $H_o$  superiores aos de  $H_e$ , tanto ao nível da população de oliveiras centenárias como da população de oliveiras novas, evidencia a existência de um excesso de heterozigóticos. Apesar do baixo valor  $F_{ST}$  observado (0,030), a análise *structure* diferenciou as oliveiras novas das centenárias. Esta análise indicou, adicionalmente, a existência de um certo grau de relacionamento entre oliveiras novas e centenárias, sugerindo a possibilidade de algumas oliveiras novas terem origem de oliveiras centenárias.

Dos 12 *loci* analisados, UDO-011 e DCA18, foram os que permitiram uma maior diferenciação das duas populações de oliveiras. Estes *loci*, juntamente com os *loci* que originaram alelos privados nas oliveiras centenárias, apresentam um grande potencial para a certificação destas oliveiras.

O teste de *Mantel* evidenciou que as características morfológicas avaliadas nos três órgãos, e em especial as relacionadas com o fruto, se correlacionavam positivamente de forma altamente significativa com a análise genética. Esta correlação, observada ao nível das duas populações de oliveiras estudadas, poderá ter resultado do elevado número de caracteres morfológicos avaliados.

Em suma, com base nos resultados obtidos é recomendável a conservação da população de oliveiras centenárias pelo facto de apresentar uma grande diversidade genética e uma grande quantidade de alelos privados, sugerindo a existência de algum grau de evolução ou adaptação destas oliveiras às condições edafoclimáticas da região Transmontana. Neste processo deverá ser incluído, em especial, as oliveiras C1, C8 e C11, por terem uma maior diversidade genética.

## Referências Bibliográficas





- Addinsoft. (2008). *XLSTAT* data analysis and statistics add-in for MS Excel. Paris, France.
- Alves, M. (2007). Caracterização e Estrutura Genéticas da Cultivar de Oliveira “Cobrançosa” e sua Relação com o Zambujeiro. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre na Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Anónimo. (2008). Caracteres utilizados en la descripción de las fichas varietales. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Baldoni, L., Cultrera, N., Mariotti, R., Ricciolini, C., Arcioni, S., Vendramin, G., *et al.* (2009). A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding*, 24(3), p. 213-231.
- Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B. (2004). Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica* 136, p. 93–102.
- Ben-Ayed, R., Kamoun-Grati, N., Rebai, A. (2013). An overview of the authentication of olive tree and oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol.12, p. 218-227.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30, p. 449-462.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., Trujillo, I. (2009). SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122, p. 209-215.
- Bray J., Curtis J. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27, p. 325-349
- Cabral, E. (2008). Caracterização Molecular de Variedades de Nogueira (*Juglans regia* L.) Portuguesas. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre na Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- Cançado, G., Sant’Ana, G., Val, A., Ferreira, J. (2012). Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira. Capítulo 8, p. 225-249. ISBN: 9788599764275
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, p. 301–307.

- Charafi, J., El Meziane, A., Moukhli, A., Boulouha, B., El Modafar, C., Khadari, B. (2008). Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR *locus*-based genetic study. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), p. 893-900.
- Cicatelli, A., Fortunati, T., De Feis, I., Castiglione, S. (2013). Oil composition and genetic biodiversity of ancient and new olive (*Olea europaea* L.) varieties and accessions of southern Italy. *Plant Science* 210, p. 82-92.
- Cipriani, G., Marrazzo, M., Marconi, R., Cimato, A., 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, p. 223-228.
- Cobo, Miguel, *et al.* (1998). *Diseño y Manejo de Plantaciones de Olivar*. Sevilla. Dirección General de Investigación y Formación Agraria, Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- COI - Conselho Oleícola Internacional (1997) *Projet sur la "conservation, caractérisation, collet et utilisation des ressources génétiques de L'oliver (RESGEN-CT 96/97)*. Communauté Européene.
- COI - Conselho Oleícola Internacional. *Country Profiles*. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/136-country-profiles>  
Acedido a 22 de Junho de 2014.
- COI - Conselho Oleícola Internacional. *World Olive Oil Figures*. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>  
Acedido a 4 de Julho de 2014.
- COI - Conselho Oleícola Internacional. *World Table Olive Figures*. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>  
Acedido a 4 de Julho de 2014.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Doveri, S., Maestri, E., Marmioli, N., Reale, S., *et al.* (2007). Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *Journal of biotechnology*, 129, p. 565-574.
- Cortés, I., Hernández, D. (2006). *Varietades de olivo y composición de sus aceites en el oeste del mediterráneo*. Phytoma, Espanha.
- Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M. (2012). Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science & Technology*, 26, p. 43-55



