

Micropropagação de uma Espécie Autóctone de Porto Santo como Estratégia de Combate à Desertificação: Exemplo da Oliveira-Brava

Gina Brito*, Roberto Jardim, Conceição Santo*** e Celeste Coelho******

*Mestre

***Professora Auxiliar

Departamento de Biologia, CESAM. Universidade de Aveiro, 3810-197 AVEIRO

**Biólogo

Jardim Botânico da Madeira. Direcção Regional de Florestas, Caminho do Meio,
9064-512 FUNCHAL

****Professora Catedrática

Departamento de Ambiente e Ordenamento, CESAM. Universidade de Aveiro,
3810-197 AVEIRO

Sumário. A micropropagação de plantas lenhosas é particularmente vantajosa quando integrada em estratégias de combate à desertificação e protecção de espécies autóctones, pois permite simultaneamente a preservação de germoplasma em risco e a multiplicação em larga escala de indivíduos. Descrevemos aqui um protocolo de micropropagação e aclimatização de oliveira-brava à Ilha de Porto Santo que permite, a curto prazo, a sua integração em programas de repovoamento em curso. Para o efeito, colheram-se amostras, dos poucos indivíduos existentes no Arquipélago da Madeira, de *Olea maderensis* (oliveira-brava) e desenvolveu-se um projecto sobre preservação e propagação desses indivíduos utilizando o meio OM modificado (enriquecido em Fe, Mg e Mn) e suplementado com zeatina. As plantas micropropagadas foram aclimatadas à estufa e posteriormente às condições de Porto Santo, com uma taxa de sobrevivência superior a 90%. O protocolo de micropropagação/aclimatização desenvolvido permite transferir plantas em larga escala para a ilha. Estas apresentam um bom comportamento traduzido por uma taxa de alongamento médio de 4,76 cm/mês. A análise de parâmetros de eficiência fotossintética, conteúdo clorofilino, integridade membranar e conteúdo hídrico mostram que estas plantas não estão sob stress. Os resultados aqui apresentados são assim um exemplo do uso de novas tecnologias I&D com aplicação imediata na protecção de ecossistemas em risco.

Palavras-chave: aclimatização a condições de campo; biotecnologia vegetal; *Olea* sp.; reflorestação

Micropropagation of a Native Species of Porto Santo Island as a Strategy to Combat Desertification: Wild Olive as Example

Abstract. Micropropagation of woody plants is particularly advantageous when integrated with strategies to combat desertification and protect native species as far as it allows both preservation of germplasm in danger and large scale multiplication of plants. We describe here

a protocol of micropropagation and acclimation of wild olive to Porto Santo Island that allows in the short term the integration of wild olive plants in ongoing forestation programmes. Samples of the few individuals of *Olea maderensis* (wild olive) existing in Madeira Archipelago were collected and a project was developed in order to preserve and propagate these individuals using OM medium modified (enriched in Fe, Mg e Mn) and supplemented with zeatin. The micropropagated plants were acclimated to greenhouse and then acclimated to conditions of Porto Santo Island, with a survival rate up to 90%. The protocol of micropropagation/acclimation developed allows the transfer of plants in a large scale to the Island. The transferred plants show good behaviour in the Island, which is expressed by the optimal average rate of elongation of 4.76 cm/month. The analysis of chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, membrane integrity and hidric content show that the plants are not under stress. These results are an example of the use of new R&D technologies with immediate application on protection of ecosystems in danger.

Key words: acclimation to field conditions; forestation; *Olea* sp.; vegetal biotechnology

Micropropagation d'une Espèce Autochtone de l'Île de Porto Santo en Tant que Stratégie de Combat Contre la Désertification: l'Exemple de l'Olivier Sauvage

Résumé. La micropropagation de plantes ligneuses est particulièrement avantageuse lorsqu'elle est intégrée à des stratégies de combat contre la désertification et de protection d'espèces autochtones, et qu'elle permette simultanément la conservation de germoplasme en danger et la multiplication à grande échelle d'individus. Nous décrivons ici un protocole de micropropagation et d'acclimation de l'olivier sauvage sur l'Île de Porto Santo qui permet, à court terme, son intégration à des programmes de repeuplement en cours. Ont été récoltés à cet effet des échantillons des rares exemplaires d'*Olea maderensis* (olivier sauvage) existants dans l'île et a été mis en route un projet visant leur conservation et leur propagation en utilisant le milieu OM modifié (enrichi en Fe, Mg et Mn) et supplémenté en zéatine. Les plantes micropropagées ont été acclimatées en serre et ultérieurement à Porto Santo en garantissant un taux de survie supérieur à 90%. Le protocole de micropropagation/acclimation développé permet le transfert à grande échelle de plantes sur l'île. Celles-ci accusent un bon comportement traduit par un taux d'allongement moyen de 4.76 cm/mois. L'analyse de paramètres d'efficacité photosynthétique (ou «de fluorescence chlorophyllienne»), de contenu chlorophyllien, d'intégrité membranaire et de contenu hydrique montrent que ces plantes ne sont pas sous stress. Les résultats présentés ici sont ainsi un exemple d'utilisation de nouvelles technologies I&D immédiatement applicables à la protection d'écosystèmes en danger.

Mots clés: acclimation aux conditions du terrain; biotechnologie végétale; repeuplement forestier; *Olea* sp.

Introdução

A Ilha de Porto Santo integra-se no Arquipélago da Madeira e apresenta características de uma região semi-árida, devido às suas condições climáticas e geológicas. Ao longo da história esta ilha mostrou ser um ecossistema extremamente frágil e vulnerável, agravado pela crescente escassez de água doce, degradação do solo e desertificação.

Nos últimos anos foram desenvolvidos esforços, por parte da Direcção Regional de Florestas da Região Autónoma da Madeira (DRF), na reflorestação da ilha, na tentativa de preservar/renovar as zonas florestadas e assim minimizar os problemas de degradação do solo e desertificação. Contudo, dado que as espécies que melhor se têm adaptado pertencem ao género *Pinus* e *Cupressus*, assiste-se hoje a

uma crescente situação de monocultura destas espécies e consequente diminuição da biodiversidade do ecossistema (agravado pelo facto destas espécies não serem autóctones). Algumas espécies nativas, tais como a *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco¹ praticamente desapareceram da ilha.

Não obstante, a DRF continua a desenvolver esforços que objectivam principalmente a diversidade de espécies autóctones, adaptadas a condições climáticas traduzidas por elevada aridez, de forma a aumentar a biodiversidade e a valorização da paisagem. Actualmente encontram-se em curso trabalhos de adensamentos e de arborização/regeneração de algumas localidades da Ilha de Porto Santo, com principal incidência nos Picos (Pico do Facho, Pico do Castelo, Pico do Conselho e Pico da Cabrita e ainda o Sítio dos Morenos). Os adensamentos estão a ser feitos essencialmente com as espécies: *Myrica faya* Aiton, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa & C. Aguiar, *Olea maderensis* e *Dracaena draco* (L.) L., e simultaneamente têm sido efectuados desramações e desbastes (FREITAS, 2006 com. pessoal). Contudo, a propagação de algumas destas espécies lenhosas por vias tradicionais (estacaria e sementeira) tem-se mostrado infrutífera, o que fragiliza os projectos actualmente em curso (FREITAS, 2006 com. pessoal).

