

Indução e controlo da embriogénese somática a partir de embriões zigóticos maduros em oliveira (*Olea europaea* L.) cv. ‘Galega vulgar’

Rita Pires¹, Hélia Cardoso², Augusto Ribeiro³ & Augusto Peixe⁴

¹IIFA – Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7005-449 Évora.

²ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7005-449 Évora.

³DespertaFolia Lda., Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7005-449 Évora.

⁴ICAAM, Escola de Ciência e Tecnologia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7005-449 Évora.



Introdução e Objetivo

Os trabalhos de transformação genética estão fortemente dependentes do estabelecimento prévio de um protocolo de regeneração *in vitro* que garanta a regeneração das plantas putativamente transformadas. A garantia de regenerar uma planta geneticamente modificada a partir de uma única célula tornou o sistema de regeneração por embriogénese somática (ES) como o mais apropriado para auxiliar trabalhos de transformação genética de oliveira [1]. Tendo em vista auxiliar trabalhos futuros de validação funcional de genes relacionados com o processo de enraizamento adventício, identificados por estudos de transcritoica (RNAseq), foi objetivo o estabelecimento de um protocolo de ES para a cultivar Portuguesa ‘Galega vulgar’.

Materiais e Métodos

Frutos da cv. ‘Galega vulgar’ foram recolhidos na fase de maturação total. Após a remoção das sementes do endocarpo procedeu-se à sua esterelização e de seguida à excisão dos explantes (radícula, região proximal e região distal dos cotilédones). Os explantes foram inoculados em meio de indução (OMc com 2.5 μ M de 2iP e 25 μ M de AIB) [2]. Foram testadas duas condições de fotoperíodo (16h e 0h). Passados 21 dias, os explantes que desenvolveram *calli* foram transferidos para meio de expressão (OMc sem reguladores de crescimento) [2]. A ES repetitiva foi conseguida transferindo *calli* para meio de cultura ECO [3]. Para a conversão dos embriões considerou-se o trabalho de [4]. Embriões com cerca de 3mm foram transferidos para meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento.

