

Oliveiras singulares do concelho de Alfândega da Fé: contributo para a sua identificação e caracterização

Fernando Daniel Madureira Martins

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

Orientado por

Nuno Miguel de Sousa Rodrigues

Sandra Isabel Correia Lamas

Bragança

2025

Este trabalho contou com o apoio financeiro do projeto “OleaPrime - Prospecção e caracterização de oliveiras centenárias para a sua preservação e valorização”. Financiada pelo Programa Promove 2021 “Promove o Futuro do Interior”, financiado pela FCT e Fundação La Caixa. Ref. PV21-00020.

Agradecimentos

A realização desta tese só foi possível graças ao apoio e colaboração de diversas pessoas às quais expresso aqui a minha profunda gratidão.

Ao professor Nuno Rodrigues agradeço pela orientação dedicada, paciência e incentivo constante ao longo deste percurso. Os seus conselhos foram fundamentais para o meu crescimento académico e pessoal.

À Sandra Lamas agradeço pela dedicação incansável, pela paciência em tantos momentos de nervosismo e por me acompanhar em cada etapa deste processo. Obrigado por acreditares no meu trabalho e por contribuíres para a concretização desta etapa tão importante da minha vida.

Aos colegas do laboratório AgroBioTecnologia Azeites, agradeço pela amizade, por toda a ajuda prestada na realização dos trabalhos experimentais e pelo ambiente único com que se vive cada dia. Cada troca de ideias e cada momento partilhado foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, deixo o meu agradecimento pelo apoio emocional, pelas mensagens de incentivo e por estarem presentes mesmo nos dias mais desafiadores. Vocês foram fundamentais para manter o equilíbrio e a motivação ao longo deste processo.

À minha família, minha base e maior fonte de força, profunda gratidão. Obrigado pelo amor incondicional, pela compreensão e pelo apoio constante. Sem vocês, este sonho não seria possível. Este trabalho também é vosso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, deixo aqui o meu muito obrigado.

Índice

Resumo	viii
Abstract.....	ix
1.Introdução.....	2
2.Olivicultura a nível mundial	6
2.1.Olival em Portugal.....	7
2.2.Principais cultivares.....	10
2.2.1.Principais cultivares em Trás-os-Montes	11
2.2.2.Outras cultivares em Portugal	13
2.3.Oliveiras centenárias em Portugal	14
2.3.1.Fatores que levam à perda deste património	15
2.3.2.Porque valorizar as oliveiras centenárias.....	17
3.Desenho experimental	20
3.1. Amostragem	20
3.2. Caracterização morfológica.....	21
3.2.1. Folha	21
3.2.2. Fruto	21
3.2.3. Endocarpo.....	22
3.3. Extração de azeites	22
3.4. Parâmetros de qualidade do azeite.....	23
3.4.1. Acidez.....	24
3.4.2. Índice de Peróxidos	25
3.4.3. Coeficiente de extinção específico no ultravioleta.....	25
3.4.4. Análise sensorial descritiva	26
3.5. Atividade antioxidante dos azeites	27
3.5.1. Preparação do extrato	27
3.5.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1 picrilhidrazilo (DPPH).....	28
3.5.3. Fenóis totais.....	28
3.6. Caracterização genética	29
3.6.1. Extração de DNA	29
3.6.2. Amplificação do DNA.....	30
3.6.3. Análise de fragmentos	31
3.7. Tratamento estatístico e análise de dados.....	33

3.7.1. Análise estatística da caracterização morfológica de folhas, frutos, endocarpo e qualidade do azeite.....	33
3.7.2. Tratamento e análise dos dados genéticos.....	33
4.Resultados e Discussão.....	36
4.1. Análise morfológica	36
4.1.1. Folhas	36
4.1.1.1. Parâmetros quantitativos	36
4.1.1.2. Parâmetros qualitativos	39
4.1.2. Fruto e endocarpo	40
4.1.2.1. Parâmetros quantitativos	40
4.1.2.2. Parâmetros qualitativos	46
4.2. Parâmetros de qualidade.....	53
4.2.1. Acidez.....	53
4.2.2. Índice de Peróxidos	53
4.2.3. Coeficiente de extinção no ultravioleta	54
4.2.4. Análise Sensorial	56
4.3. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH	63
4.4. Teor em Fenóis Totais	64
4.5. Caracterização genética	65
4.5.1. Frequências alélicas.....	65
4.5.2. Estimativas da diversidade genética.....	68
4.5.2.1. Número de alelos por locus (N_a).....	68
4.5.2.2. Número efetivo de alelos (N_e).....	69
4.5.2.4. Heterozigotia esperada e observada	69
4.5.3 Análise da estrutura genética.....	70
4.5.3.1. Structure	70
4.5.3.2. Relações genéticas e agrupamento varietal	72
5. Conclusão e perspectivas futuras	75
Referências bibliográficas	78
Anexos... ..	87

Índice de figuras

Figura 1- Evolução da área de olival (ha), em Portugal, por regiões entre 2002 e 2022 (Fonte: INE, 2023).....	9
Figura 2 – Principais cultivares por região. Fonte: “Recursos genéticos da oliveira e sua preservação no contexto das alterações climáticas”, de António Cordeiro e Carla S. França Inês, INIAV (2017b).	11
Figura 3 - Localização geográfica dos exemplares selecionados na região de Alfândega da Fé. Mapa projetado em ETRS89/PT-TM06 sistema.....	20
Figura 4 – Exemplos de folhas de oliveira, representando as principais características morfológicas avaliadas (forma, curvatura e proporções dimensionais).	21
Figura 5 – Exemplos de frutos de oliveira, representando as principais características morfológicas avaliadas: dimensões, forma, simetria, presença de mamilo, lenticulas e cor da epiderme.....	22
Figura 6 – Exemplos de endocarpos de oliveira representando as principais características morfológicas avaliadas: dimensões, forma, simetria, rugosidade da superfície e presença de mucrão.	22
Figura 7 – Processo de extração dos azeites em sistema piloto Abencor.	23
Figura 8 – Atividade antioxidante, expressa em % de inibição, determinada pelo método DPPH.	63
Figura 9 - Teor de fenóis totais nos diferentes genótipos, expresso em mg de ácido gálico por kg de azeite (mg ác. Gal./kg azeite).	64
Figura 10- Valores de ΔK determinados para um número de grupos (K) de 1 a 6 da população de 31 genótipos de oliveira.	71
Figura 11- Estrutura populacional inferida pelo programa STRUCTURE para valores de K variando de 2 a 6.....	72
Figura 12- Dendrograma de agrupamento hierárquico baseado em distâncias genéticas entre os genótipos analisados.	73