Pelo exposto, e considerando as características únicas da Ilha de Porto Santo, a Universidade de Aveiro em colaboração com a DRF, tem vindo a avaliar o *status* nutricional e hídrico dos poucos exemplares de plantas de *Olea maderensis* que crescem em Porto Santo, associando a avaliação com dados das condições climáticas e *status* do solo. Estes dados têm permitido indagar sobre

o *status* nutricional e stress destas plantas no campo e assim fornecer informação para estudos de propagação (BRITO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003).

Neste sentido, foi desenvolvido recentemente o Projecto REI - "Reflorestação da Ilha de Porto Santo usando plantas autóctones regeneradas *in vitro* e adaptadas a stress hídrico" (ref. PNAT/1999/AGR/15011/99, duração entre 2000-2005), pela Universidade de Aveiro com a colaboração de diversas entidades da Região Autónoma da Madeira, nomeadamente a DRF, a Câmara Municipal de Porto Santo e a Empresa Porto Santo Verde, E.M.. No âmbito deste projecto procedeu-se a uma caracterização dos ecossistemas da Ilha, com o intuito de conhecer as condições de adaptação das plantas micropropagadas à Ilha de Porto Santo (SANTOS, 2005; BRITO *et al.*, 2006b). Os resultados mais relevantes do Projecto REI apontam para solos pobres em matéria orgânica, e uma diversidade microbiana bastante abaixo dos valores normais para um solo fértil (MOREIRA, 2006). Paralelamente utilizaram-se recursos de biotecnologia vegetal, como a cultura *in vitro*, tendo em vista a protecção de alguns *taxa* de lenhosas autóctones ameaçadas, bem como a preservação do germoplasma destas espécies de modo a contribuir para o processo de reflorestação da Ilha de Porto Santo.

A cultura *in vitro* de plantas apresenta inúmeras vantagens como por exemplo: a) grande número de plantas a crescer em condições controladas, num espaço e tempo reduzidos; b) elevado grau de controlo dos processos de regeneração e desenvolvimento; c) minimização do efeito sazonal. Estas vantagens permitem-lhe ter um largo espectro de aplicações como a micropropagação de

genótipos seleccionados, a cultura de meristemas (e produção de plantas isentas de doenças), selecção de variantes somaclonais de interesse, a cultura de protoplastos e a hibridação somática, de entre outras (OLIVEIRA, 2000). Em termos gerais, estas tecnologias revelam-se de grande importância económica pois permitem, por exemplo, propagar em larga escala plantas de qualidade superior (milhares, ou mesmo biliões), sem destruir a planta-mãe; obter plantas fáceis de transportar para outras regiões, sem preocupações com introdução de novas doenças, recuperar espécies em vias de extinção ou ainda, a preservação de germoplasma (OLIVEIRA, 2000).

Neste trabalho descrevemos a optimização de condições para micropropagação em larga escala de *Olea maderensis*. Uma vez atingido este objectivo pode definir-se uma estratégia de integração destas plantas na ilha de Porto Santo e acompanhar-se a sua capacidade de adaptação (aclimatização) às condições geo-climáticas da ilha, processo actualmente em curso. Para o efeito realizaram-se estudos de aclimatização das plantas micropropagadas ao nível de diversos parâmetros morfológicos e parâmetros fisiológicos.

Material e métodos

Micropropagação

Estabelecimento de culturas

No estabelecimento de culturas foram utilizadas duas espécies de Oliveira existentes no Arquipélago da Madeira, *Olea maderensis* (espécie endémica) colhida na Ilha da Madeira - Ribeira Brava (Genótipo - OG4) e *Olea europaea* L.

(espécie introduzida) colhida na Ilha de Porto Santo - Pico do Castelo (Genótipo - OG8) (Figura 1 A, B), para estudos comparativos.

A micropropagação de ambas as espécies foi iniciada a partir de gomos axilares e de gomos apicais, provenientes de ramos frescos, de plantas adultas (> 30 anos de idade), colhidos no Inverno. Logo após a colheita, os ramos foram pulverizados com uma solução fungicida de Benlate® (Rhône-Poulenc) (1 g/l). No dia seguinte, após remoção das folhas e seccionamento dos ramos em segmentos nodais com aproximadamente 3 cm de comprimento, procedeu-se a uma desinfecção superficial. Esta iniciou-se com uma lavagem em água corrente durante 10 min., desinfecção em etanol a 70% (v/v) durante 30s seguindo-se duas passagens sucessivas (com agitação) de 10 min. cada, por uma solução diluída (30% v/v) de lixívia comercial Domestos (com detergente, <5% de cloro activo). Após este procedimento foi aplicado um fungicida Benlate® estéril durante 10 min. (com agitação), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada estéril. No final deste processo, cortaram-se as extremidades dos explantes desinfectados para retirar os tecidos lesados com o processo de desinfecção e foram inoculados verticalmente em meio de cultura inicial sólido OM (RUGINI, 1984).

Todos os meios de cultura foram ajustados a um pH de 5,8 e posteriormente autoclavados a 121°C durante 20 min. e solidificados com 0,7% (p/v) de agar. As culturas foram mantidas numa câmara de cultura de tecidos, com temperatura a 22±1°C, fotoperíodo de 16h luz e intensidade luminosa de 45 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes (OSRAM L 36W/21).



Figura 1 - *Olea maderensis* nas várias fases de micropropagação (A) Planta-mãe - genótipo OG8 (Pico do Castelo - Ilha de Porto Santo); (B) Planta-mãe - genótipo OG4 (Ribeira Brava - Ilha da Madeira); (C) Rebentos de segmentos apicais (OG4) na fase de multiplicação e alongamento, após 1 ano em cultura em meio OMG com 9,12 μ M de zeatina; (D) Rebentos de segmentos basais (OG4) na fase de multiplicação e alongamento, após 1 ano em cultura em meio OMG com 9,12 μ M de zeatina; (E) Plantas (OG4) na fase de aclimatização a estufa fechada (90-80 %HR), com 10 semanas de idade; (F, G, H) - Plantas (OG4) em aclimatização (1 semana) a estufa aberta (70-50 %HR), em Porto Santo, com 14 semanas de idade; (I) - Pico do Concelho na Ilha de Porto Santo, local hipotético, sugerido pela DRF, para posterior transferência das plantas actualmente em aclimatização a estufa aberta em Porto Santo.

Multiplicação e alongamento de rebentos

Os explantes (OG4 e OG8) foram mantidos no meio inicial, durante 4 a 5 semanas, para início de abrolhamento e obtenção de rebentos que funcionaram como fonte de material na fase de multiplicação. Os rebentos foram colocados em meio OMG [OM modificado (RUGINI, 1984) com o dobro da concentração de Fe, Mn e Mg] com 9,12 μM de zeatina, para multiplicação e alongamento (BRITO *et al.*, 2006a). Em cada subcultura, realizada mensalmente, os rebentos foram seccionados em dois (com 3-4 nós), correspondendo um deles ao **segmento apical** (com meristemas apical e axilares) e o outro ao **segmento basal** (com meristemas axilares).