- De la Rosa, R., James, C., Tobutt, K. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. *Molecular Ecology Notes*, 2, p. 265-267.
- Díaz, A., De la Rosa, R., Martín, A., Rallo, P. (2006). Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genetics & Genomes*, 2, p. 165-175.
- Doni, M. (2004). Análise de *cluster*: métodos hierárquicos e de particionamento. Faculdade de Computação e Informática, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
- Doveri, S., Baldoni, L. (2007). Olive. In: *Fruit and Nuts*. C. Kole (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, volume 4, p. 253-256.
- Earl, D., VonHoldt, B. (2011). *STRUCTURE HARVESTER*: a website and program for visualizing *STRUCTURE* output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, p. 359–361.
- Enferadi, S., Rabiei, Z. (2013). Challenges for Genetic Identification of Olive Oil. *Intech*, p. 201-218.
- Estatísticas Agrícolas 2012, Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas Oficiais, Edição 2013.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider S. (2005). *Arlequin* version. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, p. 47-50.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations*.  
<http://faostat.fao.org/>  
 Acedido a 5 de julho de 2014
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K., Gilani, A., Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, p. 3291-3340.
- Giménez, M., Pistón, F., Martín, A., Atienza, S. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chemistry*, 118 (2), p. 482-487.
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., Guedes-Pinto, H. (2012). Olive tree genetic resources characterization through molecular markers. *Genetic Diversity in Plants*, p. 15-28.

- Gratani, L. (2014). Plant Phenotypic Plasticity in Response to Environmental Factors. *Advances in Botany*, Article ID 208747, p. 17.
- Gregoriou, K., Pontikis, K., Vemmos, S. (2007). Effects of reduced irradiance on leaf morphology, photosynthetic capacity, and fruit yield in olive (*Olea europaea* L.). *Photosynthetica*, 45 (2), p. 172-181.
- Hartl, D., Clark, A. *Princípios de Genética de Populações*. 4ª edição. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.
- Hammer, O., Harper, D., Ryan, D. (2001). *PAST*: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, p. 1-9.
- Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., Oz, A., Tangu, N., Ipek, M. (2009). SSR analysis demonstrates that olive production in the southern Marmara region in Turkey uses a single genotype. *Genetics and Molecular Research*, 8 (4), p. 1264-1272.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. (2007). *CLUMPP*: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806.
- Kalia, R., Rai, M., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, p. 309-334.
- Khadari, B., Charafi, J., Moukhli, A., Ater, M. (2008). Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genetics & Genomes*, 4(2), p. 213-221.
- Koehmstedt, A., Aradhya, M., Soleri, D., Smith, J., Polito, V. (2010). Molecular characterization of genetic diversity, structure, and differentiation in the olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection of the United States Department of Agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution*.
- La Mantia, M., Guerin, J., Sedgle, M., Barone, E. (2006). Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers. *Actes Editions*, Rabat, p. 9-14.
- Leitão, F., Pontes, M., Calado, M., Almeida, F. (1986). Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Direção Geral do Planeamento e Agricultura, Lisboa.
- Li, Z., Yu, D. (2009). Factors affecting leaf morphology: a case study of *Ranunculus natans* C. A Mey. (Ranunculaceae) in the arid zone of northwest China. *Ecological research*, 24 (6), p. 1323-1333.

- Lischer, H., Excoffier, L. (2012). *PGDSpider*: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* 28, p. 298–299.
- Loussert, R., Brousse, G. (1980). *El olivo*. Madrid: Mundi-Prensa, 1980. p. 533.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, p. 209-220.
- Muzzalupo, I., Lombardo, N., Salimonti, A., Pellegrino, M., Perri, E. (2008). Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, p. 254-286.
- Nogueira, F. (2012). Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre no Instituto Politécnico de Bragança.
- Omrani-Sabbaghi, A., Shahriari, M., Falahati-Anbaran, M., Mohammadi, S., Nankali, A., Mardi, M., Ghareyazie, B. (2007). Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. *Scientia Horticulturae*, 112, p. 439-447.
- Peakall, R., Smouse, P. (2006). *GENALEX 6*: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *6.4 Molecular Ecology Notes*. 6, p. 288-295.
- Penna, L. (2010). Frequência alélicas de 14 locos do cromossomo X de indivíduos da região sul do Brasil. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Peres, A., Baptista, P., Malheiro, R., Dias, L., Bento, A., Pereira, J. (2011). Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 105, p. 65-73.
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, Pittsburg, v. 155, p. 945-959.
- Rabiei, Z., Enferadi, S. (2012). Traceability of origin and authenticity of olive oil. *Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. InTech. p. 163-184.
- Regulamento (CE) N.º 510/2006 DO CONSELHO, de 20 de Março de 2006.