Índice de tabelas

Tabela 1- Loci utilizados e respectivos fluoróforos.....	32
Tabela 2- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis.....	37
Tabela 3- Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência..	39
Tabela 4- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos e endocarpos de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis.	43
Tabela 5- Frequência de ocorrência (%) das diferentes características morfológicas observadas nos frutos de cada genótipo.	47
Tabela 6- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.	50
Tabela 7- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.	51
Tabela 8- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.	52
Tabela 9- Valores médios \pm desvios padrões dos parâmetros de qualidade, nomeadamente a acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (mEq.O ₂ /kg de azeite), K ₂₃₂ , K ₂₆₈ e Δ K, determinados para os diferentes genótipos.....	55
Tabela 10- Sensações olfativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites.	59
Tabela 11- Sensações gustativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites.	60
Tabela 12- Frequências alélicas para cada um dos locus analisados e o tamanho dos respectivos alelos, em pares-base (pb).	66
Tabela 13- Estimativas da diversidade genética dos 31 genótipos selecionados.....	70

Resumo

A oliveira constitui uma das culturas de maior relevância na região do mediterrâneo. O seu cultivo contribui significativamente para a conservação ambiental, valorização paisagística e sustentabilidade das zonas rurais. A região de Trás-os-Montes, a segunda maior produtora de azeite de Portugal, preserva um património olivícola de elevado valor, com oliveiras centenárias que se destacam pela sua resiliência a condições adversas, representando um reservatório crucial de biodiversidade. No entanto, diversos fatores têm contribuído para a acentuada perda deste património. Estas adversidades têm conduzido ao abandono ou à substituição destas oliveiras centenárias por cultivares mais adaptadas às condições atuais, ou mesmo por outras culturas que não a oliveira.

Nesse contexto, a presente dissertação teve como objetivo proceder à caracterização de 31 oliveiras centenárias de cultivares não identificadas no concelho de Alfândega da Fé, uma região amplamente reconhecida pela sua rica tradição olivícola. Foram efetuadas análises morfológicas (folha, fruto e endocarpo), físico-químicas e sensoriais do azeite, incluindo determinação de acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{268} , ΔK , atividade antioxidante e caracterização genética. Os resultados da análise morfológica da folha de oliveira, do fruto e do endocarpo amostradas não permitiram uma identificação completa das cultivares. O peso e diâmetro do fruto e do endocarpo foram as características mais diferenciadoras. Relativamente aos parâmetros de qualidade, estes encontravam-se dentro dos intervalos estabelecidos para a categoria comercial de azeite virgem extra, embora algumas amostras apresentassem valores próximos dos limites legais. Na análise genética, os 11 loci utilizados permitiram detetar 55 alelos nas 31 oliveiras analisadas, evidenciando a existência de uma grande diversidade. A análise pelo software Structure permitiu diferenciar as cultivares em dois grupos de oliveiras.

Entre os loci estudados, SSR4, SSR5, SSR9 e SSR10 foram os que possibilitaram uma maior diferenciação de genótipos podendo revelar-se especialmente úteis na certificação de oliveiras centenárias.

Foram identificados apenas três genótipos do total de 31 amostras, sendo necessária a comparação dos fragmentos identificados com uma base de dados mais completa. No entanto, com base nos resultados obtidos, é recomendável a conservação destes exemplares de oliveiras centenárias, uma vez que apresentam uma grande diversidade genética.

Palavras-chave: Oliveiras centenárias; Biodiversidade; Sustentabilidade; Valorização; Azeites diferenciados.

Abstract

The olive tree is one of the most important crops in the Mediterranean region. Its cultivation contributes significantly to the environmental conservation, landscape enhancement, and the sustainability of rural areas. The Trás-os-Montes region, the second largest olive oil producer in Portugal, preserves a valuable olive-growing heritage, with centuries-old olive trees that stand out for their resilience to adverse conditions, representing a crucial reservoir of biodiversity. However, several factors have contributed to the marked loss of this heritage. These adversities have led to the abandonment or replacement of these centuries-old olive trees with cultivars better adapted to current conditions, or even with other crops besides olives.

In this context, this dissertation aimed to characterize 31 centuries-old olive trees of unidentified cultivars in the municipality of Alfândega da Fé, a region widely recognized for its rich olive-growing tradition. Morphological (leaf, fruit and endocarp), physicochemical and sensory analyses of the olive oil were performed, including determination of free acidity, peroxide value, K_{232} , K_{268} , ΔK , antioxidant activity and genetic characterization. The results of the morphological analysis of the sampled olive leaf, fruit and endocarp did not allow a complete identification of the cultivars. The weight and diameter of the fruit and endocarp were the most differentiating characteristics. Regarding the quality parameters, these were within the ranges established for the commercial category of extra virgin olive oil, although some samples presented values close to the legal limits. For the genetic analysis, the 11 loci used allowed the detection of 55 alleles in the 31 olive trees analyzed, evidencing the existence of a great diversity. The analysis by the Structure software allowed the differentiation of the cultivars into two groups of olive trees.

Among the loci studied, SSR4, SSR5, SSR9 and SSR10 were those that allowed for the greatest differentiation of genotypes and may prove especially useful in the certification of centenary olive trees.

Only three genotypes were identified from a total of 31 samples, and it is necessary to compare the identified fragments with a more complete database. However, based on the results obtained, the conservation of these centenary olive tree specimens is recommended, since they exhibit great genetic diversity

Keywords: Centenarian olive trees; Biodiversity; Sustainability; Valorisation; Differentiated olive oils.



Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas mais representativas da bacia mediterrânica, concentrando 97,9% da sua superfície total nessa região (Rallo et al., 2018). A azeitona e o azeite são elementos essenciais no dia a dia, sendo fundamentais para a alimentação de muitas comunidades. Para além dos seus produtos, a oliveira possui também uma grande importância económica, social e cultural (Ramos-Román et al., 2019), tal como um papel significativo na conservação ambiental e na valorização paisagística, contribuindo para a sustentabilidade e preservação das populações das zonas rurais (Rodrigues et al., 2022).