Enraizamento dos rebentos

O enraizamento foi testado no genótipo OG4. Foram utilizados segmentos apicais com 3-5 nós, e realizados diferentes ensaios com base na bibliografia (RUGINI, 1984; RAMA e PONTIKIS, 1990; COZZA *et al.*, 1997; GRIGORIADOU *et al.*, 2002; ROUSSOS e PONTIKIS, 2002; MENCUCCINI, 2003; ZACCHINI e AGAZIO, 2004). Os meios foram preparados com metade ($\frac{1}{2}$) da concentração basal de OM, OMG, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (HARTMAN *et al.*, 1997), e 2% de sacarose. Testaram-se diferentes combinações de fitorreguladores (NAA e IBA) de forma a encontrar o meio/combinção mais eficaz (Quadro 1).

Quadro 1 – Ensaios de enraizamento testados e respectivas taxas de enraizamento obtidas em cada um dos ensaios, em rebentos de oliveira-brava – genótipo OG4 ($n \geq 20$). A indicação $\frac{1}{2}$ antes da abreviatura dos meios indica que o meio de cultura utilizado possui metade da concentração de sais referida na literatura para o respectivo meio de cultura. As abreviaturas significam: OM - Olive Medium (Rugini, 1984); OMG - Olive Medium (Rugini, 1984) modificado com o dobro da concentração de Fe, Mn e Mg; WPM - Woody Plant Medium (Hartman *et al.*, 1997); MS - Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962); IBA - ácido indolil-3-butírico; NAA - ácido α -naftil acético

Meio de Cultura Basal	Concentração dos Reguladores de Crescimento	Taxa de Enraizamento (%)
$\frac{1}{2}$ OM	24,6 μM IBA	0
	Rebentos sujeitos a choque hormonal de 0,098 mM IBA (2 min.) e posteriormente inoculados em $\frac{1}{2}$ OM sem reguladores de crescimento	14
$\frac{1}{2}$ OMG	24,6 μM IBA (indução durante 1 mês) e posteriormente sujeitar os rebentos a choque hormonal de 0,098 mM IBA (3 min.) e inocular em $\frac{1}{2}$ OMG sem reguladores de crescimento	0
	3,22 μM de NAA, após inoculação os rebentos são sujeitos ao escuro durante 5 dias, e posteriormente colocados à luz. Após 30 dias inocular em $\frac{1}{2}$ OMG sem reguladores de crescimento onde ficam durante 21 dias	84
$\frac{1}{2}$ WPM	12 μM IBA + 3 μM NAA	0
$\frac{1}{2}$ MS	21,5 μM NAA	0

Aclimatização

A aclimatização das plantas (OG4) decorreu em diversas fases (Quadro 2). Durante as primeiras fases fertilizou-se quinzenalmente com meio $\frac{1}{2}$ OMG líquido e sem sacarose e foi ainda, ocasionalmente, aplicado o fungicida Benlate® (1 g/l). Ao longo das várias etapas do processo de aclimatização controlou-se rigorosamente a humidade relativa (%HR), por forma a permitir uma diminuição gradual deste factor: a) aclimatização *in vitro* - 100%HR; b) aclimatização a estufa fechada - 100-70%HR e aclimatização a estufa aberta, na Ilha de Porto Santo - 70-50%HR.

Estudos do comportamento das plantas micropropagadas

Análises morfológicas (parâmetros de crescimento)

Ao longo das fases de micropropagação mediram-se vários parâmetros de crescimento dos rebentos e plantas (ver Quadros 3 e 4). Durante a **multiplicação e alongamento**, as medições foram efectuadas: a) imediatamente após a subcultura (0 semanas) e, b) ao fim de 4 semanas da mesma subcultura. Durante o **enraizamento**: a) imediatamente após a subcultura para meio de enraizamento (0 semanas de idade) e, b) ao fim de 4 semanas de idade dos rebentos. Durante a **aclimatização**: a) imediatamente antes da passagem das plantas para substrato (0 semanas de idade); b) plantas em aclimatização *in vitro* (1 semana de idade); c) plantas em aclimatização a estufa fechada - 90-100%HR (4 semanas de idade); d) plantas em aclimatização a estufa fechada - 80-90%HR (12 semanas de idade), imediatamente antes da

transferência para Porto Santo; e) plantas em aclimatização a estufa aberta (1 semana) - 70-50%HR - em Porto Santo (com 14 semanas de idade); f) plantas em aclimatização a estufa aberta (16 semanas) - 70-50%HR - em Porto Santo (com 30 semanas de idade).

Os parâmetros medidos periodicamente foram os seguintes: a) altura do rebento/planta (cm); b) número de folhas saudáveis por rebento/planta; c) número de entrenós por rebento/planta; d) número de novos rebentos axilares por planta; e) formação de tecido caloso na base do explante (diâmetro em cm); g) número de raízes por planta (Quadro 3 e 4). Com base nestes parâmetros foi calculado o alongamento médio dos rebentos/plantas (diferença entre a altura do explante no final e no início da subcultura/ensaio) e a taxa de enraizamento (percentagem de rebentos enraizados por ensaio).

Análise de parâmetros fisiológicos de rebentos/plantas

O conteúdo hídrico, conteúdo clorofilino, eficiência fotossintética e integridade membranal foram quantificados em: a) planta-mãe, b) rebentos *in vitro*; c) plantas em aclimatização *in vitro* (1 semana de idade); d) plantas em aclimatização a estufa fechada - 90-100 % HR (4 semanas de idade); e) plantas em aclimatização a estufa fechada - 80-90% HR (12 semanas de idade), imediatamente antes da transferência para a Ilha de Porto Santo; f) plantas em aclimatização a estufa aberta (1 semana) - 70-50%HR - em Porto Santo (com 14 semanas de idade) e g) plantas em aclimatização a estufa aberta (16 semanas) - 70-50%HR - em Porto Santo (com 30 semanas de idade).

Fases da Aclimatização/ HR	Condições	Duração	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
<i>In vitro</i> 100 %	transferir as plantas para substrato de transplante em vaso (turfa+vermiculite 1:3) e colocar dentro de frasco fechado, nas mesmas condições da cultura <i>in vitro</i>	2 semanas	45±2
Estufa Fechada 100 – 90 %	colocar dentro de um estufim e sujeitar a nebulização periódica (com um nebulizador), diminuindo gradualmente	8 semanas	45±2
Estufa Fechada 90-80 %	retirar do estufim e colocar em estufa fechada, pulverizar com água 1 a 2 vezes por dia, e colocar água na base do vaso 1 vez por semana, diminuindo gradualmente	2 semanas	70±2
Estufa Fechada 80-70 %	deixar de pulverizar e colocar unicamente água na base do vaso 1 a 2 vezes por semana	3 semanas	70±2
Estufa Aberta (na Ilha de P.S.) 70-50 %	transferir as plantas para a ilha de Porto Santo e transplantar para vaso maior ($\varnothing$ 20 cm) com uma mistura de turfa+solo local com matéria orgânica vegetal (1:3)	16 semanas	280±5

[illegible]