Resultados e Discussão

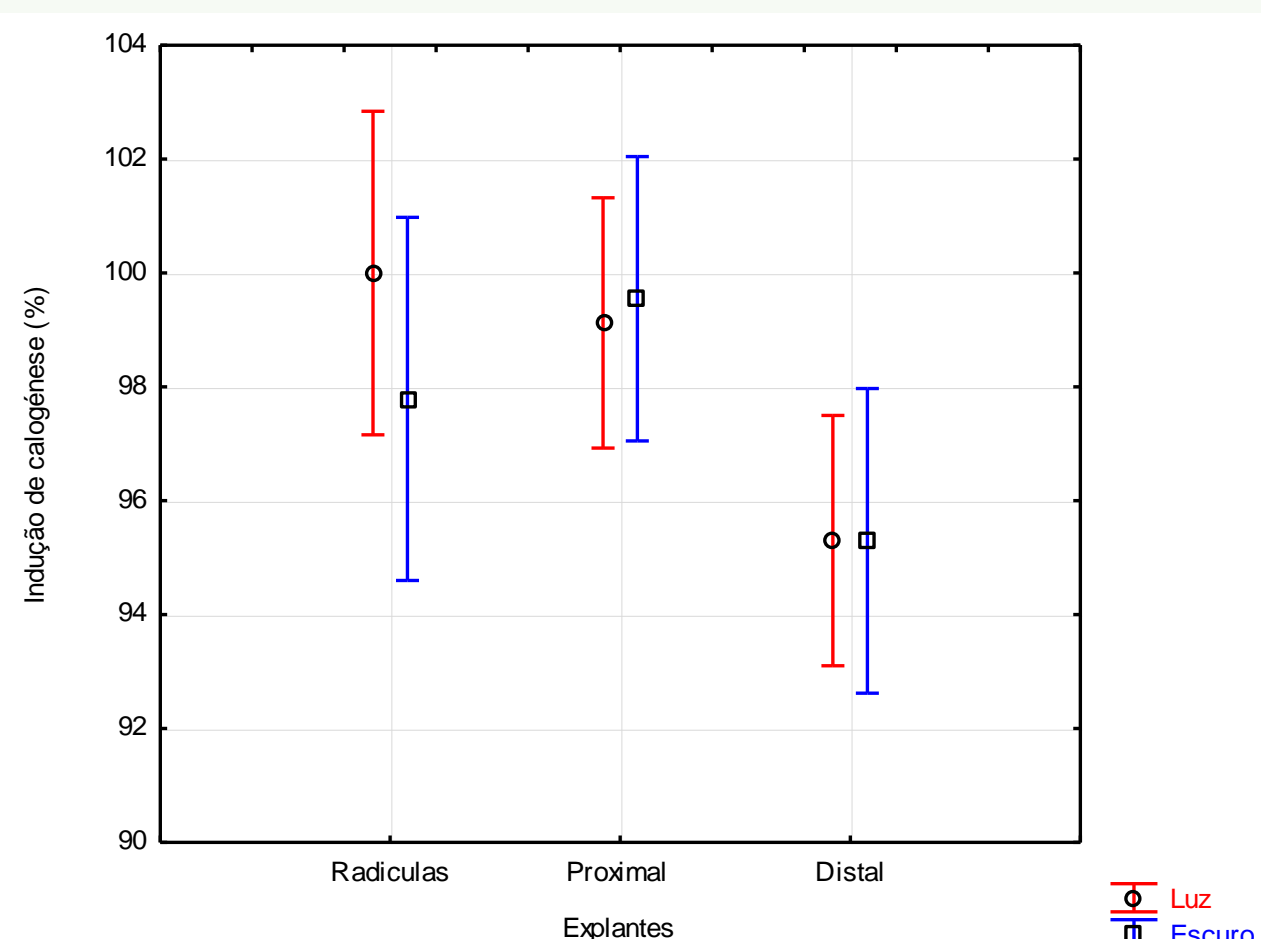


Fig. 1: Taxas de calogénese observadas para interação tipo de explante/fotoperíodo. (LSD 95%)

A formação de *calli* em meio de indução – fase de indução – foi elevada em todos os explantes, com um mínimo de 95.3% nos cotilédones distais (Fig. 1). Não foram identificadas diferenças significativas associadas ao efeito do fotoperíodo.

Ao final de 21 dias em cultura registou-se, nos *calli* formados nos diferentes explantes, a neoformação de raízes adventícias (Fig. 2A - 2F).

A formação das estruturas adventícias, previamente reportadas em *Olea europaea* var. *sylvestris* [5], é considerado um passo fundamental no sucesso do estabelecimento de protocolos de ES [6].