- Rekik, I., Salimonti, A., Kamoun, N., Muzzalupo, I., Lepais, O., Gerber, S., *et al.* (2008). Characterization and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *HortScience*, 43, p. 1371-1376.
- Rencher, A. (1995). *Methods of multivariate analysis*. New York: Willey.
- Rosenberg, N. (2004). *DISTRUCT*: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, p. 137-138.
- Rotondi, A., Beghè, D., Fabbri, A., Ganino, T. (2011). Olive oil traceability by means of chemical and sensory analyses: A comparison with SSR biomolecular profiles. *Food Chemistry*, 129, p. 1825-1831.
- Roubos, K., Moustakas, M., Aravanopoulos, F. (2010). Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite *loci*. *Genetics and Molecular Research* 9 (3), p. 1865-1876.
- Royer, D., Meyerson, L., Robertson, K., Adams, J. (2009). Phenotypic plasticity of leaf shape along a temperature gradient in *Acer rubrum*. *PLoS One*, 4 (10), p. 1-7.
- Sá, O., Pereira, J., Baptista, P. (2011). Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (6), p. 4156-4164.
- Sabino Gil, F., M. Busconi, Da Câmara Machado, A., Fogher, C. 2006. Development and characterization of microsatellite *loci* from *Olea europaea*. *Molecular Ecology Notes* 6, p. 1275-1277.
- Salimonti, A., Simeone, V., Cesari, G., Lamaj, F., Cattivelli, L., Perri, E., *et al.* (2013). A first molecular investigation of monumental olive trees in Apulia region. *Scientia Horticulturae*, 162, p. 204-212.
- Sambrook, J., Fritsh, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saramago, I. (2009) *Olival em modo de produção biológico*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre no Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária.
- Sarri, V., Baldoni, L., Porceddu, A., Contento, A., Cultrera, N., Frediani, M., Cionini, P. (2006). Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*, 49 (12), p. 1606-1615.
- Sefc, K., Lopes, M., Mendonça, D., Rodrigues Dos Santos, M., Da Câmara Machado, M., Da Câmara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite *loci* in olive

- (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9, p. 1171–1173.
- Sousa, A. (2005). Caracterização Morfológica e Físico-Química de Cultivares de *Olea europaea* L.. Trabalho fim de curso. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- Vieira de Souza, R., Ferreira, J., Braga, F., de Azevedo, P., Sant'Ana, G., Ribeiro, A., *et al.* (2012). Outcrossing rate in olive assessed by microsatellite and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11 (53), p. 11580-11584.
- Tavares, A. (2007). Análise da estruturação genética da sub-espécie *Patella candei gomesii* Drouet 1858 (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) no arquipélago dos Açores. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre na Faculdades de Ciências da Universidade do Porto.
- Trujillo, I., Ojeda, M., Urdiroz, N., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez, C. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10, p. 141-155.
- Val, A. (2011). Caracterização genética de oliveira utilizando marcadores moleculares. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor na Universidade Federal de Lavras.
- Wright, S. (1965). *Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago, USA, v.2.
- Yildiz, F. (2010). *Advances in food biochemistry*. CRC press.
- Zaher, H., Boulouha, B., Baaziz, M., Sikaoui, L., Gaboun, F., Udupa, S. (2011). Morphological and genetic diversity in olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) clones and varieties. *Plant Omics Journal*, 4 (7), p. 370-376.