Quadro 4 – Variabilidade das culturas (parâmetros de crescimento) e alongamento médio (diferença entre a altura do rebento/planta no final e no início do ensaio), durante as fases de enraizamento e aclimatização de rebentos/plantas – Genótipo OG4. P.S.- Porto Santo; n.c.- parâmetros não contabilizados. Valores médios obtidos para um $n=21 \pm$ erro padrão. Os valores assinalados com a mesma letra (na mesma coluna) não diferem significativamente ($P<0,05$)

Fases de Enraizamento e Aclimatização	callus (Ø médio cm)	Nº Médio de Raízes	Taxa de Enraiz. (%)	Altura Média Rebento/Planta (cm)	Nº Médio de Folhas	N.º Médio de Entrenós	Nº Médio de Rebentos Axilares
Enraiz. <i>in vitro</i> (0 sem.)	0	0	0	4,33±0,15b	10,19±0,36c	5,14±0,19b	0
Enraiz. <i>in vitro</i> (4 sem.)	0,86±0,03a	0,38±0,15a	28,6c	4,48±0,14bd	8,19±0,44c	5,24±0,18b	0
Aclim. <i>in vitro</i> (0 sem.)	1,55±0,04b	2,95±0,48b	84,0c	4,95±0,18bd	8,86±0,61c	5,62±0,24bd	0
Aclim. <i>in vitro</i> (1 sem.)	n.c.	n.c.	n.c.	6,86±0,36cd	11,24±0,81c	6,67±0,30bd	0
Aclim. Estufa Fechada (4 sem.)	n.c.	n.c.	n.c.	8,50±0,40cd	14,00±0,55b	7,76±0,29cd	0
Aclim. Estufa Fechada (12 sem.)	n.c.	n.c.	n.c.	16,30±0,81ac	23,35±0,95a	12,53±0,45ac	2,06±0,38a
Aclim. Estufa Aberta P.S. (1 sem.)	n.c.	n.c.	n.c.	16,41±0,80ac	23,47±0,96a	12,53±0,45ac	2,06±0,38a
Aclim. Estufa Aberta P.S. (16 sem.)	n.c.	n.c.	n.c.	35,47±1,19a	39,35±1,84a	21,71±1,18a	2,94±0,33a

Alongamento Médio/6 meses (Aclim. Estufa Fechada 12 sem – Enraiz. *in vitro* 0 sem) =

=11,97 cm $\Rightarrow$ Alongamento Médio / mês = 2,00 cm

Alongamento Médio / 4 meses (Aclim. Estufa Aberta P.S. 16 sem – Aclim. Estufa Aberta P.S. 1 sem) =

=19,06 $\Rightarrow$ Alongamento Médio / mês = 4,76 cm

Determinação do conteúdo hídrico

O conteúdo hídrico das folhas foi determinado para um $n=3$ por condição e por determinação dos pesos fresco e seco. Foram colhidas folhas (0,1-0,2 g) dos rebentos/plantas nas diversas fases. Após a determinação do peso fresco, as amostras foram colocadas numa estufa a 60°C até à estabilização do peso seco.

O conteúdo hídrico do material vegetal (CH) foi determinado pela seguinte equação:

$$CH = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

Determinação do conteúdo clorofilino e eficiência fotossintética

A extracção de clorofilas baseou-se no método de ARNON (1949). Para cada amostra foi pesado app. 0,2-0,25 g de material vegetal, que foi homogeneizado com 3 ml de acetona (Merk, 80%, v/v). Agitou-se a mistura vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugou-se o homogeneizado a 2800xg durante 5 min. e recolheu-se o sobrenadante (na obscuridade). Adicionou-se ao sedimento 2 ml de acetona a 80%, agitou-se e repetiu-se a centrifugação. Adicionou-se o sobrenadante resultante ao sobrena-

dante da primeira centrifugação, perfazendo o volume de 5 ml com acetona a 80% (nos casos em que ocorreu evaporação).

A quantificação das clorofilas foi feita em seis réplicas ($n=6$) para cada condição, num espectrofotómetro Beckman DV 68, a 645 nm (A_{645}) e 663 nm (A_{663}), utilizando como branco acetona a 80%. As concentrações de clorofila *a* (Cl_a) e clorofila *b* (Cl_b) foram determinadas de acordo com as seguintes fórmulas:

$$Cl_a \text{ (mg / g.p.f.)} = \frac{[(0,0127 \times A_{663} - 0,00269 \times A_{645})] \times \text{volume do extracto}}{\text{peso fresco}}$$

$$Cl_b \text{ (mg / g.p.f.)} = \frac{[(0,0229 \times A_{645} - 0,00468 \times A_{663})] \times \text{volume do extracto}}{\text{peso fresco}}$$

Os parâmetros de eficiência fotossintética foram medidos em folhas ($n=8$) de rebentos/plantas, com o auxílio do aparelho "Plant Efficiency Analyser" - PEA - (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). Antes da medição as plantas foram sujeitas a um período de 30 min. de obscuridade. O nível de fluorescência basal não variável (F_0) e a fluorescência máxima (F_m) induzida foram obtidos por iluminação da área foliar com feixe de luz saturante, com uma intensidade de 70%. O aparelho forneceu assim os valores dos vários parâmetros, nomeadamente a fluorescência basal (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$) e a razão F_v/F_m .

Determinação da Integridade Membranar

A integridade membranar foi determinada por quantificação da permeabilidade membranar (perda de iões/solutos) segundo LUTTS *et al.* (1996). Foram colhidas folhas (app. 100 mg) dos rebentos/plantas nas diversas fases e

constituíram-se três réplicas ($n=3$) para cada condição. As folhas intactas foram colocadas num tubo estéril com 5 ml de água desionizada e sujeitas a agitação (85 rpm) durante 24 h. Após este período de tempo foi lida a condutividade eléctrica da solução (Lt) (Multiparameter Analyser CONSORT C830). Foi ainda retirada uma alíquota desta solução e lida a absorvância (Espectrofotómetro Beckman DV 68) a 280 nm (A_{280}). As amostras foram posteriormente autoclavadas a 121°C por 10 min., tendo-se procedido a uma nova leitura da condutividade eléctrica (L0) e da absorvância final a 280 nm (A_{280}').

A perda de electrólitos foi definida como Lt/L0 e expressa em percentagem. Foi ainda determinada a perda relativa de solutos (RLR) como $RLR = A_{280}/A_{280}'$ e expressa em percentagem.

Análise dos resultados

Os dados foram analisados utilizando a análise de variâncias unifactorial (ANOVA), para testar a igualdade das médias ($P < 0,05$), através do teste Tuckey (SigmaStat 3.1).

Resultados e discussão

Micropropagação

Estabelecimento de culturas

Uma das principais dificuldades a ultrapassar no estabelecimento da cultura *in vitro* foi a desinfecção, devido à elevada contaminação patogénica que os ramos colhidos da planta-mãe apresentavam. Contudo, com o método de desinfecção utilizado, obteve-se uma taxa de sucesso de desinfecção/sobrevivência de 34% e 22% para os génotipos OG4 e OG8, respectivamente. O abrolhamento

nos segmentos nodais foi de 50 a 90%. A dificuldade de desinfecção é um aspecto largamente focado em trabalhos de estabelecimento de culturas *in vitro*, sobretudo a partir de material proveniente de campo (e.g. PINTO *et al.*, 2002; ERIG e SCHUCH, 2003; CHAVES *et al.*, 2005). Uma situação semelhante à aqui descrita foi referenciada para a oliveira na cv. Nebbiara, uma cultivar italiana em risco (ZACCHINI e AGAZIO, 2004).