De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAOSTAT, 2023), existem atualmente mais de 11,14 milhões de hectares de olival em todo o mundo, distribuídos por 64 países produtores de azeite. Em Portugal a área cultivada de olival corresponde a 380 879 ha, dos quais aproximadamente 98,3% destina-se à produção de azeite e os restantes 1,7% à produção de azeitona de mesa (INE, 2023). A produção global de azeite tem apresentado um crescimento exponencial, impulsionado pela maior produtividade das novas plantações em comparação com as tradicionais. Nas últimas campanhas, a produção a nível mundial tem constantemente ultrapassado a marca dos 3 milhões de toneladas de azeite (FAOSTAT, 2023).

Em Portugal, a produção de azeite está distribuída por todo o território nacional, sendo distintas as regiões de maior produção. O Alentejo destaca-se como a principal região produtora de azeitona, representando 82,5% da produção nacional (INE, 2023). Nesta região, predominam os olivais intensivos ou de alta densidade, que apresentam as maiores produções por hectare (Fraga et al., 2020b). Os olivais intensivos ou de alta densidade são caracterizados pelo plantio de um grande número de árvores por hectare, geralmente entre 200 e 600 plantas por hectare no caso de olivais intensivos e 800 a 2000 plantas por hectare no caso de olivais de alta densidade. Esse modelo visa maximizar a produtividade e facilitar a colheita mecanizada. Como segunda maior região produtora, destaca-se o Norte, responsável por cerca de 8,2% da produção nacional (INE, 2023). Esta região é caracterizada pela predominância de olivais tradicionais, maioritariamente explorados em regime de sequeiro (Lopes et al., 2022). Os olivais tradicionais são caracterizados pelo plantio espaçado das árvores, com menor densidade de plantação, geralmente entre 50 e 120 plantas por hectare. Estes olivais, quando comparados com os sistemas modernos, apresentam menor produtividade, devido à predominância de solos pobres, à escassez de recursos hídricos e/ou à idade avançada das plantas, fatores que

limitam o rendimento por hectare. Além disso, as condições climáticas extremas características das diferentes estações do ano, contribuem para essa baixa produtividade.

De acordo com a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2023), em Portugal estão descritas 65 cultivares de oliveira. Na região Norte, principalmente em Trás-os-Montes, destacam-se as cultivares Cobrançosa, Madural, Verdeal Transmontana, Cordovil, Santulhana e Negrinha de Freixo (Rodrigues et al., 2020). Contudo, existem outras cultivares minoritárias como é o exemplo da Lentisca, Rebolã, Redondal, Borrenta, entre outras que definem a identidade dos azeites da região de Trás-os-Montes. Na última década, têm-se assistido a fenómenos extremos que têm levado a quebras de produção de diversas culturas. A oliveira não é indiferente a estas alterações. As alterações climáticas observadas no Sul da Europa constituem um reflexo do aquecimento global, prevendo-se um aumento da frequência e intensidade da seca nas próximas décadas. Este cenário apresenta desafios significativos para a olivicultura em Portugal, nomeadamente, no que diz respeito à sustentabilidade da produção e à adaptação dos olivais a condições ambientais mais adversas (Fraga et al., 2020a). Embora a oliveira apresente uma certa resistência à seca, prevê-se que as alterações climáticas aumentem a frequência e intensidade deste fenómeno (Tanasijevic et al., 2014). Vários estudos indicam que, até ao final do século XXI, haverá um aumento nas necessidades de rega, uma diminuição da produtividade e alterações na fenologia da oliveira na região do Mediterrâneo, como resultado do agravamento do stress hídrico e térmico (Koubouris et al., 2009; Rodríguez Díaz et al., 2007). Em Trás-os-Montes, existe um grande património olivícola ainda pouco explorado, mas que representa um importante reservatório de biodiversidade, contendo cultivares desconhecidas ou ainda não identificadas (Rodrigues et al., 2020). Esse património tem resistido ao longo dos séculos às diferentes adversidades produtivas mantendo-se em produção até à atualidade. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar e caracterizar oliveiras centenárias de cultivares não identificadas do concelho de Alfândega da Fé. O estudo inclui a caracterização morfológica das folhas, frutos e endocarpos, bem como a determinação genética dos exemplares selecionados. Paralelamente, será realizada a extração individual dos azeites, com avaliação de parâmetros de qualidade, composição e análise sensorial. No final deste estudo, pretende-se obter informação que nos permita não apenas preservar cultivares autóctones, mas também valorizar o produto final, promovendo a sustentabilidade e a diferenciação no mercado nacional e internacional além de poder contribuir para a compreensão da sua resiliência ao longo dos séculos.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco partes distintas. Numa primeira secção faz-se uma breve descrição bibliográfica da cultura da oliveira em especial na região de Trás-os-Montes, sobre a importância de preservar oliveiras centenárias e os fatores que estão a levar à perda irreparável deste património genético único (capítulo 2). O terceiro capítulo é destinado ao material e métodos onde é apresentado o desenho experimental assim como as metodologias aplicadas para a execução deste trabalho. No capítulo quatro são apresentados os resultados e a discussão do presente trabalho. Por fim, no quinto e último capítulo são apresentadas as conclusões bem como sugestões para a realização de trabalhos futuros.



Capítulo 2

Breve descrição do tema

2. Olivicultura a nível mundial

A olivicultura tem uma origem milenar, encontrando-se profundamente associada à história da humanidade. O cultivo da oliveira terá começado muito antes das civilizações grega e romana, por volta de 4000 a.C. (Kostelenos & Kiritsakis, 2017). Devido ao seu valor como fonte de alimento e óleo, a oliveira foi gradualmente dissipada ao longo dos séculos pelo sul da Europa e norte de África. Os primeiros vestígios do cultivo da oliveira remontam a cerca de 4 mil anos a.C., no Médio Oriente, em regiões atualmente correspondentes à Síria, Palestina, Líbano, Turquia e Israel (Soares & Dias, 2024). A oliveira pertence à família *Oleaceae*, composta por cerca de 600 espécies distribuídas em 24 géneros (Soares & Dias, 2024). Contudo, a *Olea europaea* é a única espécie da família que produz frutos aptos para consumo humano. Em termos de distribuição geográfica, a olivicultura é predominante na região do Mediterrâneo, onde as condições climáticas são mais adequadas ao seu cultivo (Correia, 2014).