**Anexos**







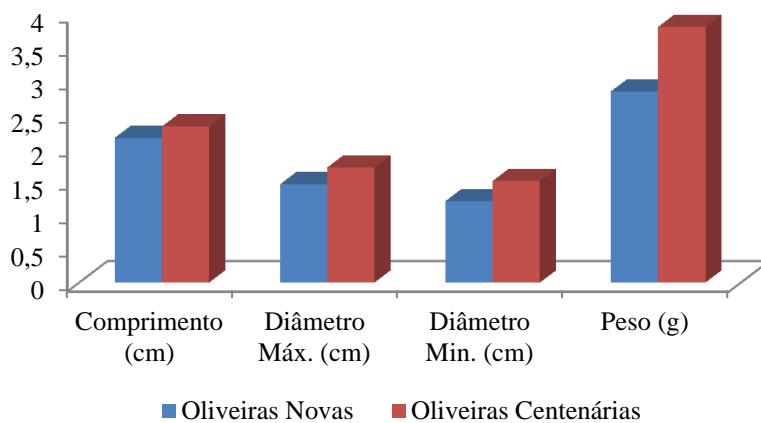
---

# Anexo I

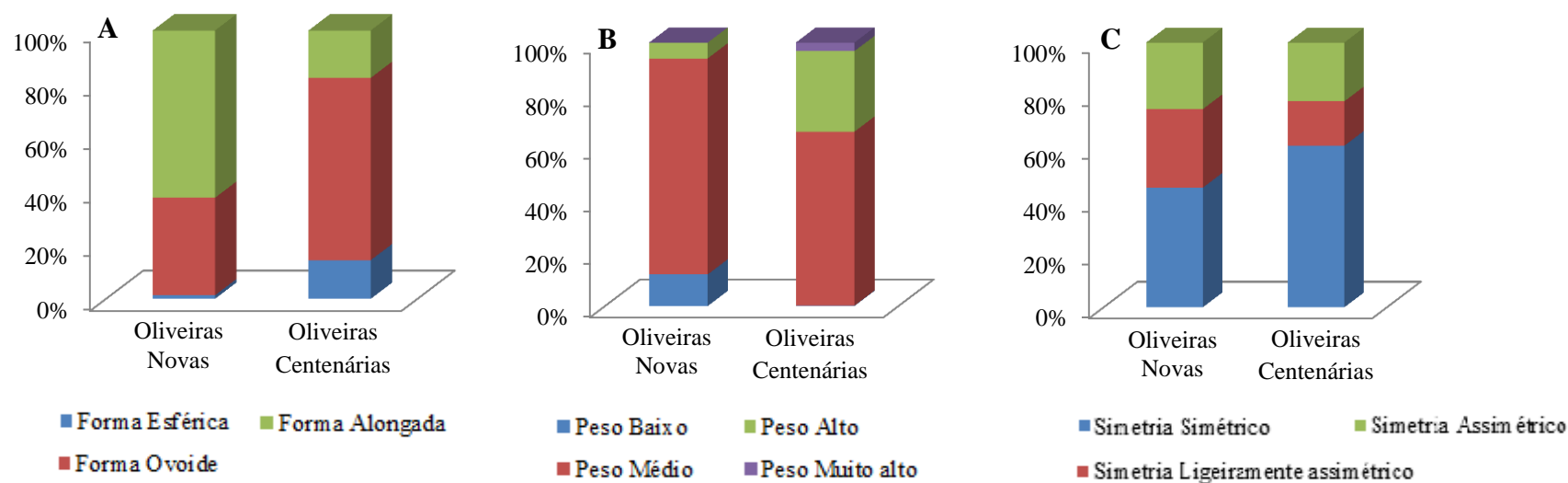
**Tabela 1-** Valores de  $\Delta K$ 

<b>K</b>	<b>Repetição</b>	<b>Mean LnP(K)</b>	<b>Stdev LnP(K)</b>	<b>Ln'(K)</b>	<b> Ln''(K) </b>	<b><math>\Delta K</math></b>
1	20	-1056.595000	0.588016	-	-	-
2	20	-840.450000	7.953185	216.145000	69.510000	8.739894
3	20	-693.815000	0.239022	146.635000	135.515000	566.955870
4	20	-682.695000	1.226666	11.120000	28.635000	23.343755
5	20	-700.210000	21.512638	-17.515000	4.085000	0.189888
6	20	-713.640000	14.452878	-13.430000	-	-