Pela experiência adquirida, não é viável otimizar um protocolo de desinfecção, mas antes recomenda-se desenvolver para cada população de indivíduos, integrada num determinado ecossistema, um método de compromisso que permita simultaneamente a maior taxa de sobrevivência e a menor taxa de infecção.

Multiplicação e alongamento de rebentos

Os explantes de ambos os genótipos (OG4 e OG8) inoculados em meio de multiplicação cresceram e desenvolveram novos rebentos. Após 4-6 semanas ocorreu a proliferação de *callus* na base dos rebentos (Quadro 3). Durante a multiplicação de OG4, ocorreu uma forte dominância apical nos segmentos apicais, enquanto nos segmentos basais formou-se um maior número de novos rebentos axilares (Quadro 3, Figura 1 C, D). Assim, os segmentos basais permitem uma maior taxa de multiplicação, confirmando resultados obtidos anteriormente para *Olea europaea* cv. Nebbiara por ZACCHINI e AGAZIO (2004). De salientar ainda que os rebentos provenientes de segmentos basais tiveram um alongamento superior ao dos segmentos apicais.

O genótipo OG4 mostrou um maior alongamento médio, assim como um

maior número de nós e produziu menos *callus* do que o genótipo OG8 (Quadro 3). A elevada proliferação de *callus* em OG8 pode ter contribuído para o menor crescimento dos rebentos. Num ensaio com a cv. Nebbiara, ZACCHINI e AGAZIO (2004) encontraram nos meios indutores de menor crescimento de rebentos, uma maior proliferação de *callus*, tecido este indesejável em sistemas de micropropagação por segmentos nodais. Por outro lado, o factor genótipo/espécie pode ter influenciado a resposta mínima obtida nos segmentos basais de OG8, que inviabilizou a quantificação de resposta (Quadro 3). Este resultado pode estar relacionado com características do próprio genótipo/espécie (e.g. diferentes ploidias, ver BRITO *et al.*, 2007). Por esta razão os estudos subsequentes foram continuados com o genótipo OG4.

Finalmente, a perda de capacidade de resposta com a idade da cultura tem sido descrita para algumas espécies (e.g. JAIN e DATTA, 1992). No caso da micropropagação por segmentos nodais, a manutenção por dois anos não parece afectar a capacidade de resposta estando esta técnica a ser usada presentemente para a manutenção de germoplasma de de *Olea maderensis in vitro*.

Enraizamento dos rebentos

O ensaio realizado no escuro em meio $\frac{1}{2}$ OMG com 3,22 μ M NAA, foi o que originou a melhor taxa de enraizamento (84%) (Quadro 1). A exposição dos rebentos ao escuro promoveu a capacidade de enraizamento destes, à semelhança do que foi descrito para oliveira por ROUSSOS e PONTIKIS, (2002), e por ZACCHINI e AGAZIO (2004). A posterior passagem para meio $\frac{1}{2}$ OMG sem reguladores de crescimento permitiu

o alongamento das partes aérea e radicular da planta. As primeiras raízes surgiram em média ao fim de 4 semanas (ainda no meio de enraizamento) mas a grande maioria surgiu após 7 semanas (altura em que foi iniciado o processo de aclimatização) (Quadro 4).

Aclimatização

O processo de aclimatização utilizado, descrito no Quadro 2, mostrou-se muito eficaz, uma vez que, até à data, a percentagem de sobrevivência das plantas transferidas para aclimatização é de 97%. Foram já transferidas 48 plantas, da espécie *Olea maderensis*, para Porto Santo, estando em curso a avaliação histo-anatómica, fisiológica e genética destas plantas (Figura 1 E, F, G, H). Estes resultados demonstram, assim, que o processo de aclimatização actualmente disponível apresenta uma elevada eficiência.

Estudos do comportamento das plantas micropropagadas

Análises morfológicas (parâmetros de crescimento)

Verificou-se que a taxa média de alongamento (desde o enraizamento até à transferência para a Ilha de Porto Santo) das plantas provenientes de segmentos apicais do genótipo OG4, foi de cerca de 2,0 cm/mês, superior à verificada na fase de multiplicação (1,21 cm/mês) (Quadros 3 e 4). Durante a aclimatização na Ilha de Porto Santo, o valor médio de alongamento foi de 4,76 cm/mês. Também o número de folhas e entrenós aumentaram significativamente durante a aclimatização (Quadro 4). Surgiram ainda rebentos axilares sobretudo nas últimas semanas de

aclimatização, o que indica crescimento activo das plantas, revelando uma boa resposta destas ao processo adoptado.

A idade das culturas *in vitro* está também associada a um aumento da possibilidade de ocorrência de variabilidade destas que podem ter tradução em alterações fenotípicas. Contudo, a resposta dos diferentes indivíduos/rebentos para os parâmetros analisados mostrou-se relativamente homogênea, o que aponta a ausência de variabilidade (Figura 1 E, H).

Análise de parâmetros fisiológicos de rebentos/plantas

O processo de aclimatização de plantas tem-se revelado complexo (e.g. POSPÍSILOVÁ *et al.*, 1999; HAZARIKA *et al.*, 2003), em particular em oliveira (BRITO, 2000; SANTOS *et al.*, 2003). Durante a aclimatização, as plantas passam pela alteração de vários factores que podem limitar a sua sobrevivência, nomeadamente: a) de uma situação de elevada humidade relativa e fraco desenvolvimento cuticular e estomático (que propiciam uma reduzida taxa de transpiração) para uma situação de baixa humidade relativa que podem causar desidratação e senescência da planta; b) de uma situação de heterotrofia (devido à grande riqueza nutricional e de carboidratos no meio) para um estado de autotrofia que obriga a um aumento da eficiência fotossintética; c) de condições de assépsia, para condições não estéreis (POSPÍSILOVÁ *et al.*, 1999; HAZARIKA *et al.*, 2003). É assim conveniente analisar alguns parâmetros que quantifiquem a capacidade de adaptação das plantas durante esta fase: conteúdo hídrico e capacidade fotossintética (e.g. conteúdo de clorofilas e

eficiência fotossintética) de acordo com BRITO *et al.* (2003), ou ainda o grau de degradação celular avaliado pela medição da integridade membranar. Descrevem-se em seguida alguns dos resultados obtidos durante o processo de aclimatização destas plantas micropropagadas.

Conteúdo hídrico

Da análise da Figura 2 verifica-se que há um aumento, face à planta-mãe, do conteúdo hídrico das folhas dos rebentos em condições *in vitro*, estado que se mantém nas plantas durante a aclimatização até às 16 semanas. Estes resultados mostram que a planta não se encontra em deficiência hídrica. No entanto poderá esperar-se que num período mais avançado de aclimatização, as folhas das plantas possam apresentar valores progressivamente mais baixos de conteúdo hídrico, associado a alterações histo-anatómicas, como por exemplo uma maior cutinização das folhas (Figura 1. F, G).