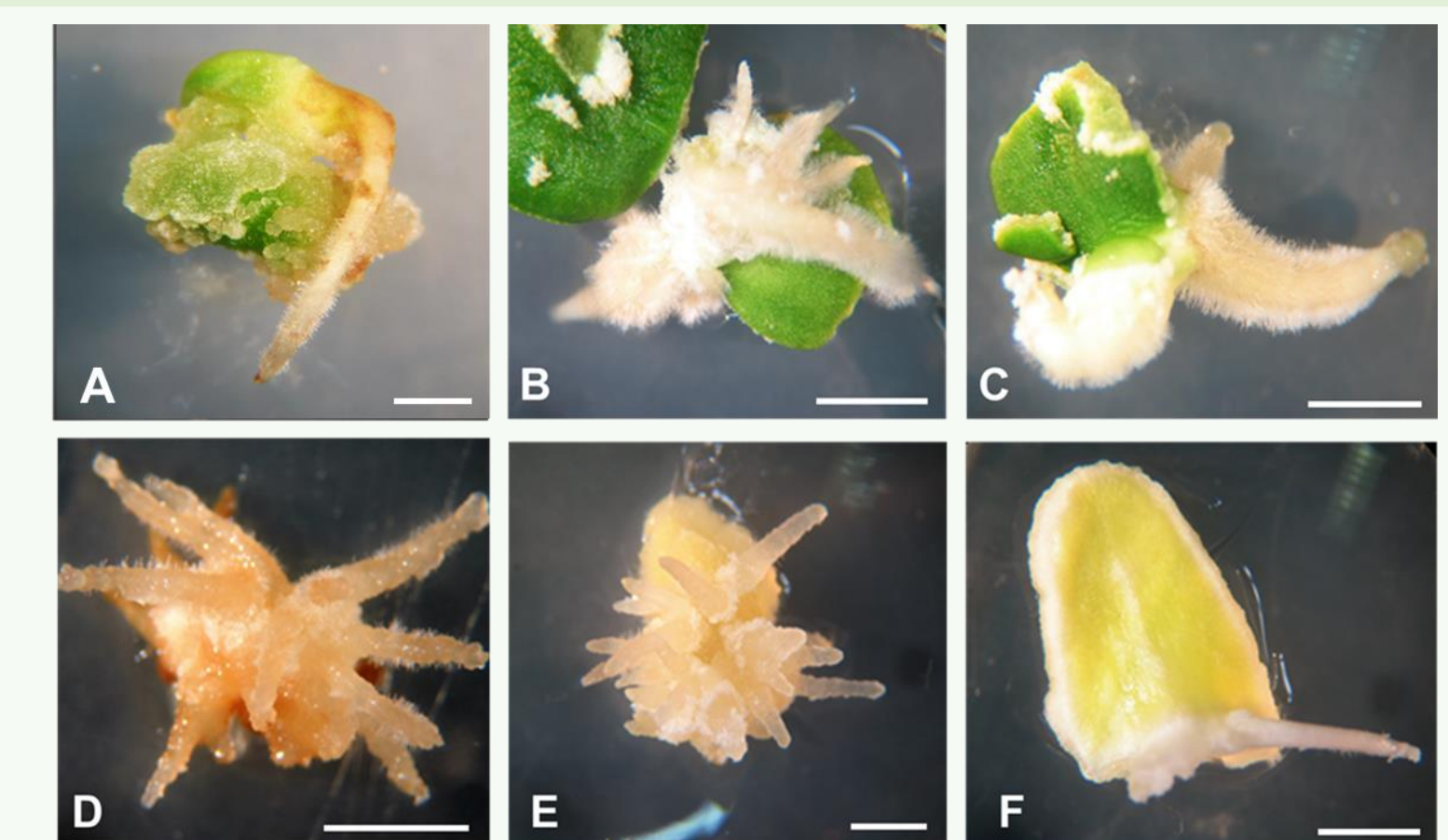


Fig. 2: Neoformação de raízes à luz (A,B,C) e no escuro (D, E, F), em radículas (A e D), cotilédones parte proximal (B e E) e cotilédones parte distal (C e F). Barras: 5 mm.