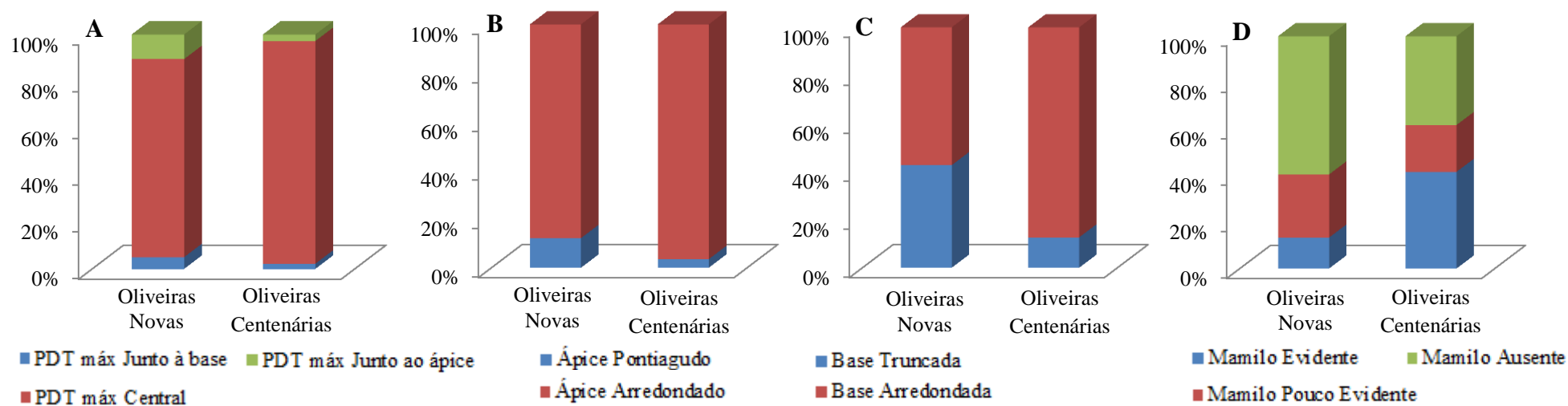
## Anexo II



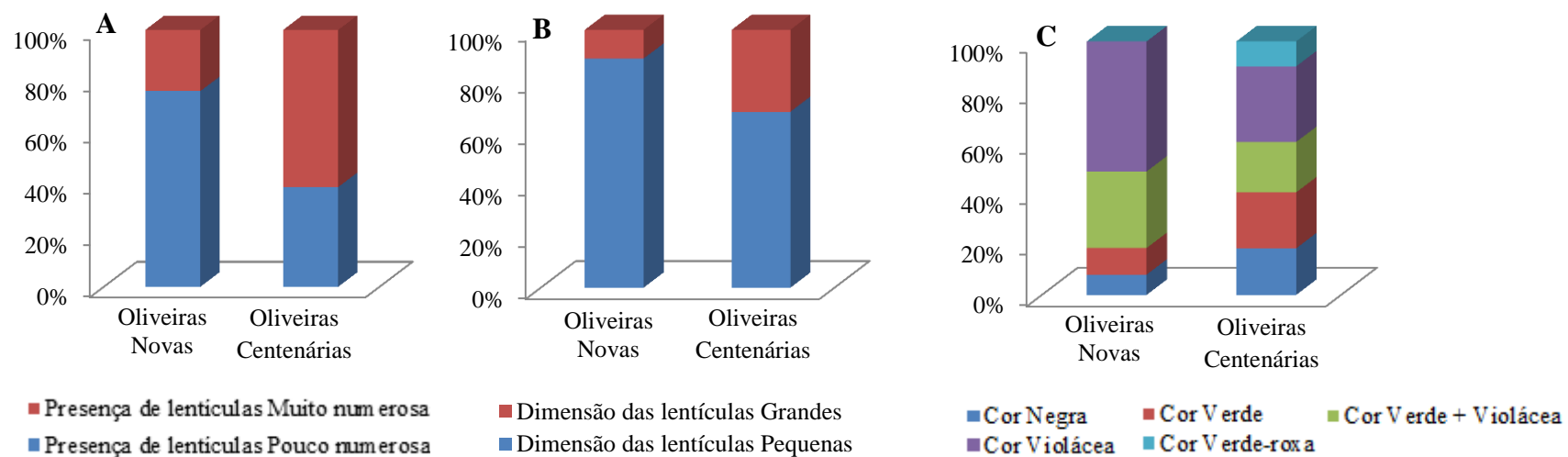
**Figura 1-** Valores médios do comprimento, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e peso do fruto avaliados na população de oliveiras novas (n= 600) e centenárias (n= 680).



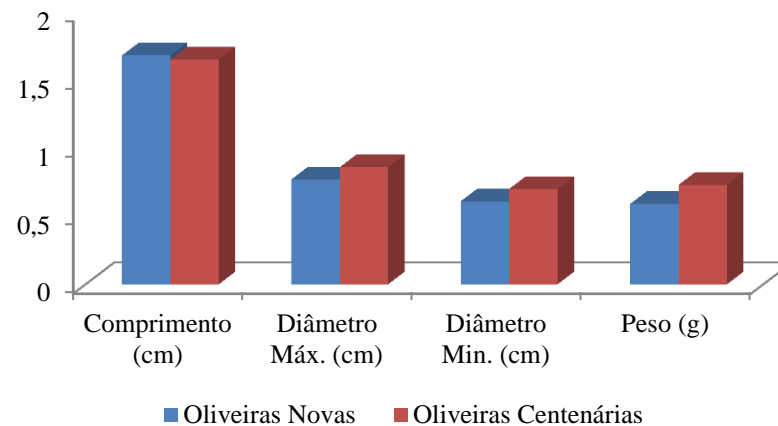
**Figura 2-** Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à forma (A), peso (B) e simetria (C).