A oliveira é uma cultura de grande relevância, sobretudo devido à produção de azeite (Özcan & Matthäus, 2017), um produto muito valorizado pelos seus benefícios para a saúde humana, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes (Finicelli et al., 2021), sendo o azeite reconhecido como a principal fonte de gordura na dieta mediterrânica (Brito et al., 2019). Na campanha de 2023/2024, a produção global de azeite atingiu cerca de 2,40 milhões de toneladas, com mais de 90% provenientes da região do Mediterrâneo. A Espanha destaca-se como o maior produtor mundial, responsável por cerca de 31,8% do total, seguida pela Itália com 12% e pela Grécia com 8,1% (COI, 2024). A União Europeia é a principal produtora de azeite no mundo, sendo responsável por aproximadamente 60% da produção mundial. Esta supremacia é assegurada principalmente pelas contribuições de apenas quatro países: Espanha, Itália, Grécia e Portugal, que juntos correspondem a praticamente toda a produção regional.

Aproximadamente 5 milhões de hectares de terras, principalmente nos países mediterrânicos da União Europeia (UE), estão dedicados ao cultivo da oliveira (FAOSTAT, 2023), abrangendo olivais tradicionais, intensivos e superintensivos. Dentro da UE, Itália e a Espanha são os países com maior consumo de azeite, com cerca de 500 000 toneladas anuais cada. No entanto, a Grécia destaca-se pelo consumo *per capita* mais elevado da UE, com cerca de 12 kg por pessoa por ano. Em termos globais, cerca de 53% do azeite produzido é consumido na UE (Comissão Europeia, 2020).

O cultivo da oliveira nas regiões mediterrâneas constitui um setor agroindustrial de elevada relevância, com significativos impactos económicos, agrícolas e ornamentais.

Este setor não apenas contribui para a sustentabilidade económica das zonas rurais, mas também desempenha um papel essencial na coesão social das comunidades agrícolas. Contudo, a agricultura enfrenta desafios preocupantes devido à grande procura por alimentos associada ao crescimento populacional global, competição pelos recursos naturais limitados e aos efeitos adversos das alterações climáticas (Mohanty et al., 2021). Fenómenos climáticos extremos, como secas prolongadas e ondas de calor, representam ameaças à segurança alimentar e à produção agrícola em diversas regiões. Prevê-se que a frequência e a intensidade desses eventos climáticos extremos se tornem mais frequentes, resultando em perdas substanciais de biodiversidade e em impactos socioeconómicos significativos, ao mesmo tempo que impõem pressão sobre as terras aráveis para aumentar a produtividade, frequentemente mediante práticas intensivas, como o uso elevado de fertilizantes e pesticidas (Muluneh, 2021).

2.1. Olival em Portugal

A olivicultura em Portugal apresentou uma evolução significativa ao longo dos anos. Até meados do século XIX, o cultivo da oliveira era considerado uma atividade imprópria no contexto agrícola nacional, com métodos de extração que não garantiam a qualidade do azeite (Reis, 2014). Nessa época, o azeite desempenhava funções diversificadas, sendo utilizado não só como um produto alimentar, mas também para iluminação, como lubrificante de máquinas e no fabrico de sabão. Os olivais existentes eram maioritariamente formados pela enxertia de zambujeiros espontâneos ou pela plantação direta de varas, designadas por tanchões ou estacais, frequentemente dispostas de forma irregular. A falta de interesse pela olivicultura e pela modernização dos lagares, levava à produção de azeite de qualidade inferior.

Em 1954 o olival português ocupava cerca de 570 000 ha, distribuídos por praticamente todo o território nacional. Contudo, na década de 1960, ocorreram alterações substanciais nas políticas setoriais, nos padrões de consumo e nos custos de produção, marcando o início de uma fase de regressão tanto na produção como no consumo de azeite. Em 1986 e 1990, a produção média anual reduziu-se para menos de 34 000 toneladas (INE, 2007). O êxodo rural, o crescimento industrial e a consequente diminuição da mão-de-obra disponível para a olivicultura, devido à redução do número de membros das famílias rurais envolvidos nas atividades agrícolas, resultaram, a partir da década de 1960, numa diminuição contínua da produção oleícola, tendo como

resultando, em 1995, numa redução da área de olival para menos de 340 000 ha (INE, 2007).

A produção olivícola tem sido, desde sempre, uma atividade socioeconómica de grande relevância, particularmente nas regiões do interior de Portugal. A partir da segunda metade do século XIX, com a instalação dos primeiros olivais alinhados, a olivicultura sofreu uma transformação significativa. Até então, os olivais eram predominantemente cultivados nas encostas, uma vez que a oliveira demonstrava grande resiliência em terrenos mais áridos, contrariamente às áreas mais férteis e planas que eram destinadas ao cultivo de outras culturas, como o trigo e outros cereais. (Marques, 2018).

A modernização do setor oleícola em Portugal teve início em 1986, com a adesão do país à União Europeia e a implementação do Plano Nacional para a Cultura da Azeitona. Com o apoio dos fundos europeus, foi possível renovar os métodos de produção e promover uma verdadeira revolução tecnológica nos olivais portugueses, resultando num aumento substancial da produtividade e na melhoria da qualidade do azeite. Numa primeira fase, foram criadas as condições necessárias para a instalação de novos olivais, enquanto na segunda fase, a partir de 1991, iniciou-se a implementação da mecanização nos olivais, com destaque para processos de colheita e limpeza da azeitona.

A nível mundial, Portugal ocupa a nona posição em termos de área de olival, sendo o sétimo maior produtor de azeitona e o oitavo maior produtor de azeite (COI, 2019). Em comparação com o início do século XXI, observou-se uma alteração significativa nas práticas de cultivo, particularmente no que se refere à densidade das plantações. Em 1999, o olival tradicional representava a maior parte da área cultivada, mas atualmente ocupa 134 mil ha (37,2% do total), enquanto o olival intensivo ocupa 119 mil ha (33,2%) e o olival de alta densidade, superintensivo ou em sebe, ocupa 108 mil ha (29,6%) (COI, 2019). Nos últimos 20 anos, o olival português passou por uma transformação substancial, evoluindo de um olival tradicional, com menor competitividade, para um olival moderno, mais eficiente e com maior capacidade produtiva (COI, 2019). Entre 2002 e 2020, a área de olival em Portugal registou um crescimento de apenas 7%, passando de 350 000 ha em 2002 para 380 852 ha em 2020. Esse aumento foi acompanhado pela deslocação significativa da área de olival do centro do país para a região do Alentejo, que atualmente concentra mais de 55% da área olivícola nacional (GPP, 2023). Na Figura 1 podemos observar a evolução da área de olival ao longo do tempo.