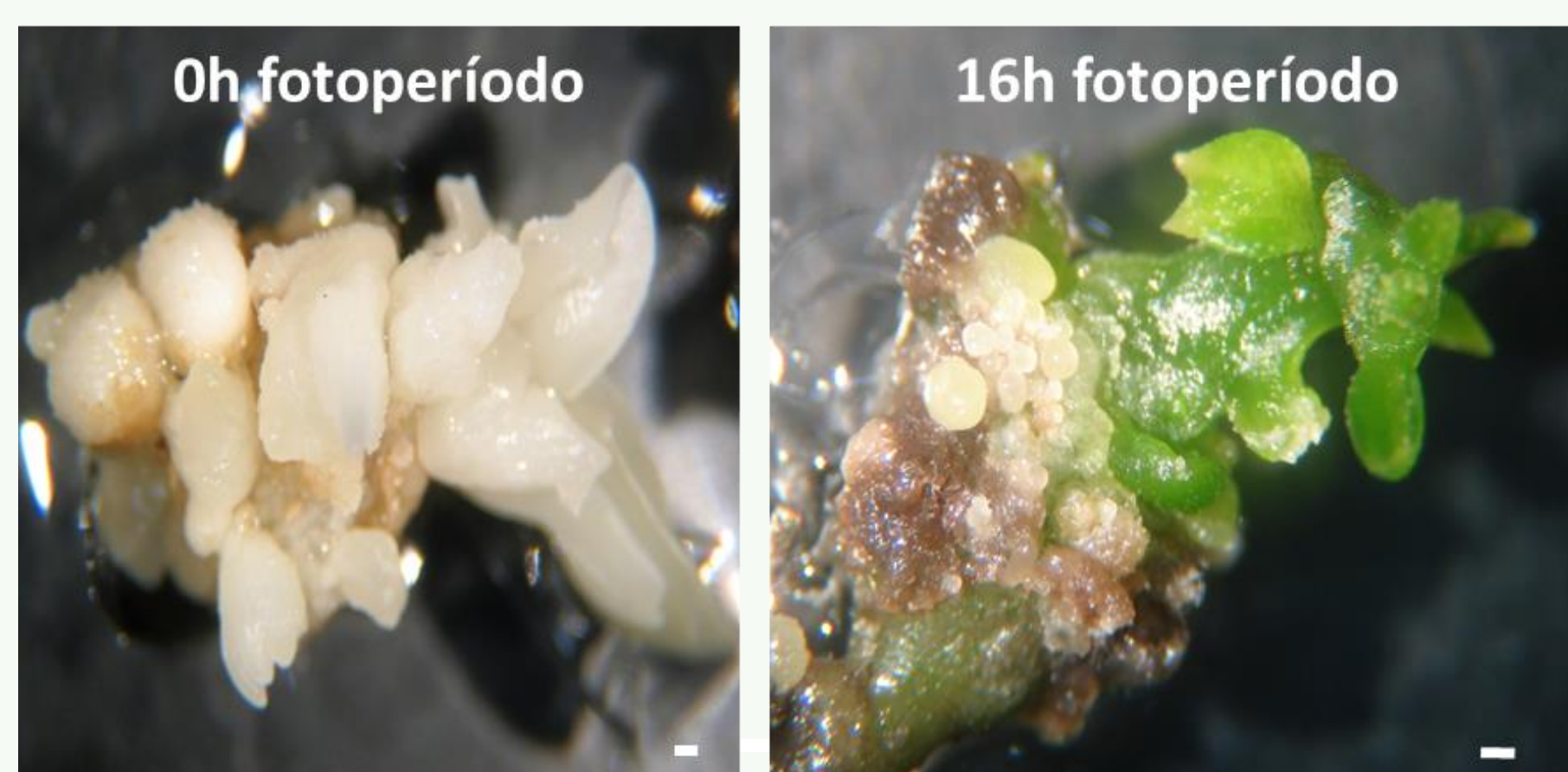


Fig. 3: Embriogénese somática repetitiva em meio de cultura ECO. Barras: 10 mm.

Na fase de expressão transferiram-se os *calli* para meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento [2]. Ao fim de 30 dias registaram-se, em todos os explantes em cultura, os primeiros embriões somáticos.

A embriogénese repetitiva foi conseguida em ambas as condições de fotoperíodo testadas (Fig. 3).

Após a transferência dos *calli* para meio de cultura ECO [3], o número de embriões resultantes de ES repetitiva aumentou significativamente, principalmente na condição de 16h de fotoperíodo (Fig. 4).