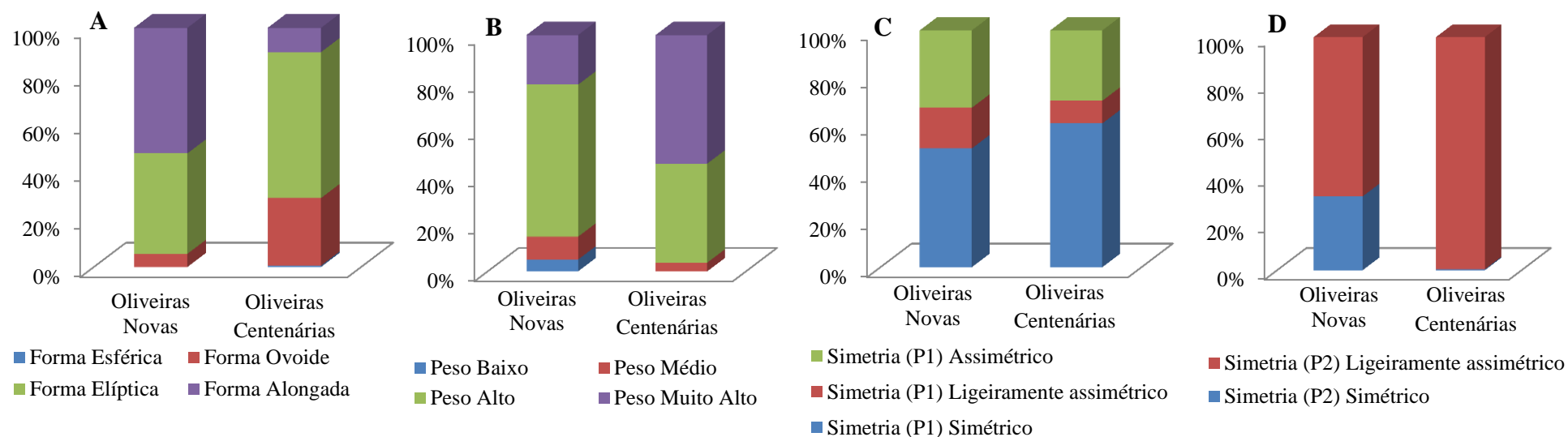
**Figura 3-** Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à PDT máx (A), ápice (B), base (C) e mamilo (D).



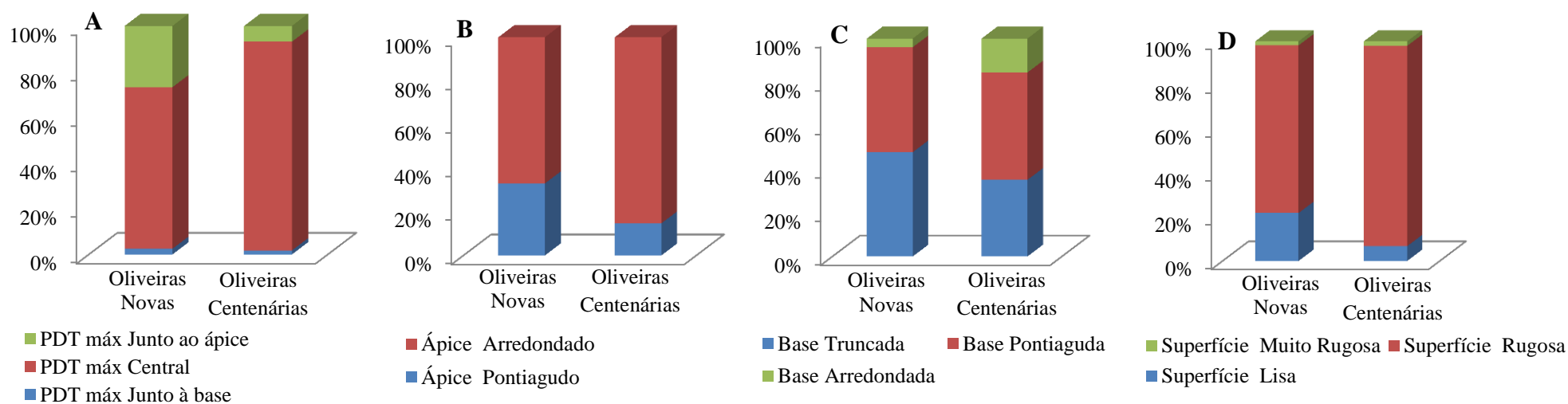
**Figura 4-** Características morfológicas do fruto, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à presença (A) e dimensão (B) das lenticulas e cor (C).



