



INSTALAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE UM BANCO DE GERMOPLASMA DE PLANTAS-MATRIZES DE OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA L.*)

*Pedro Henrique Silvestre Duhatschek*¹; *Bruna Sisti Michelin de Polli*²; *Eduardo Augusto de Melo*²; *Maria Luiza Duarte Barbuti Teixeira*²; *Adriana Gonela*³; *Andréa Beatriz Diverio Mendes*⁴

¹ Mestrando do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias Universidade Estadual de Maringá,, PR. Bolsistas Capes. pg405983@uem.br

² Doutorandos do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias Universidade Estadual de Maringá, PR. Bolsistas CNPQ. brunadepolli@gmail.com
Bolsistas Capes. eaugusto_melo@hotmail.com
Bolsistas Capes. mallubarbuti@gmail.com

³ Docente do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias Universidade Estadual de Maringá, PR. agonela@uem.br

⁴ Docente do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR. abdmendes@uem.br

RESUMO

A olivicultura tem ganhado destaque no Brasil mesmo em estados como o Paraná, que não apresentam condições climáticas ideais para a frutificação da oliveira. Apesar disso, a planta se desenvolve bem vegetativamente na região, produzindo folhas ricas em compostos bioativos como oleuropeína, hidroxitiroso e ácidos triterpênicos, de interesse para as indústrias cosmética e de alimentos funcionais. Diante disso, o objetivo do projeto foi instalar e caracterizar morfológica e molecularmente um banco de germoplasma com as principais cultivares de oliveira recomendadas no país. Para a formação do banco, foram adquiridas mudas das cultivares Arbequina, Arbosana, Coratina, Frantoio, Manzanilla, Koroneiki e Picual. A análise molecular com marcadores SSR permitiu identificar e selecionar mudas geneticamente distintas, evitando a inclusão de clones. O Banco de Germoplasma de Oliveira da UEM (BGO/UEM) foi implantado com sucesso no Nupagri, em um sistema adensado de 3m x 3m, com preparo do solo contendo N-P-K, calcário e composto orgânico. Essa configuração favorece o manejo e a coleta de folhas. A caracterização morfológica das folhas, realizada em ramos de um ano de idade, confirmou que os acessos mantiveram as características foliares típicas de cada cultivar. A instalação do BGO/UEM representa uma base sólida para estudos futuros sobre compostos bioativos em condições climáticas locais. Além disso, oferece novas possibilidades de cultivo na região, voltadas à comercialização de folhas para as indústrias cosmética, de alimentos funcionais e nutracêuticos, diversificando a produção agrícola local.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos bioativos; marcadores SSR; microssatélites.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea L.*), pertencente à família Oleaceae, é uma das espécies mais antigas cultivadas globalmente. Sua origem é atribuída à região que abrange o sul do Cáucaso, as planícies do Irã, Palestina e a costa da Síria, estendendo-se também aos países mediterrâneos (Mesquita et al., 2006). Atualmente, esta espécie é cultivada em 75 países (FAO, 2024) e, aproximadamente, 2.000 cultivares de *O. europaea L.* estão referenciadas mundialmente. A Espanha se destaca como o maior produtor mundial de azeite de oliva, responsável por 45% da produção, enquanto os Estados Unidos são os maiores importadores (36%), seguidos pela União Europeia (15%), Brasil (8%), Japão (7%), Canadá (5%), China (4%), Austrália (3%) e Rússia (3%), que juntos somam 81% das importações. (IOC, 2025a)

No Brasil, a olivicultura é um setor relativamente jovem e em expansão, com pomares que têm, em média, 15 anos e área plantada excedendo 6.500 hectares. (MARQUES, 2020) Apesar do crescimento contínuo, a produção nacional de azeite na safra 2022/23 foi de 700 mil litros, representando apenas 0,7% do consumo interno, o que é insignificante frente à produção mundial de 3 milhões de toneladas (IOC, 2025b). A cultivar Arbequina, originária da Espanha, é a mais utilizada no Brasil, embora outras cultivares



como Arbosana, Ascolana Terena, Coratin, Koroneiki, Picual, Frantoio e Manzanilla também tenham sido testadas com sucesso.

O objetivo deste trabalho foi instalar um banco de germoplasma de plantas-matrizes das principais cultivares de oliveira recomendadas para o cultivo no Brasil e caracterizá-las morfológica e molecularmente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As mudas de oliveira foram adquiridas diretamente da empresa Agromillora Produção, localizada no município de Brotas, estado de São Paulo. As cultivares disponibilizadas incluíam cinco mudas de Arbosana, Arbequina, Coratina, Frantoio, Koroneiki e Manzanilla, além de quatro mudas da cultivar Picual. As plantas, com aproximadamente 12 meses de idade e altura variando entre 0,90 m e 1,10 m, foram entregues devidamente identificadas.