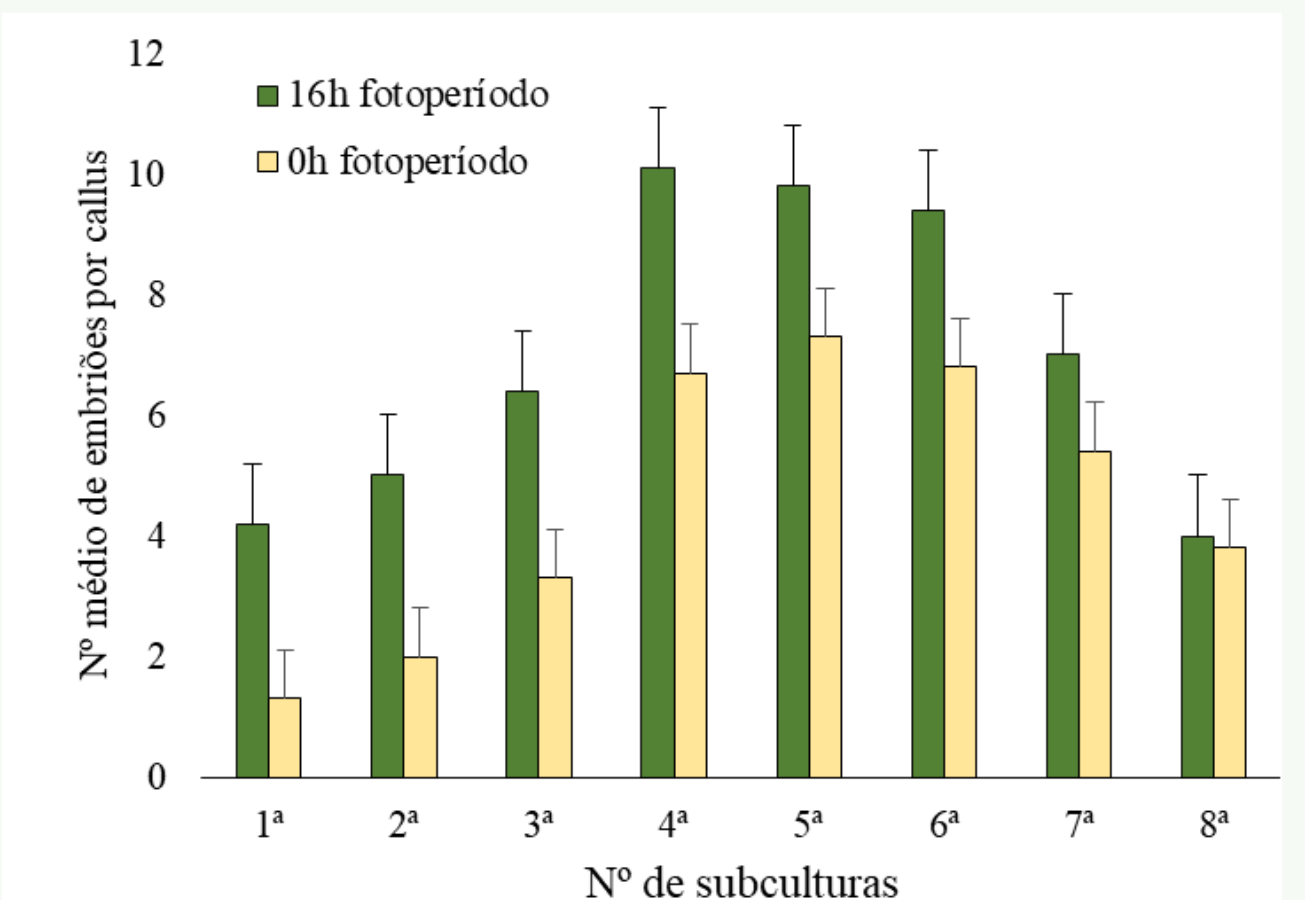


Fig. 4: Número médio de embriões por *callus* em cultura, nas 8 subculturas realizada em meio ECO.

Para a conversão dos embriões somáticos em plantas, estes foram isolados dos *calli* embriogénicos aquando na fase cotiledonar (Fig. 5A) e inoculados em meio de expressão OMc.