Determinação dos parâmetros de eficiência fotossintética

A transição de fase heterotrófica para autotrófica requer um esforço da planta para desenvolver a capacidade fotossintética. Este deve ser acompanhado por um aumento de conteúdo de clorofilas *a* e *b*, tal como referido para outras espécies como o tabaco (POSPÍSILOVÁ *et al.*, 1999). Da análise da Figura 3, verifica-se que, enquanto os rebentos *in vitro* apresentam valores de clorofilas *a* e *b* muito próximos dos da planta-mãe (Figura 3 A, B, C), nas plantas aclimatadas ocorre um incremento destas clorofilas. Curiosamente, o aumento de clorofila *a* ocorre mais cedo (1 semana de aclimatização *in vitro*) relativamente à clorofila *b* (aumento significativo ao fim de 4 semanas de aclimatização a estufa, voltando depois a valores próximos da planta-mãe). Uma possível explicação para este resultado pode ser o facto de a síntese *de novo* de clorofila *b* ocorrer a partir da clorofila *a* (TANAKA *et al.*, 1998) levando a uma redução da razão Cl_a/Cl_b (Figura 3 D).

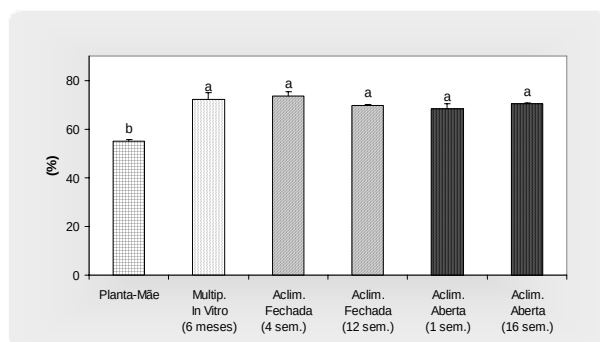


Figura 2 – Conteúdo hídrico (% de H₂O) presente em folhas de oliveira-brava (genótipo OG4), ao longo das várias fases de micropropagação. A sequência descrita no gráfico refere-se a: **Planta-Mãe**; **Multip. In Vitro** – rebentos *in vitro* com 6 meses de idade; **Aclim. Fechada** – plantas em aclimatização a estufa fechada com 4 e 12 semanas de idade; **Aclim. Aberta** – plantas em aclimatização a estufa aberta na Ilha de Porto Santo, com 1 e 16 semanas de idade. Valores médios obtidos para um $n=3 \pm$ erro padrão. Os valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$)

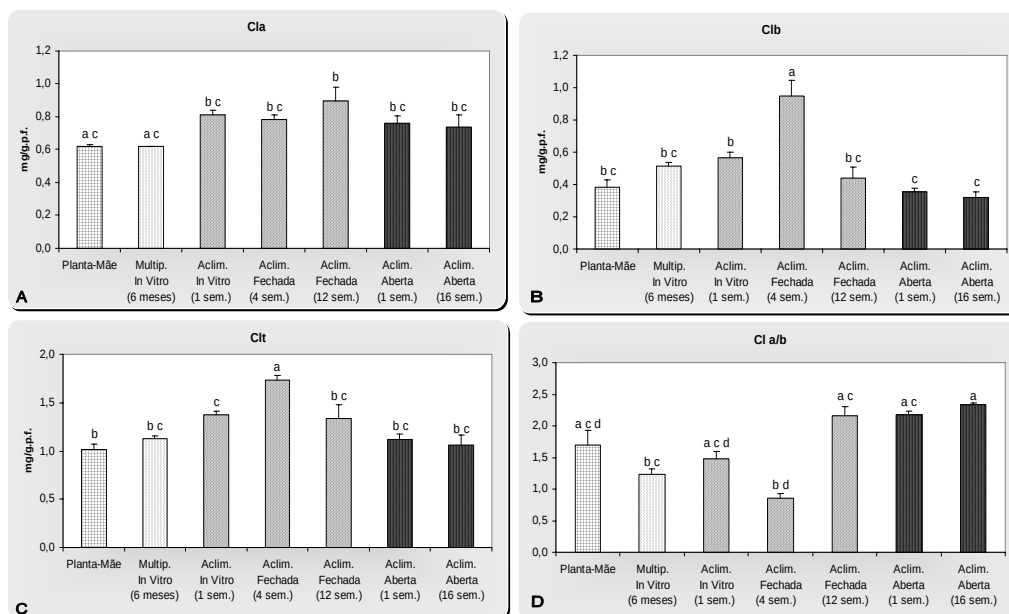


Figura 3 - (Gráficos A a D) -Variação dos teores em clorofilas: (A) clorofila a; (B) clorofila b; (C) clorofila total e (D) razão da Cla/Clb, em folhas de oliveira-brava (genótipo OG4), ao longo das várias fases de micropropagação. A sequência descrita no gráfico refere-se a: **Planta-Mãe**; **Multip. In Vitro** - rebentos *in vitro* com 6 meses de idade; **Aclim. In Vitro** - Plantas em aclimatização *in vitro* com 1 semana de idade; **Aclim. Fechada** - plantas em aclimatização a estufa fechada com 4 e 12 semanas de idade; **Aclim. Aberta** - plantas em aclimatização a estufa aberta na Ilha de Porto Santo, com 1 e 16 semanas de idade. Valores médios obtidos para um $n=6 \pm$ erro padrão. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$)

Apesar de alguns estudos indicarem que na condição *in vitro* pode ocorrer um decréscimo do conteúdo de clorofilas, tal não se verificou para oliveira-brava. De salientar contudo que o meio utilizado - OMG - foi reforçado em elementos minerais essenciais à maquinaria fotosintética (Fe, Mn e Mg) o que pode ter levado a um aumento da síntese clorofilina neste meio, face a outros meios (OM) referidos na literatura (BRITO, 2006a).

Relativamente aos parâmetros de eficiência fotossintética analisados, verifica-se que a cultura *in vitro* leva a um aumento F_0 enquanto F_m , F_v e F_v/F_m

decrecem, face à planta-mãe (Figura 4 A, B, C, D). Estes valores mantêm-se sensivelmente estáveis durante as primeiras fases de aclimatização (até 12 semanas em estufa fechada) verificando-se contudo uma tendência generalizada para o aumento de F_m e F_v em plantas nesta primeira fase de aclimatização face às plantas *in vitro*, e atingindo valores mais próximos dos da planta-mãe. POSPÍŠILOVÁ *et al.* (1999) referem um aumento dos parâmetros de fluorescência da clorofila a durante a aclimatização de plantas de *Nicotiana tabacum*, confirmando assim a tendência observada para as primeiras fases de aclimatização de

oliveira-brava. De referir ainda que a estabilidade generalizada de F_0 , ocorrida durante as primeiras fases de aclimação, indica a não deterioração dos centros de reacção (clorofila *a*) do PSII durante este período.