Durante esse período, a produtividade média de azeitona aumentou significativamente, passando de aproximadamente 0,5 toneladas/hectare de olival para 2 toneladas/hectare, resultando em um quadruplicar da produção por hectare em apenas 20 anos (INE, 2023). O Alentejo tem sido a região com maior evolução na área agrícola destinada à olivicultura nos últimos vinte anos, como evidenciado na Figura 1, sendo atualmente a principal região produtora de azeitona e azeite em Portugal.

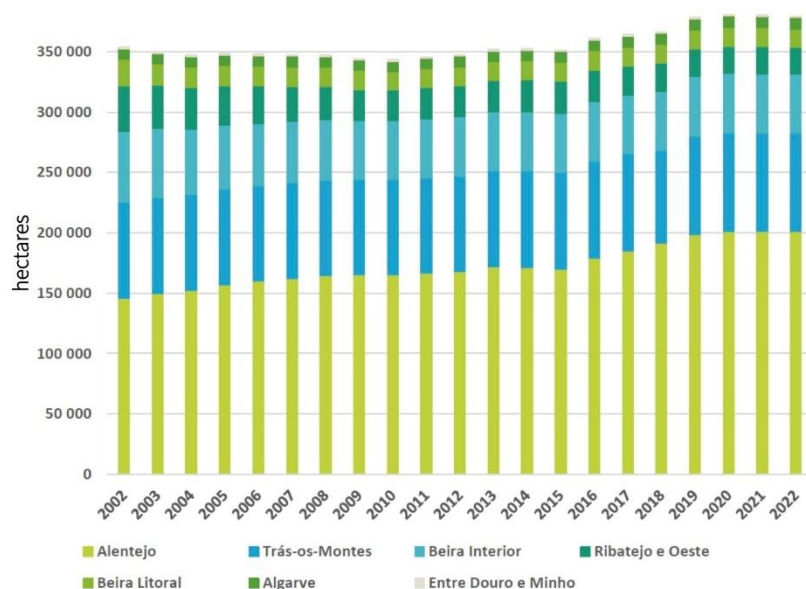


Figura 1- Evolução da área de olival (ha), em Portugal, por regiões entre 2002 e 2022 (Fonte: INE, 2023).

Apesar do crescimento limitado da área de olival em Portugal nas últimas duas décadas, a produção de azeite registou um aumento de 320%. Entre 2000/2001 e 2021/2022, a produção de azeite em Portugal cresceu de 24,6 mil toneladas para mais de 206 mil toneladas, aumentando a sua representatividade na produção mundial de 1% para 6,4%. Com este avanço, a olivicultura consolidou-se como um dos pilares fundamentais da agricultura nacional, colocando Portugal no caminho para se tornar o terceiro maior produtor mundial de azeite na próxima década (Vilar et al., 2023). Este crescimento deve-se, em grande parte, à modernização dos olivais, com a substituição dos sistemas tradicionais por olivais intensivos e superintensivos, que não só aumentam a produção, mas também reduzem os custos (Rallo et al., 2013). Esses avanços, que incluem a adoção de sistemas de plantação de alta densidade e a mecanização da colheita, têm permitido um aumento significativo na produtividade e na competitividade de Portugal no mercado global.

A evolução mais notável ocorreu na região do Alentejo, particularmente com o surgimento do Alqueva, que possibilitou a irrigação, eliminando a incerteza associada à dependência das precipitações para a produção. No entanto, novas áreas de olivais em sebe começaram a surgir, que não dependem da irrigação, mas apresentam elevados índices de produtividade e modelos de cultivo economicamente vantajosos (GPP, 2023).

As principais regiões olivícolas de Portugal incluem o Alentejo (tanto o Alto como o Baixo Alentejo), a Terra Quente em Trás-os-Montes, a Beira Baixa, a Beira Alta e o Ribatejo. É nas áreas de olival tradicional dessas regiões que se observa a maior diversidade de cultivares autóctones, embora também seja onde o risco de erosão genética é mais acentuado (Inês & Cordeiro, 2017).

2.2. Principais cultivares

A nível mundial, estima-se que existam mais de 3000 cultivares de oliveiras, sendo que apenas um número reduzido é cultivada em mais de uma região (Cordeiro et al., 2014). Esta diversidade contribui para uma grande diversidade genética, com muitas cultivares locais/menores pouco cultivadas, bem como exemplares com características monumentais (Hosseini-Mazinani et al., 2014).

Em Portugal, até 2023, encontram-se descritas e referenciadas um total de 65 cultivares de oliveira, cultivadas tanto para produção de azeite como para a produção de azeitona de mesa. Estas cultivares constam do Registo Nacional de Variedades de Fruteiras 2023, e algumas delas são específicas e provenientes de determinadas regiões do país. De acordo com o “Grande Livro da Oliveira e do Azeite – Portugal Oleícola”, as cultivares regionais mais relevantes de oliveira incluem: ‘Galega vulgar’, ‘Cobrançosa’, ‘Verdeal Alentejana’, ‘Cordovil de Serpa’, ‘Azeiteira’, ‘Blanqueta’, ‘Carrasquenha de Elvas’, ‘Verdeal Transmontana’, ‘Madural’, ‘Cordovil de Trás-os-Montes’, ‘Negrinha do Freixo’, ‘Cornicabra’, ‘Carrasquinha’, ‘Cordovil de Castelo Branco’, ‘Bical de Castelo Branco’, ‘Conserva de Elvas’ e ‘Lentrisca’ (Böhm, 2013).

No caso específico da região de Trás-os-Montes, as cultivares de oliveira predominantes são a Cobrançosa, Madural, Verdeal Transmontana, Cordovil e Negrinha de Freixo (Rodrigues et al., 2020). Na Figura 2 pode-se observar a distribuição das cultivares ao longo do território nacional.