Rebentos com cerca de 10 cm (Fig. 5B) foram transferidos para tabuleiros alveolados com uma mistura de areia, perlite e turfa (1:1:3, v/v) para a aclimatização em ambiente controlado.

Após a aclimatização as plantas foram transferidas para estufa onde permaneceram durante 6 meses de forma a observar o seu desenvolvimento.

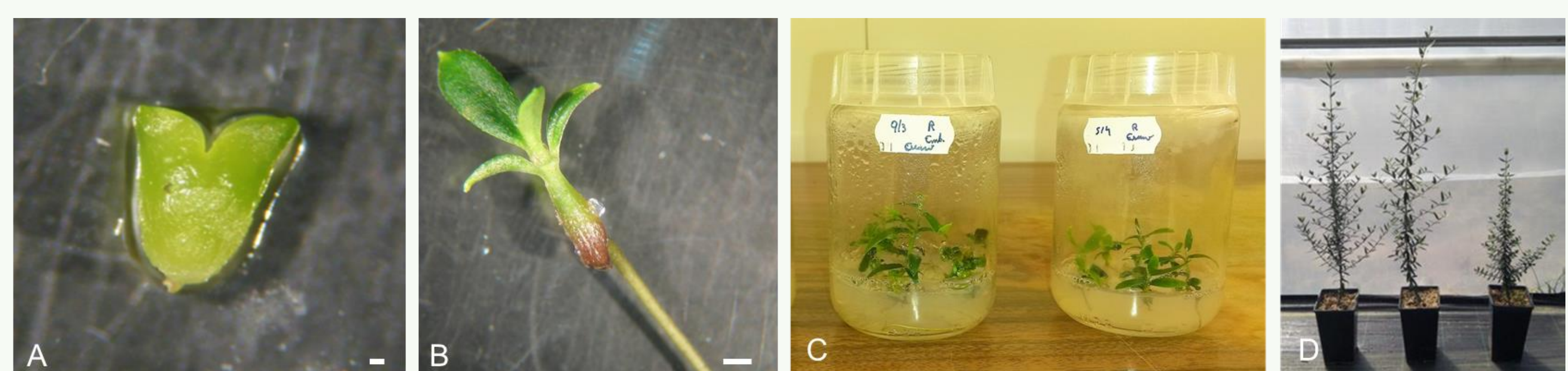


Fig. 5: Embrião na fase cotiledonar (A), Plântula resultante da conversão de um embrião somático (B). Embriões convertidos em plantas em meio de cultura OMc sem reguladores de crescimento (C) e Plantas provenientes de embriões somáticos ao final de 6 meses de aclimatização (D). Barras: 10 mm.

Conclusões

- Foi desenvolvido um protocolo que permite a regeneração *in vitro* da cv. ‘Galega vulgar’ por indução de embriogénese somática.
- Foi estabelecido um protocolo de ES repetitiva, com o qual se disponibiliza material para ensaios de transformação genética sem limitação da disponibilidade do explante inicial para indução da ES.
- Considerando os resultados obtidos é possível antecipar resultados animadores para o estabelecimento de um protocolo de ES a partir de material adulto.

References

[1] Cardoso et al. (2019). *In Plant Transgenic Technologies for Commercial Applications*; [2] Rugini E, Silvestri C (2016) *In vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*. pp. 341-349; [3] Cerezo et al. (2011) *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 106: 337-344; [4] Bradaï et al.. (2016) *Sci. Hortic*. 213: 208-215; [5] Orinos T e Mitrakos K (1991) *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 27:183-187; [6] Rugini E, Caricato G (1995) *Plant Cell Rep*. 14: 257-260.

Acknowledgments

Este trabalho é financiado pelo FEDER e por fundos nacionais, através do programa operacional Regional Alentejo 2020, Operação ALT20-03-0145-FEDER-000014 – “Valorização das Variedades de Oliveira Portuguesas (OLEAVALOR)”. Os autores desejam agradecer à Auxiliar Técnica Virgínia Sobral pela ajuda no estabelecimento dos ensaios *in vitro*.