Após a entrega, as mudas foram retiradas das caixas e mantidas por cinco dias na casa de vegetação do Nupagri/UEM. Em seguida, foram transplantadas para vasos com capacidade de 3 litros, preenchidos com argila expandida e substrato comercial (Mecplant®), e permaneceram na casa de vegetação sob temperatura ambiente.

A extração do DNA genômico total das folhas de oliveira foi realizada conforme a metodologia de Sika (Sika et al. 2015) com modificações. Folhas desidratadas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até virar pó. Em seguida, 50 mg do pó foram transferidos para microtubos (2,0 mL) com 800 µL de tampão de extração (1% SDS, 0,5 M NaCl) e três microesferas de aço. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 20 segundos. Após a remoção das microesferas, adicionou-se 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas por 15 minutos em agitador orbital e centrifugadas. (13.500 rpm, 4 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL), adicionado de igual volume de isopropanol gelado, homogeneizado delicadamente por inversão e mantido em geladeira (4°C) por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente (13.500 rpm, 4 minutos), o sobrenadante descartado, e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação (2 minutos, 13.500 rpm), o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE, com adição de 2 µL de RNase (20 mg mL⁻¹), e as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C).

Seis loci microssatélites (Tabela 1) previamente identificados para a *O. europaea L.* foram selecionados para o estudo. O mix da PCR foi composto por DNA (0,5 µg L⁻¹), primer F (0,25 µM), primer R (0,25 µM), tampão (0,5X), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (0,1 mM) e Taq (0,025 µL⁻¹), em um volume total de 20 µL. O programa de PCR incluiu 1 ciclo (94°C por 4 min., 55 a 69°C por 1 min., 72°C por 1 min.); 30 ciclos (92°C por 1 min., 50 a 64°C por 1 min., 72°C por 1 min.); e 1 ciclo final (72°C por 20 min.). Após a PCR, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida inativo (10%) por eletroforese a 200V por aproximadamente 4 horas, e coradas com nitrato de prata.

Tabela 1 - Descrição dos seis *loci* microssatélites selecionados

| Locus | Sequência (5'→3') | Motif | Referências |
|---------|--|--|--------------------------|
| EM090 | F-CATCCGGATTTCTTGCTTTT R- AGCGAATGTAGCTTTGCATGT | (CA) ₁₀ | De La Rosa et al. (2002) |
| UDO-011 | F-TGACTCCCTTTAACTCATCAGG | (CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂ CT(CA) ₂ CT(CA) ₉ | Cipriani et al. (2002) |



| | | | |
|---------|--|--|------------------------|
| UDO-043 | R-TGCGCATGTAGATGTGAATATG F-TCGGCTTTACAACCCATTTTC | (GT) ₁₂ | Cipriani et al. (2002) |
| DCA9 | R-TGCCAATTATGGGGCTAACT F-AATCAAAGTCTTCTCTCATTTCG | (GA) ₂₃ | Sefc et al. (2000) |
| DCA16 | R-GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC F-TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG | (GT) ₁₃ (GA) ₂₉ | Sefc et al. (2000) |
| DCA18 | R- TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC F-AAGAAAGAAAAGGCAGAATTAAGC | (CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉ | Sefc et al. (2000) |
| | R-GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC | | |

Ramos com um ano de idade foram selecionados e cinco folhas foram coletadas de 15 plantas para a caracterização morfológica. A caracterização foi baseada no comprimento, largura, forma, curvatura longitudinal do limbo e posição da largura máxima, adaptando a metodologia do COI (2021). As especificações dos parâmetros biométricos avaliados foram:

- **Comprimento:** reduzido (< 5 cm), médio (5-7 cm) e elevado (> 7cm).
- **Largura:** reduzida (< 1 cm), média (1-1,5 cm) e larga (> 1,5 cm).
- **Forma:** elíptica (comp/larg < 4), elíptica-lanceolada (comp/larg = 4-6) e lanceolada (comp/larg > 6).
- **Curvatura longitudinal do limbo:** epinástica, plana, hiponástica e helicoidal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA genômico utilizando a metodologia de Sika (Sika et al. 2015). com modificações mostrou-se eficiente, resultando em uma solução de DNA de alta pureza. A análise com o marcador molecular SSR revelou a presença de clones entre as mudas da mesma cultivar (Figura 1), como o observado entre os acessos OE48/OE49 da cultivar Arbequina, OE51/OE52 da Arbosana, OE56/OE57/OE59/OE60 da Coratina, OE61/OE62 e OE63/OE64 da Frantoio e OE66/OE67 da Koroneiki.