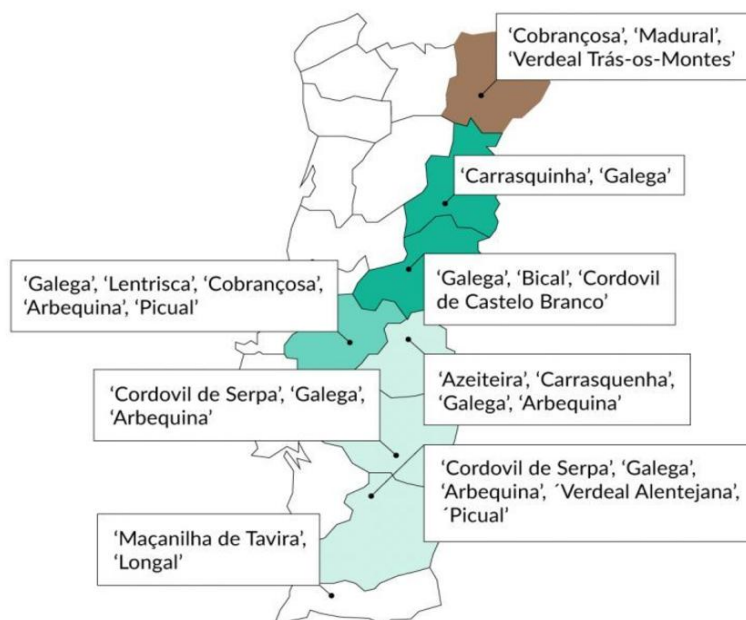


Figura 2 – Principais cultivares por região. Fonte: “Recursos genéticos da oliveira e sua preservação no contexto das alterações climáticas”, de António Cordeiro e Carla S. França Inês, INIAV (2017b).

2.2.1. Principais cultivares em Trás-os-Montes

A **Cobrançosa**, é autóctone de Trás-os-Montes, e é a cultivar mais comum nos azeites de Denominação de Origem Protegida (DOP) de Trás-os-Montes (Sousa, 2014). Além de estar presente nesta região, é também cultivada nas regiões do Ribatejo, Beira Alta e Alentejo. Distingue-se pela sua versatilidade, sendo adequada tanto para a produção de conservas quanto para produção de azeites. Além disso, destaca-se pela elevada regularidade e produtividade, o que provocou uma maior aposta na sua plantação em detrimento de outras cultivares na região (Böhm, 2013). Demonstra boa adaptação à colheita mecânica e tolera o clima frio. No entanto, é moderadamente suscetível a algumas pragas, como o olho-de-pavão e a tuberculose. Os azeites produzidos a partir desta cultivar apresentam um perfil sensorial com aroma e sabor frescos, com sensações verdes, amargas e picantes (Maia, 2014).

A **Madural**, de origem portuguesa e característica de Trás-os-Montes, distingue-se por árvores de porte médio com frutos de tamanho mediano, adequados para a produção de azeites. Cultivada principalmente em Trás-os-Montes e na Beira Interior, apresenta uma boa tolerância ao frio e é reconhecida pela sua produtividade, embora a frutificação seja irregular (Leitão et al, 1986). No entanto, é suscetível a uma elevada incidência de pragas, como o olho-de-pavão e a mosca-da-azeitona. Os azeites provenientes desta cultivar apresentam um perfil sensorial equilibrado, com notas de frutado verde, amargo e picante (Chéu-Guedes et al., 2023).

A **Verdeal Transmontana**, cultivar típica de Trás-os-Montes, é amplamente utilizada na produção de azeite, destacando-se pela sua adaptação à colheita mecânica quando a azeitona atinge a maturação. Caracteriza-se por possuir baixos teores de ácido linoleico (Leitão et al., 1986). Contudo, uma das suas principais desvantagens é a elevada alternância de frutificação e a maturação desigual dos frutos. Esta cultivar é a última das três principais cultivares da região de Trás-os-Montes que compõem os azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP). Os azeites produzidos a partir desta cultivar são característicos por possuírem um perfil sensorial intenso, com notas de frutado verde, tomate e maçã (Rodrigues et al., 2020).

A **Cordovil**, típica da região transmontana, apresenta atualmente menor relevância em comparação com as outras cultivares mencionadas. As suas árvores possuem um porte que varia de pequeno a médio, e os frutos, de tamanho médio, têm a particularidade de serem característicos pela dupla aptidão, ou seja, são adequados tanto para o consumo como azeitona de mesa quanto para a produção de azeite. (Leitão et al., 1986).

A **Negrinha de freixo** disseminada em Trás-os-Montes e Beira Interior, caracteriza-se por árvores de porte pequeno a médio, sendo altamente produtiva e regular. Essas características fazem dela uma cultivar de grande importância para o consumo na região, especialmente para a produção de azeitonas de mesa. Desse modo, os seus frutos, de tamanho médio, são adequados para a produção de azeitonas de mesa, podendo ser colhidos frutos verdes ou totalmente maduros.

A **Santulhana** está presente nos concelhos de Bragança (freguesias de Pombares, Quintela de Lapaças, Sendas, Macedo do Mato e Izeda) e Vimioso (Matela e Santulhão), com origem na freguesia de Santulhão (Monteiro, 1999). Estas oliveiras são caracterizadas por apresentarem um grande porte, com copas volumosas e ramificações médias, e têm ciclo de maturação médio a tardio, com frutos amadurecendo a partir do final de novembro. Os frutos possuem dupla aptidão (azeite e azeitonas de mesa) graças à alta relação polpa/caroço, mas são usados principalmente para azeites devido à tendência de ranço no processo de cura natural. Azeites monovarietais desta cultivar são valorizados pelas suas características químicas e sensoriais únicas, com aromas de tomate, maçã, frutos secos e erva fresca, e sabores frutados com leve amargor e um picante forte e persistente (Rodrigues et al., 2018).

2.2.2. Outras cultivares em Portugal

A **Galega Vulgar**, é uma das cultivares amplamente difundida nas regiões da Beira Interior, Ribatejo, Alentejo e Algarve, sendo utilizada tanto para a produção de azeite como para azeitona de mesa. Esta cultivar apresenta uma elevada suscetibilidade a pragas como a gafa, mosca-da-zeitona e a cochonilha. A Galega vulgar, também conhecida por Galega, é a principal cultivar em Portugal, representando aproximadamente 60% do total de oliveiras do país. Caracteriza-se por possuir uma resistência moderada ao desprendimento dos frutos, com uma queda acentuada das azeitonas no final da maturação, o que a torna pouco adequada para colheitas mecânicas por vibração (Leitão et al, 1986). Esta cultivar, é notável pela elevada rusticidade e porte alternado, destacando-se pela produção de azeite de alta qualidade e pela resistência à seca, embora apresente uma produtividade mediana, em parte devido à sua suscetibilidade a pragas e doenças (Oliveira et al, 2010).

