

# REVISTA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VOLUME XXI

NÚMEROS 1-2-3 e 4

Jan.-Dez. 1998

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA  
DIRECÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA DE TRÁS-OS-MONTES  
UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO  
UNIVERSIDADE DE ÉVORA

## I SIMPÓSIO NACIONAL DE OLIVICULTURA

15-18 DE SETEMBRO DE 1998  
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA

### EDIÇÃO ESPECIAL

SOCIEDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE PORTUGAL

Fundada em 1903

Lisboa

# ESTUDO DA VARIABILIDADE DE POPULAÇÕES DE *Olea europaea* L. ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS ISOENZIMÁTICOS — RESULTADOS PRELIMINARES

POR

CARLOS M. G. REIS \*  
SANDRA ZAZARTE

---

## ABSTRACT

Polyacrilamide gel electrophoresis was employed to elucidate the differences in isoenzyme banding patterns among three varieties of *Olea europaea* L. (Galega, Bical and Cordovil), from the Central Northeast part of Portugal. Three leaf and pollen enzyme systems — EST, ACP and PRX— were studied. Activity for PRX and EST was found in leaves. However PRX zymograms did not show polymorphic bands. Activity for the three enzyme systems was detected in pollen; but due to the low enzyme expression for PRX and ACP comparative studies were carried out only for EST. The leaf EST zymograms showed two polymorphic bands and the pollen EST zymograms showed four polymorphic bands. No intra population variation was observed in the trees studied. The results obtained for both leaf and pollen esterase made it possible to identify the three olive varieties.

## RESUMO

No sentido de identificar três variedades de oliveira (Galega, Bical e Cordovil), da região de Castelo Branco, foram realizadas análises de electroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida. Foram estudados três sistemas enzimáticos — EST, ACP e PRX. Nas folhas foi detectada actividade para os sistemas PRX e EST, contudo o sistema PRX não apresenta bandas polimórficas. No pólen, detectou-se actividade para os três sistemas, contudo, devido à baixa expressão de PRX e ACP, foram realizados estudos comparativos

---

(Abbreviations: EST — esterase; PRX — peroxidase; ACP — acid phosphatase.

\* Lab. Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária, 6000 Castelo Branco, Portugal.

Revista de Ciências Agrárias.

apenas para o sistema EST. Os zimogramas de EST da folha apresentam 2 bandas polimórficas permitindo a definição de 2 padrões isoenzimáticos. Os zimogramas do pólen apresentam 4 bandas polimórficas sendo possível definir 3 padrões de bandas. Nas árvores estudadas não foi detectada variabilidade intravarietal. Os resultados obtidos com o sistema enzimático EST permitem a identificação das três variedades estudadas.

## INTRODUÇÃO

O estudo dos polimorfismos isoenzimáticos é uma forma de análise da variabilidade genética em populações vegetais, sendo uma das utilizações primárias a identificação varietal. As isoenzimas podem ser utilizadas como marcadores moleculares, sendo possível, dada a natureza codominante da sua expressão, determinar o seu controlo genético.

Em oliveira são vários os trabalhos realizados com isoenzimas do pólen e da folha (Pontikis *et al.*, 1980; Trujillo *et al.*, 1990; Ouazzani *et al.*, 1993; Hilali e El Antari, 1994). Ao contrário da folha, onde ocorre facilmente a precipitação e desnaturação das proteínas (Patumi *et al.*, 1994), o pólen apresenta a vantagem de apresentar baixo nível de compostos metabólicos secundários responsáveis pela degradação das proteínas. Contudo, quando se pretende estudar o determinismo genético das isoenzimas a utilização de pólen pode trazer complicações adicionais na interpretação dos zimogramas. Além disso, a disponibilidade de pólen ocorre num espaço de tempo muito curto. A utilização da folha, desde que se resolvam os problemas associados à extracção, apresenta vantagens já que se encontra disponível durante todo o ano. Ainda relativamente ao pólen, a interpretação genética dos zimogramas torna-se mais simplificada, desde que se disponha de progénies provenientes de cruzamentos controlados.