Na fase de aclimatização a estufa aberta em Porto Santo, observa-se nos primeiros dias um aumento de F_0 , e decréscimos acentuados dos restantes parâmetros (F_m , F_v , F_v/F_m). Esta redução da fluorescência máxima e variável pode dever-se a uma maior sensibilidade destas plantas às novas condições a que ficaram expostas na ilha (maior intensidade de luz, menor humidade

relativa, exposição a ventos e alteração da composição do solo), no entanto e a confirmar uma boa capacidade de adaptação destas plantas observa-se que ao fim de 16 semanas os valores de F_0 , F_m , F_v e F_v/F_m atingem valores muito similares aos da planta-mãe.

Ressalte-se ainda que a razão F_v/F_m em plantas *in vitro* é aproximadamente 0,8, valor geralmente associado a plantas saudáveis (e.g. DODD *et al.*, 1998). Esta razão mantém-se, durante todo o processo, relativamente estável (entre 0,70 e 0,85) o que sugere que houve alguma estabilidade na maquinaria fotossintética das plantas.

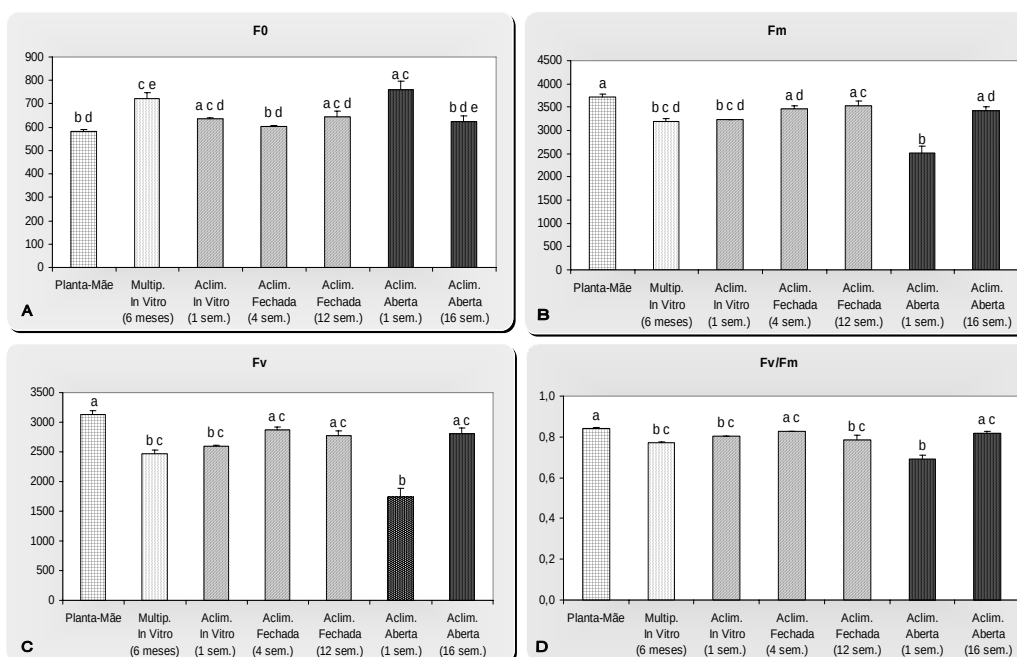


Figura 4 – (Gráficos A a D) – Parâmetros de fluorescência fotossintética: (A) F_0 – fluorescência basal não variável; (B) F_m – fluorescência máxima; (C) F_v – fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$); (D) razão F_v/F_m lidos em folhas de oliveira-brava (genótipo OG4) ao longo das várias fases de micropropagação. A sequência descrita no gráfico refere-se a: **Planta-Mãe**; **Multip. In Vitro** – rebentos *in vitro* com 6 meses de idade; **Aclim. In Vitro** – Plantas em aclimatização *in vitro* com 1 semana de idade; **Aclim. Fechada** – plantas em aclimatização a estufa fechada com 4 e 12 semanas de idade; **Aclim. Aberta** – plantas em aclimatização a estufa aberta na Ilha de Porto Santo, com 1 e 16 semanas de idade. Valores médios obtidos para um $n=8 \pm$ erro padrão. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$)

Determinação da integridade membranas

A integridade membranas é correntemente avaliada pelo seu grau de permeabilidade. Esta pode ser medida pela extrusão de electrólitos (Figura 5 A) e de solutos (Figura 5 B) por parte de folhas intactas em água desionizada. Verifica-se que os processos de micropropagação e aclimatização não induziram acentuadas perdas de solutos/electrólitos por parte das folhas, indicando que as membranas celulares se encontram com graus de integridade similares aos existentes nas folhas da planta-mãe. Saliente-se ainda que os cloroplastos são os primeiros organelos a sofrer degradação em situações de senescência celular (SILLANPÄÄ, 2003). Assim, da análise destes resultados verifica-se relativa estabilidade nas primeiras fases de aclimatização, o que sustenta que o protocolo usado para aclimatização está a ser eficiente.

Conclusões

A micropropagação em larga escala é um requisito para a utilização desta técnica em programas de melhoramento vegetal. Um exemplo desta aplicação em Portugal é a micropropagação de *Olea maderensis* (autóctone da Ilha de Porto Santo e actualmente em risco) e a integração destas plantas em programas de repovoamento florestal da Ilha.

Descrevemos aqui um protocolo de cultura *in vitro* de segmentos nodais que apresenta uma excelente taxa de multiplicação. Do mesmo modo, o protocolo de enraizamento dos rebentos foi otimizado (atinge 84%), o que mostra que a micropropagação de oliveira-brava se encontra presentemente otimizada. Durante o processo de aclimatização, verificou-se uma elevada taxa de sobrevivência, e as plantas não apresentaram sinais fisiológicos/morfológicos de stress e/ou senescência.

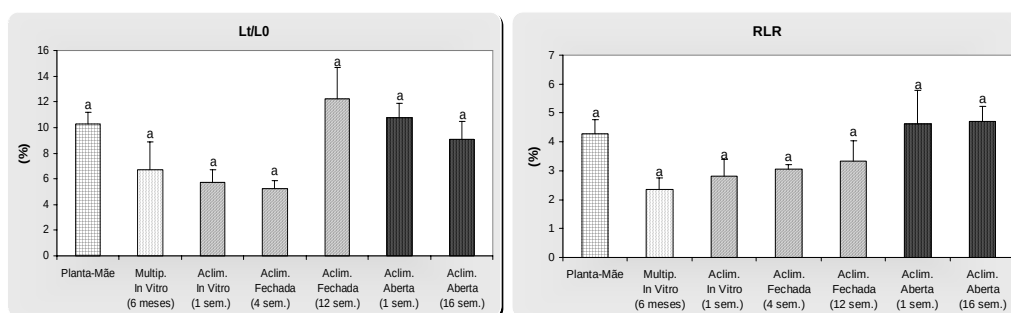


Figura 5 - (Gráficos A e B) - Integridade membranas expressa: (A) através da perda de electrólitos (electrolyte leakage) definida como $Lt/L0$ e (B) através da perda relativa de solutos (Relative leakage ratio - RLR) definida como $RLR = A_{280} / A_{280'}$. Os parâmetros foram obtidos em folhas de oliveira-brava (genótipo OG4), ao longo das várias fases de micropropagação. A sequência descrita no gráfico refere-se a: **Planta-Mãe**; **Multip. In Vitro** - rebentos *in vitro* com 6 meses de idade; **Aclim. In Vitro** - Plantas em aclimatização *in vitro* com 1 semana de idade; **Aclim. Fechada** - plantas em aclimatização a estufa fechada com 4 e 12 semanas de idade; **Aclim. Aberta** - plantas em aclimatização a estufa aberta na Ilha de Porto Santo, com 1 e 16 semanas de idade. Valores médios obtidos para um $n=3 \pm$ erro padrão. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$)