A nível nacional, destacam-se ainda quatro cultivares em termos de produção, particularmente pela ampla utilização em olivais intensivos e superintensivos do sul de Portugal. A introdução de cultivares como Arbequina, Arbosana, Picual e Koroneiki, está inteiramente associada à modernização do setor olivícola. O crescimento dos sistemas superintensivos em regiões como o Alentejo e o Vale do Tejo impulsionou a adoção dessas cultivares estrangeiras, devido à sua elevada rentabilidade e eficiência, especialmente no que diz respeito à mecanização da colheita.

A **Arbequina** é uma cultivar autóctone da região da Catalunha (Espanha), sendo especialmente adequada para plantações intensivas devido ao seu porte compacto. Esta

cultivar é altamente produtiva, com pouca alternância na produção, e a entrada em produção ocorre precocemente (Tous et al., 1998). Apresenta resistência ao frio, porém é sensível à clorose férrica, demonstrando tolerância ao olho-de-pavão e à verticilose (Agustí, 2004). Os frutos desta cultivar apresentam um bom rendimento em azeite, resultando em azeites de qualidade, embora com uma estabilidade relativamente baixa (Barranco, 2008).

A **Arbosana**, outra cultivar espanhola, é amplamente cultivada no Alentejo e Ribatejo. Destaca-se pela sua elevada produtividade e regularidade. Resiste bem ao frio, mas é vulnerável à mosca-da-azeitona e à verticilose.

A **Picual** é uma cultivar originária da Andaluzia (Espanha), amplamente utilizada para a produção de azeite. Esta cultivar é muito produtiva e rústica, mostrando uma boa tolerância ao frio e à salinidade. A árvore tem porte médio, entra em produção de forma precoce e apresenta elevados índices de produtividade (Barranco, 2008; Tous et al., 1998). No entanto, é altamente suscetível ao olho-de-pavão e à verticilose, embora seja tolerante à tuberculose (Agustí, 2004). O rendimento em gordura é elevado, mas a qualidade do azeite produzido é considerada média, com elevados índices de estabilidade e níveis de ácido oleico (Barranco, 2008).

A **Koroneiki**, originária da Grécia, é uma das cultivares mais produtivas, sendo especialmente indicada para olivais superintensivos. Esta cultivar é resistente à seca e ao olho-de-pavão, mas apresenta sensibilidade ao frio.

2.3. Oliveiras centenárias em Portugal

As oliveiras centenárias destacam-se como um elemento essencial da paisagem do olival tradicional. Portugal possui um grande património genético de germoplasma de oliveira representado por muitas cultivares, algumas das quais com distribuição geográfica restrita (Moreira & Veloso, 2009). Em Trás-os-Montes, a oliveira juntamente com a amendoeira e a videira compõem o mosaico paisagístico da região. Ao longo de todo o território transmontano, podemos encontrar vários exemplares de oliveiras centenárias. Muitos destes exemplares pertencem a cultivares desconhecidos, o que os torna uma potencial fonte de azeites com características únicas e diferenciadas (Rodrigues, 2018). No entanto, a sua preservação e exploração de forma sustentável permanecem pouco implementadas. Nos últimos anos, algumas dessas plantas têm vindo a ser alvo de estudo para aumento do conhecimento científico destas plantas centenárias. Têm sido feitos registos quanto às suas características morfológicas e à composição

química dos azeites extraídos dos seus frutos destacando atributos distintos, como elevados níveis de antioxidantes (compostos fenólicos e tocoferóis) e propriedades sensoriais excepcionais (Rodrigues, 2018; Rodrigues et al., 2022). Tem-se observado que existe uma grande variabilidade genética dentro da região e que isso tem contribuído para a diferenciação do azeite produzido.

A região de Trás-os-Montes é o segundo maior produtor de azeite em Portugal. Historicamente, o azeite desta zona é valorizado pela sua qualidade, que se deve, em grande medida, às condições ambientais específicas e ao sistema de produção extensivo predominante, no qual a maior parte da azeitona provém de oliveiras tradicionais. No entanto, essa qualidade está intrinsecamente ligada à rica diversidade genética das oliveiras da região, um património que corre o risco de se perder. Além disso, nos últimos anos, o mercado de azeites tem registado uma crescente procura por produtos exclusivos, criando oportunidades para explorar esta diversidade genética e responder às novas exigências dos consumidores.

2.3.1. Fatores que levam à perda deste património

Existem vários fatores que contribuem de forma direta e indireta para a perda deste património. Dentro dos fatores que mais têm contribuído estão as alterações climáticas que constituem um dos maiores e mais desafiantes problemas enfrentados pela humanidade no século XXI (Ozturk et al., 2015). Em particular, a região mediterrânica, frequentemente considerada como um “ponto crítico” climático, devido à elevada suscetibilidade a fenómenos como a seca (Carrão et al., 2016), prevê-se que sofra alterações significativas, incluindo uma redução substancial nos níveis de precipitação e um aumento nas temperaturas médias, o que intensifica a vulnerabilidade ambiental e socioeconómica da área. Adicionalmente, a crescente frequência de eventos climáticos extremos, como secas, inundações e ondas de calor, já estão a comprometer a produtividade agrícola em diversas regiões do mundo.

Na bacia do Mediterrâneo, a disponibilidade da água constitui um recurso escasso, tanto em termos absolutos como devido à concentração temporal das precipitações e à elevada variabilidade interanual, caracterizada por frequentes períodos de seca. As tendências climáticas atuais estão a agravar a escassez hídrica nesta região. Prevê-se que estas tendências se intensifiquem, resultando em maior procura de água para fins de irrigação (Dono et al., 2016), num contexto em que a agricultura é o principal consumidor de água doce (Nguyen et al., 2016).

A significativa variabilidade climática afeta diretamente os parâmetros fenológicos e a produtividade desta cultura, resultando em desequilíbrios consideráveis nos rendimentos agrícolas observados nos últimos anos (MiPAAF, 2010).

A preferência por cultivares comerciais altamente produtivas e uniformes reduz a diversidade genética ao substituir cultivares tradicionais por cultivares economicamente mais vantajosas. A pressão para aumentar a produtividade frequentemente leva ao abandono dessas cultivares menos produtivas, mas geneticamente úteis. Embora essas cultivares comerciais apresentem maior rendimento, as cultivares locais possuem características únicas, como resistência às alterações climáticas, e são por isso essenciais para a sustentabilidade a longo prazo. O abandono dessas cultivares reduz a resiliência genética do olival, aumentando a vulnerabilidade às mudanças climáticas e aos novos agentes patogênicos.