Os objectivos deste estudo são: i) o desenvolvimento de uma metodologia adequada à extracção e separação electroforética das isoenzimas do pólen e da folha; ii) a identificação de variedades; iii) a análise de diferentes populações no sentido de verificar se existe variabilidade intra-varietal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se folhas completamente expandidas, mas com idade inferior a um ano. Foi utilizada a solução de extracção, adaptada de Wendel e Weeden (1990), com ligeiras modificações, constituída por: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7% Sacarose, 5% PVP, 14 mM Mercaptoetanol (0.1% v/v), 250 mM Ácido ascórbico (Na sal), 20 mM Metabisulfito de sódio e 200 mM Tetraborato de Sódio. A relação volume de solução de extracção para peso de amostra foi de 2:1. Após a maceração dos tecidos folheares com a solução de extracção, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, durante 20 min., e a uma temperatura de sensivelmente 6°C.

As enzimas do pólen foram extraídas com a solução 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% mercaptoetanol (v/v), 5% PVP, 10% glicerol e 100mM EDTA, de acordo com Hilali e El Antari (1994), com ligeiras alterações. A relação volume de solução de extracção para peso de amostra foi de 4:1. Após um período de extracção de 60 min, à temperatura de sensivelmente 6°C, realizou-se a centrifugação das amostras em condições idênticas às descritas para o órgão folha.

As electroforeses de zona descontínua foram realizadas num aparelho Phastsystem da firma Pharmacia, tendo-se utilizado os géis de poliacrilamida (43 × 50 × 0.45 mm): homogéneo 12,5 e gradiente 8-25 (Tabela 1). O tampão de gel original foi substituído, por lavagem durante 30 min (3 × 20 ml), tendo-se utilizado diferentes sistemas tampão para as enzimas esterase (EST), peroxidase (PRX) e fosfatase ácida (ACP) (Tabela 2). A frente de migração foi identificada com azul de bromofenol.

A detecção das enzimas foi realizada de acordo com Wendel e Weeden (1990).

**Tabela 1 — Condições de separação**

Passo	Voltagem	Corrente (mA)	Potência (W)	Temp (°C)	Duração (VhA)
1	40	3.6	0.1	15	10
2	200	12.5	2.6	15	55 (a) 80 (a)

(a) A duração das separações variou entre 30 a 45 minutos, de acordo com as soluções tampão de gel e de electrodos utilizadas.

**Tabela 2 — Composição das soluções tampão**

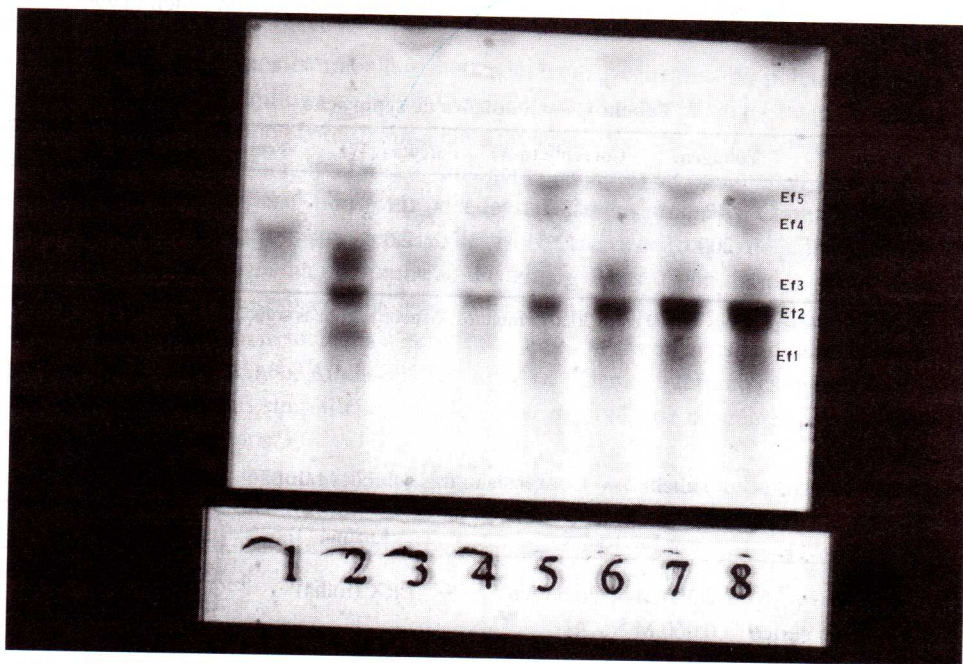
Gel	Eléctrodos	Enzima	Referência
0.015 M Tris 0.004 M ácido cítrico pH 7.8	0.300 M ácido bórico 0.060 M NaOH pH 8.2	PRX (folha)	Ouazzani et al (1993)
0.052 M Tris 0.007 M ácido bórico pH 8.4	0.030 M hidróxido de lítio 0.192 M ácido bórico pH 8.2	EST e ACP (folha)	Ouazzani et al (1993)
0,375 M Tris-HCl pH 8,8	0.025 M Tris-HCl 0.192 M glicina pH 8,3	EST, ACP e PRX (pólen)	Laemmli (1970)

PRX — peroxidase; EST — esterase; ACP — fosfatase ácida.