Deste modo dispomos de um protocolo de micropropagação e aclimatização rotineira de *Olea maderensis* (pronto a disponibilizar a entidades do Arquipélago da Madeira). Estas plantas estão em aclimatização na Ilha, para implantação em locais a definir, em integração com actuais projectos de reflorestação. Este protocolo está também a ser utilizado na preservação de germoplasma de oliveira-brava.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Direcção Regional de Florestas da Região Autónoma da Madeira, Secretaria Regional da Educação da Região Autónoma da Madeira, Câmara Municipal de Porto Santo e Centro de Estudos do Ambiente e Mar (CESAM). Agradecem igualmente ao Eng.º Armando Costa e Dra.(s) Tina Lopes, Ana Sofia Gabriel, Glória Pinto e D. Irene Oliveira, por todo o apoio prestado durante o trabalho de investigação. Este projecto foi financiado pela FCT -PNAT/1999/AGR/15011/99.

Bibliografia

- ARNON, D., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15.
- BRITO, G., 2000. Micropropagação de duas espécies autóctones da Ilha de Porto Santo (*Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe e *Juniperus phoenicea* L.) e estudo da resposta de rebentos *in vitro* a stress osmótico. Tese de Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras, Universidade de Aveiro.
- BRITO, G., COELHO, C., SANTOS, C., 2006a. Micropropagação de *Olea europaea* spp. *maderensis* para preservação de germoplasma e combate à desertificação de Porto Santo. IV Jornadas Florestais da Macaronésia – Congresso de Recursos Florestais. La Palma, Canárias, Junho. Livro de Resumos (abstract)
- BRITO, G., COSTA, A., FONSECA, H., SANTOS, C., 2003. Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* *in vitro* shoots to osmotic stress. *Scientia Horticulturae* **97**: 411-417.
- BRITO, G., GONÇALVES, F., SANTOS, C., 2006b. Contributo do Projecto REI na avaliação dos ecossistemas de Porto Santo. *Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural)* (submetido).
- BRITO, G., LOUREIRO, J., LOPES, T., RODRIGUEZ, E., SANTOS, C., 2007. Genetic characterization of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, DOI 10.1007/s10722-007-9268-8.
- CAPELO, J., SEQUEIRA, M., JARDIM, R., COSTA, J.C., 2004. Guia da Excursão Geobotânica dos V Encontros ALFA 2004 à Ilha da Madeira. In *Quercetea* **6**: 5- 45. ALFA, Lisboa, Portugal.
- CHAVES, A.C., SCHUCH, M.W., ERIG, A. C., 2005. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L.. *Ciênc. Agrotec., Lavras* **29**(6): 1281-1287
- COSTA, C.J., CAPELO, J., JARDIM, R., SEQUEIRA, M., 2004. Catálogo Florístico do Arquipélago da Madeira. In *Quercetea* **6**: 187-200. ALFA, Lisboa, Portugal.
- COZZA, R., TURCO, D., BATI, C., BITONTI, M.B., 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell, Tissue & Org. Culture* **51**: 215-223.
- DODD, I., CRITCHLEY, C., WOODALL, G., STEWART, G., 1998. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1437-1445

- ERIG, A.C., SCHUCH, M.W., 2003. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus Domestica* Borkh.) Cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. R. bras. Agrociência **9**(3): 221-227
- GRIGORIADOU, K., VASILAKAKIS, M., ELEFThERIOU, E.P., 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell, Tissue & Org. Culture* **71**: 47-54.
- HARTMAN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. JR., GENEVE, R.L., 1997. Plant propagation: principles and practices (Sixth Edition). Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- HAZARIKA, B.N., 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* **85**: 1704-1712
- HESS, J., KADEREIT, W., VARGAS, P., 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Molecular Ecology* **9**: 857-868
- JAIN, A.K., DATTA, R.K., 1992. Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**(1): 43-50.
- LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* **78**: 389-398.
- MENCUCINI, M., 2003. Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* **97**: 129-139.
- MOREIRA, H., 2006. Caracterização físico-química e microbiológica de águas e solos da Ilha de Porto Santo. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 437-479.
- OLIVEIRA, M.M., 2000. Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. *Boletim de Biotecnologia* **66**: 22-27. dequim.ist.utl.pt/bbio/
- PINTO, G., VALENTIM, H., COSTA, A., CASTRO, S., SANTOS, C., 2002. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. - *In vitro* cell. dev. Biol. Plant. **38**: 569-572.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I., KADLEČEK, P.; HASEL, D., PLZÁKOVÁ, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* **42**(4): 481-497.
- RAMA, P., PONTIKIS C.A., 1990. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) 'Kalamon'. *Journal of Horticultural Science* **65**(3): 347-353
- RIVAS-MARTÍNEZ, S.L., DÍAZ, T.E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F., IZCO, J., LOIDI, J., LOUSÁ, M., PENAS, A., 2002. Vascular plant communities of Spain and Portugal - Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobotanica* **15**: 5-922.
- ROUSSOS, P.A., PONTIKIS, C.A., 2002. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation* **37**: 295-304.
- RUGINI, E., 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulture* **24**:123-134.
- SANTOS, C., 2005. Relatório Final de Actividades do Projecto REI - PNAT/1999/AGR/15011/99. UA.
- SANTOS, C., BRITO, G., PINTO, G., FONSECA, H., 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. *Scientia Horticulturae* **97**: 83-87.

- SILLANPÄÄ, M., 2003. Leaf senescence in silver birch. PhD thesis, Helsinki.
- TANAKA, A., ITO, H., TANAKA, R., TANAKA, N.K., YOSHIDA, A.K., OKADA, K., 1998. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12719-12723
- VARGAS, P., MUÑOZ, G.F., HESS, J., KADEREIT, J.W., 2001. *Olea europaea* ssp. *guanchica* and ssp. *maroccana* (Oleaceae) two new names for olive tree relatives. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **58**.
- ZACCHINI, M., DE AGAZIO, M., 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum* **48**(4): 589-592.

Entregue para publicação em Agosto de 2006

Aceite para publicação em Fevereiro de 2007

¹ Existe alguma controvérsia acerca da taxonomia do complexo *Olea*, principalmente no que se refere às espécies endémicas da Macaronésia (e.g. HESS *et al.*, 2000, VARGAS 2001, RIVAS-MARTINEZ *et al.*, 2002) . Estudos moleculares e estudos de poidia recentes (BRITO *et al.*, 2007) encontraram evidências que contribuíram para uma melhor caracterização de espécies de oliveira e em particular da espécie *Olea maderensis* (= *O. europaea* ssp. *cerasiformis* Webb and Berth. ex Kunkel and Sunding; = *Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe). Até uma maior clarificação pela comunidade científica, será adoptada esta nomenclatura (*Olea maderensis*) ao longo deste artigo.