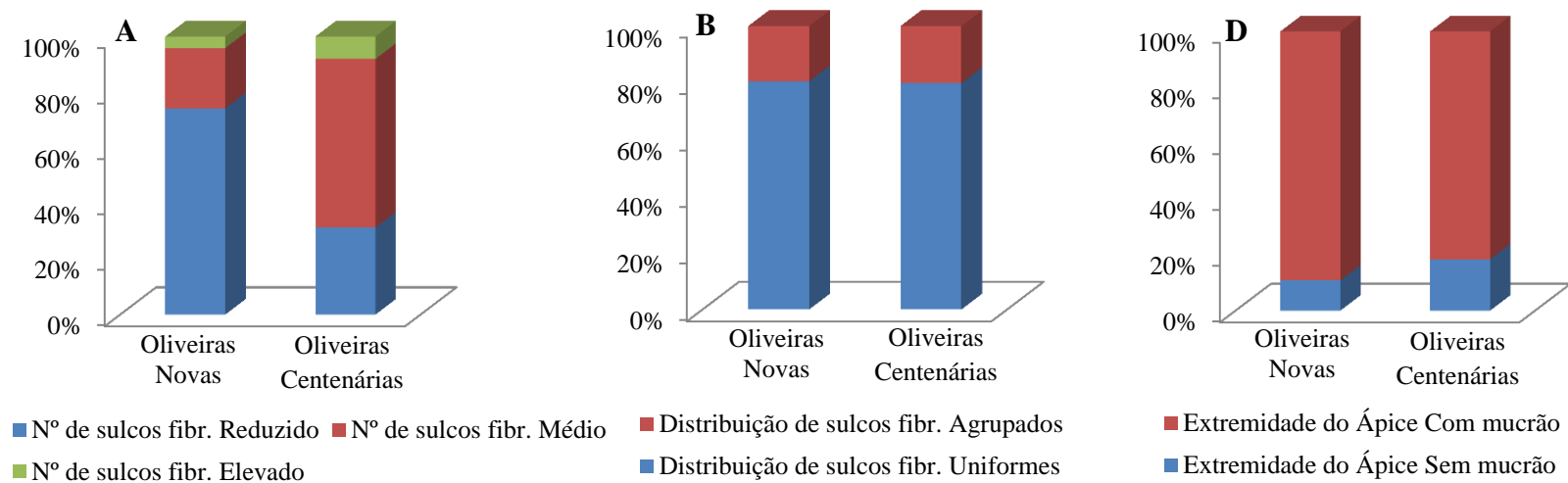
**Figura 5-** Valores médios do comprimento, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e peso do endocarpo avaliados na população de oliveiras novas (n= 600) e centenárias (n= 680).



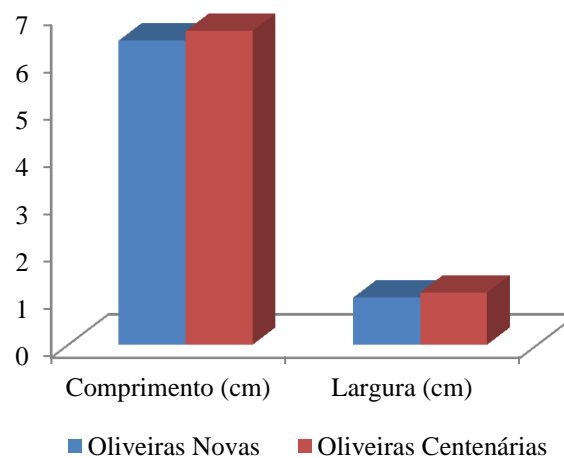
**Figura 6-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à forma (A), peso (B), simetria na posição 1 (C) e 2 (D).