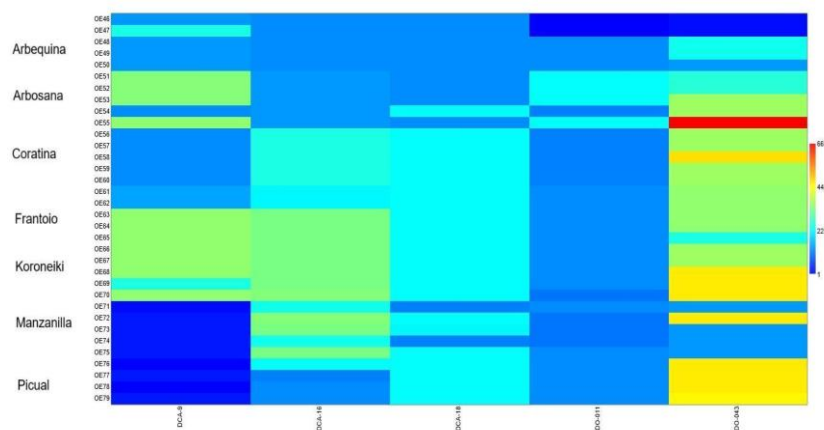


Figura 1 – Resultado da análise das mudas de oliveira com o marcador molecular SSR.

Considerando que um banco de germoplasma deve ser composto por indivíduos geneticamente e morfológicamente distintos, foram selecionadas apenas as mudas que apresentaram variabilidade genética. No total, 15 mudas foram escolhidas para compor o banco: duas da cultivar Arbequina (OE46 e OE48), duas da Arbosana (OE51 e OE55), duas da Coratina (OE57 e OE58), duas da Frantoio (OE61 e OE62), duas da Koroneiki (OE66 e



OE70), duas da Manzanilla (OE71 e OE72) e três da Picual (OE76, OE78 e OE79). No caso da cultivar Frantoio, dois clones foram mantidos devido à debilidade dos outros acessos.

Em setembro de 2023, a área escolhida para o transplante das mudas foi o Nupagri/CCA/UEM, ao lado do estacionamento (Figura 2). Cerca de um mês antes do transplante, as covas foram abertas (40 cm x 40 cm x 40 cm). A terra retirada foi misturada com o formulado N-P-K 6-24-12, calcário calcítico e composto orgânico produzido pela Biofábrica UEM (UEMBIO). Optou-se por um sistema de plantio mais adensado, com distância de 3 metros entre as covas.

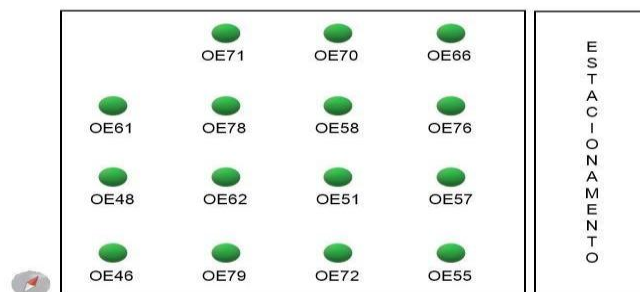


Figura 2 – Localização das cultivares de oliveira no Banco de Germoplasma Nupagri/CCA/UEM

A instalação bem-sucedida do BGO/UEM é um marco importante, tornando-o disponível para futuras pesquisas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho atingiu seu objetivo principal com a instalação bem-sucedida do Banco de Germoplasma de Oliveira (BGO) da UEM, que agora está disponível para análises de compostos nas folhas sob as condições climáticas de Maringá. A implantação do BGO representa um avanço importante para a pesquisa agrícola no Paraná, especialmente por permitir o aproveitamento do potencial vegetativo da oliveira em uma região pouco favorável à produção de azeitonas e azeites, mas adequada para a produção de folhas de alta qualidade. Como perspectiva futura, destaca-se a possibilidade de o BGO da UEM se consolidar como uma referência nacional, em diálogo com outros bancos de germoplasma já estabelecidos no Brasil, como os de videira, café e frutíferas tropicais, favorecendo intercâmbios de material genético e metodologias de conservação. Além disso, a caracterização química e funcional das folhas pode abrir caminhos para aplicações industriais em setores como farmacêutico, cosmético, nutracêutico e alimentício, ampliando o valor agregado da oliveira e gerando novas oportunidades de uso sustentável da espécie em diferentes cadeias produtivas.

REFERÊNCIAS

FAO. *Food and agriculture data*. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Acesso em: 24 ago. 2024.

IOC. *World trade in olive oil and table olives: Brazil*. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2023/03/IOC-Imports-2021-2022-1.html>. Acesso em: 15 fev. 2025a.

IOC. *International Olive Council*. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/>. Acesso em: 24 jan. 2025b.



MARQUES, S. *Extrafresco: o guia de azeites do Brasil*. Edição 2020-2021. São Paulo: Livrobot, 2020.

MESQUITA, D. L.; OLIVEIRA, A. F.; MESQUITA, H. A. Aspectos econômicos da produção e comercialização do azeite de oliva e da azeitona. *Informe Agropecuário*, v. 27, n. 231, p. 7–12, mar./abr. 2006.

SIKA, K. C. et al. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. *Plant Gene*, v. 1, p. 43–45, 2015.