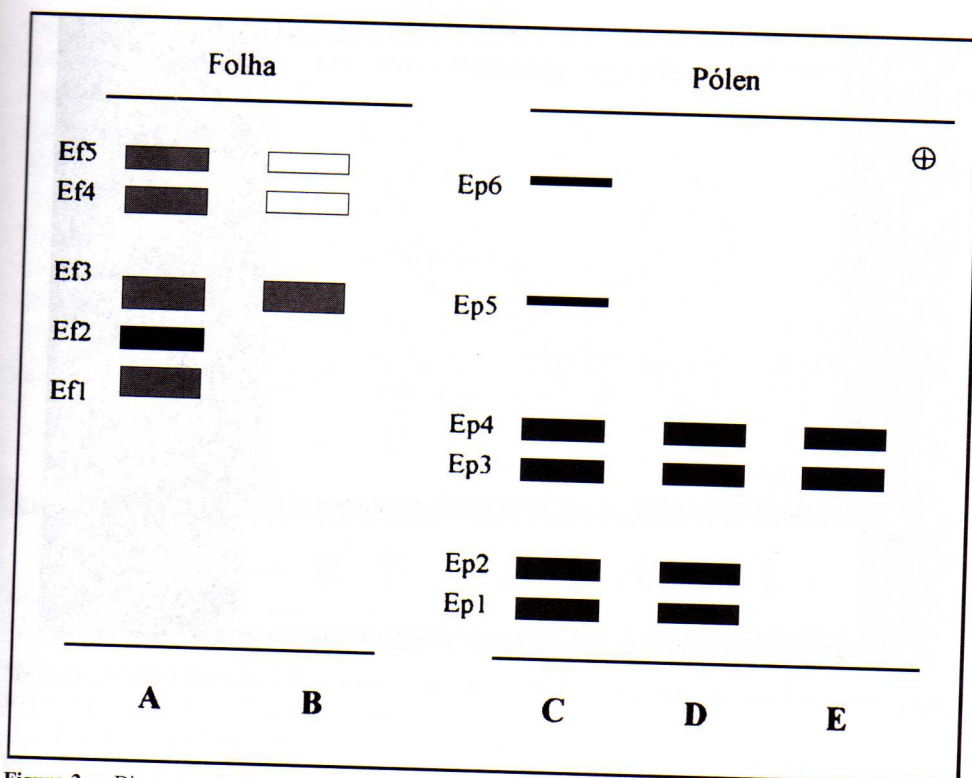
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados, dada a natureza preliminar deste estudo, referem-se apenas a um olival situado na Quinta da Sr.<sup>a</sup> de Mércules, em Castelo Branco.

Nas folhas foi detectada actividade enzimática para os sistemas PRX e EST, contudo o sistema PRX não apresenta bandas polimórficas. Não foi possível revelar bandas de fosfatase ácida. A análise dos zimogramas de esterase da folha (Figura 1) permite identificar 5 zonas de actividade (bandas) denominadas Ef1, Ef2, Ef3, Ef4 e Ef5, de acordo com a sua mobilidade relativa. Destas, 2 são polimórficas permitindo a definição de dois zimogramas (Figura 2). As bandas Ef1 e Ef2 não aparecem nos zimogramas da variedade Bical, existindo em Galega e Cordovil.



**Figura 1** — Zimogramas de esterase da folha de oliveira. 1 e 3 — Bical; 2 e 4 — Cordovil; 5, 6, 7 e 8 — Galega.



**Figura 2** — Diagramas de zimogramas da esterase em folha (A e B) e pólen (C, D e E) de oliveira. A — variedades Galega e Cordovil; B — variedade Bical; C — variedade Cordovil; D — variedade Galega; E — variedade Bical

No pólen, detectou-se actividade para os três sistemas enzimáticos, contudo, devido à baixa expressão de PRX e ACP, foram realizados estudos comparativos apenas para o sistema EST. Os zimogramas de EST do pólen (Figura 3) apresentam 6 zonas de actividade (bandas) as quais foram designadas Ep1, Ep2, Ep3, Ep4, Ep5 e Ep6, de acordo com a sua mobilidade relativa. Das bandas detectadas quatro são polimórficas, permitindo a definição de três diferentes zimogramas (Figura 2). O pólen permite a diferenciação das três variedades. A variedade Bical apresenta apenas as bandas Ep3 e Ep4; as bandas Ep1 e Ep2 existem em Galega e Cordovil, mas as bandas Ep5 e Ep6 são exclusivas de Cordovil.