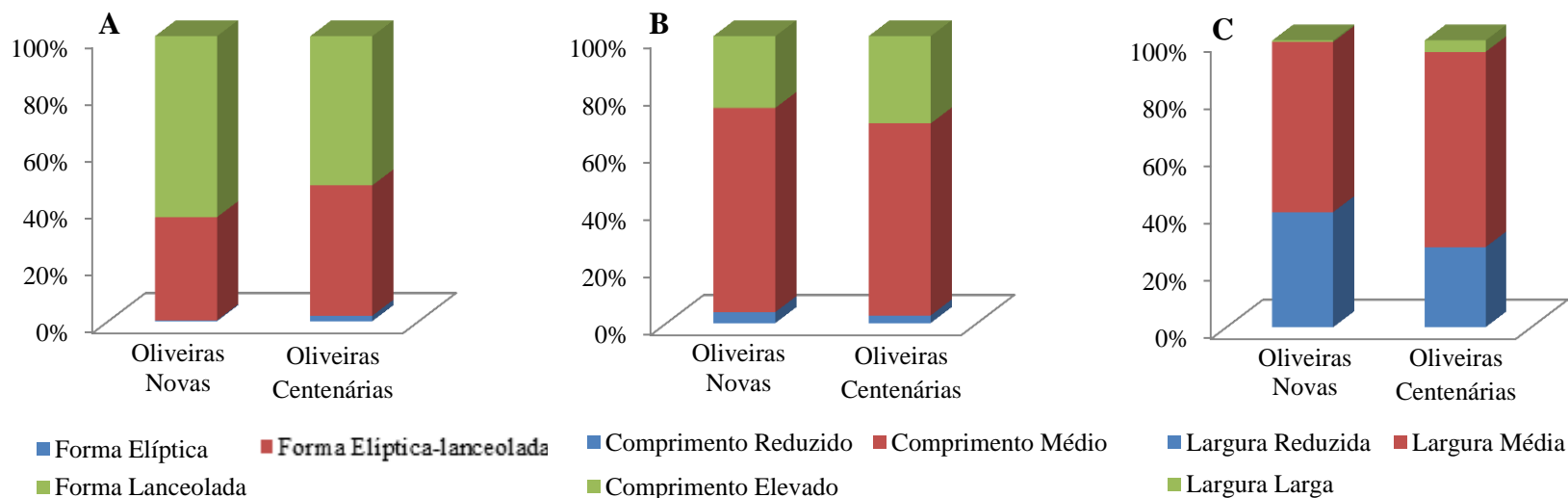
**Figura 7-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à PDT máx (A), ápice (B), base (C) e superfície (D).



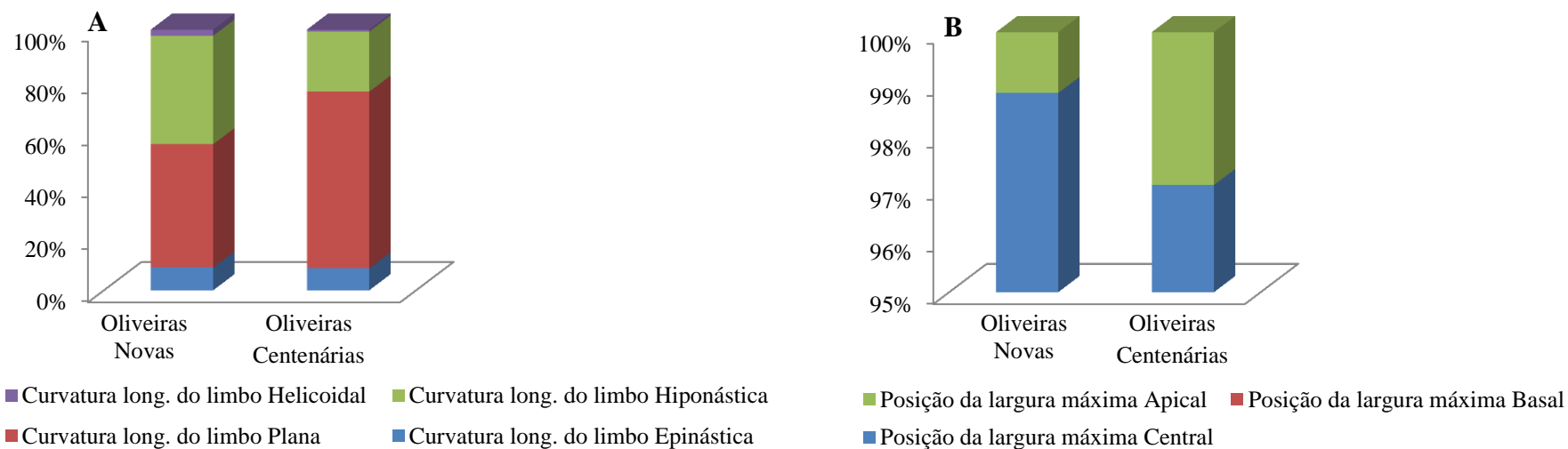
**Figura 8-** Características morfológicas do endocarpo, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas ao nº de sulcos fibrovasculares (A), distribuição de sulcos fibrovasculares (B) e extremidade do ápice (C).



**Figura 9-** Valores médios do comprimento e largura da folha avaliados na população de oliveiras novas (n= 600) e centenárias (n= 680).



**Figura 10-** Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à forma (A), comprimento (B) e largura (C).



**Figura 11-** Características morfológicas da folha, em percentagem de ocorrência, nas oliveiras novas e centenárias relativas à curvatura longitudinal do limbo (A) e posição da largura máxima (B).