Os resultados obtidos com o sistema enzimático esterase permitem a identificação das três variedades estudadas. Foram estudadas várias árvores para cada variedade; aparentemente não existe variabilidade intra-varietal.

O estudo será alargado a outros olivais da parte Sul do Distrito de Castelo Branco, prevendo-se a análise de vários sistemas enzimáticos. Serão realizadas separações electroforéticas para outras variedades nacionais e exóticas.

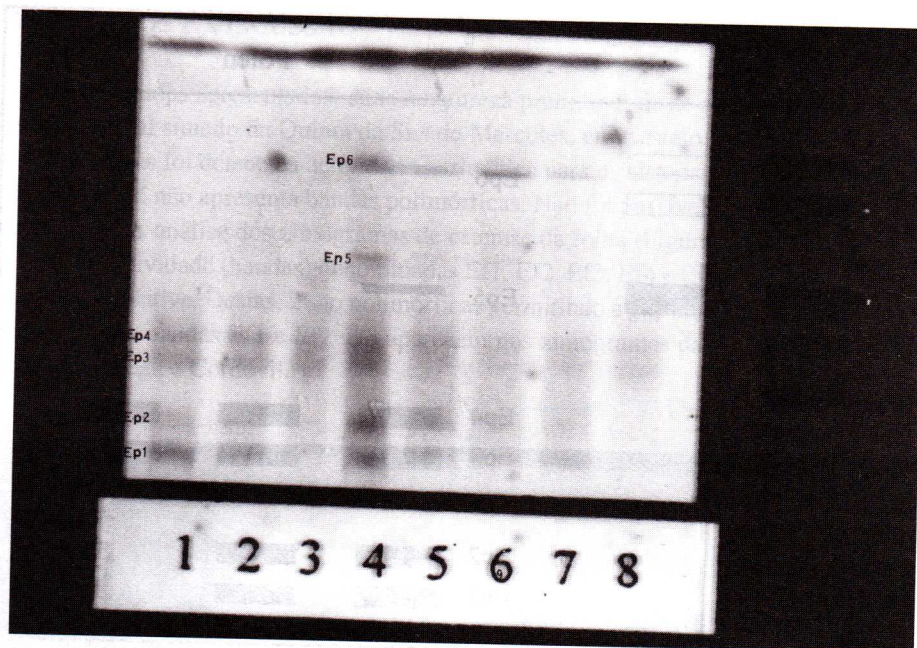


Figura 3 — Zimogramas de esterase do pólen de oliveira. 1 e 2 — Galega; 3 e 8 — Bical; 4, 5, 6 e 7 — Cordovil

## FINANCIAMENTO

O presente estudo é financiado pelo Programa PAMAF, projecto 6025, “O olival de azeitona Galega, Bical e Cordovil na parte Sul do Distrito de Castelo Branco — Selecção de morfotipos, caracterização isoenzimática e qualidade dos azeites elementares”

## REFERÊNCIAS

- HILALI, S. e EL ANTARI, A. (1994) Estudio del polimorfismo varietal en los cultivares de olivo fructíferos de Marrakech. *OLIVÆ* 50: 45-47.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- OUAZZANI, N., LUMARET, R., VILLEMUR, P. e DI GIUSTO, F. (1993) Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J Hered* 84:34-42.
- PATUMI, M., FONTANAZZA, G., NUCCI, R. e VACCARO, C. (1994) Preliminary studies on isoenzymatic and enzymatic activities isolated from olive plants. *Acta Hort.* 356:95-97.
- PONTIKIS, C., LOUKAS, M. e KOUSOUNIS, G. (1980) The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J. Hort. Sci.* 55: 333-343.
- TRUJILLO, I., RALLO, L., CARBONELL, E.A. e ASINS, M.J. (1990) Isoenzymatic variability of olive cultivars according to their origin. *Acta Hort.* 286: 137-140.
- WENDEL, J. F. e WEEDEN, N. F. (1990) *Visualization and interpretation of plant isozymes*. In *Isozymes in Plant Biology*. Douglas Soltis e Palmela Soltis (ed.). Chapman and Hall, London.