No entanto, essas árvores imponentes apresentam desafios significativos para a mecanização da apanha da azeitona, especialmente em comparação com as plantações modernas, que são instaladas de modo a facilitar o uso de máquinas agrícolas. Um dos principais entraves está relacionado ao tamanho e à forma dessas árvores. As oliveiras centenárias possuem troncos retorcidos, copas amplas e ramificações irregulares, características que dificultam o acesso e a operação de máquinas convencionais.

Outro fator relevante é a sensibilidade das oliveiras centenárias. Devido à sua idade avançada, elas podem ser mais vulneráveis a danos causados por vibrações ou contato direto com máquinas.

O aparecimento de novas pragas e/ou doenças são fatores que comprometem a produtividade e a longevidade das árvores, bem como a qualidade dos frutos. Espera-se que pragas e doenças causadas por artrópodes como a mosca-da-zeitona (*Bactrocera oleae*), que danifica os frutos, a traça-da-oliveira (*Prays oleae*), que afeta folhas, flores e frutos e certos vetores de *Xylella fastidiosa* aumentem e se espalhem em parte devido a este cenário global. No entanto, a oliveira, é uma das plantas mais antigas cultivada pelo homem, destaca-se pela sua extraordinária capacidade de permanecer produtiva durante centenas de anos (Martínez, 2017).

Um outro fator que leva à perda deste património, é a baixa produtividade. As oliveiras centenárias são árvores altamente valorizadas, não só pela sua longevidade e imponência, mas também pelo simbolismo cultural e histórico que carregam. No entanto, em termos produtivos, elas frequentemente apresentam uma produtividade menor em comparação com oliveiras mais jovens levando assim ao seu abandono e/ou à substituição

por outras cultivares, na maioria estrangeiras e/ou à substituição por outras culturas mais rentáveis.

2.3.2. Porque valorizar as oliveiras centenárias

Valorizar o património olivícola é essencial para preservar a diversidade genética das oliveiras, garantir a produção sustentável e proteger a identidade cultural das regiões produtoras. Cultivares locais oferecem azeites e azeitonas de qualidade única, contribuindo para a economia rural e promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis. No entanto, a baixa produtividade aliada à pressão para instalação de culturas mais rentáveis tem levado à sua substituição com perda irreparável do património olivícola.

As oliveiras centenárias constituem um património vivo de valor inestimável, tanto do ponto de vista cultural como ambiental, desempenhando um papel fundamental na identidade da região de Trás-os-Montes. Estas árvores perenes, que perduram ao longo dos séculos, são testemunhas da evolução histórica local, estabelecendo uma ligação tangível entre as gerações passadas e futuras. Para além do seu simbolismo, estas oliveiras possuem também uma relevância económica significativa, reforçando a sua importância multifacetada para a região. O estudo e a caracterização das oliveiras centenárias são essenciais para compreender a biodiversidade associada a estas árvores. Os olivais antigos são ecossistemas de elevada riqueza biológica, albergando uma ampla diversidade de fauna e flora, desempenhando um papel essencial no equilíbrio ecológico. Adicionalmente, contribuem significativamente para a conservação dos solos e para a manutenção das paisagens rurais, reforçando a sua relevância ambiental e patrimonial.

Cada oliveira centenária conta uma história, representando um símbolo vivo da tradição agrícola de Trás-os-Montes. Esta região, que ao longo de séculos preservou e transmitiu conhecimentos de geração em geração, encontra nestas árvores um testemunho da sua herança cultural. Estudar e documentar estas oliveiras constitui não só um contributo para a valorização do património cultural, mas também uma salvaguarda contra a sua possível perda, proporcionando às comunidades locais uma ligação tangível e duradoura com a sua história e identidade.

A caracterização destes exemplares únicos passa pela determinação genética das oliveiras. Esta é realizada através de marcadores de DNA, também conhecidos como marcadores moleculares, ou através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito por Kalia et al., (2011) e Gomes et al., (2012). Contudo, os estudos dedicados à identificação e caracterização de exemplares de oliveiras centenárias, tanto

na região de Trás-os-Montes como a nível nacional, permanecem bastante escassos, havendo apenas um número reduzido de árvores centenárias caracterizados em termos de morfologia e da composição química dos seus azeites. Neste âmbito, Fernandes (2014) analisou cultivares provenientes de oliveiras centenárias, Peres et al. (2011) estudou as cultivares típicas de Trás-os-Montes, enquanto Reboredo-Rodríguez et al. (2018) analisou cultivares da região nordeste de Espanha. Mais recentemente, o projeto “Olivecoa” possibilitou a análise e caracterização de 150 exemplares de oliveiras centenárias, com o objetivo de valorizar e caracterizar o património olivícola ancestral da região do Vale do Côa.

É essencial aumentar a disponibilidade de genótipos de oliveiras cultivadas que sejam geneticamente caracterizadas e altamente diferenciadas (Mariotti et al., 2023). Estes genótipos desempenham um papel fundamental na superação dos desafios agronómicos emergentes (De Gennaro et al., 2012; Larbi et al., 2015) e na adaptação às crescentes restrições impostas pelas alterações climáticas (Moriondo et al., 2013; Tanasijevic et al., 2014).

A preservação e valorização das oliveiras centenárias, enquanto património genético, cultural e económico, é fundamental para garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção tradicionais e a diferenciação dos produtos regionais no mercado global.



Capítulo 3

Material e Métodos

3. Desenho experimental

3.1. Amostragem

Para a realização deste trabalho, foram identificados e selecionados 31 exemplares de oliveiras centenárias no concelho de Alfândega da Fé, com características diferenciadoras.

A seleção baseou-se em critérios visuais, nomeadamente as dimensões do tronco, dimensões e tamanho da copa e as características do fruto. A localização geográfica das amostras encontra-se representada na Figura 3 e no Anexo A 1.

De cada exemplar, foram colhidos aleatoriamente, 50 frutos e 50 folhas destinados à caracterização morfológica, folhas adicionais para a análise genética e azeitonas para a extração de azeite (aproximadamente 3 kg onde a maturação variou entre o IM 3 e o IM 4 determinadas de acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2011)).

No laboratório, as folhas de cada árvore destinadas à análise morfológica foram armazenadas a 4°C até posterior caracterização, enquanto as restantes folhas foram conservadas a -80°C para a análise genética por microssatélites. Os frutos foram conservados a -20°C até à realização da caracterização morfológica.

Este trabalho insere-se no projeto “OleaPrime”, sendo que as amostras em estudo correspondem a 31 prospeções (genótipo 76 a 106), sendo estas parte de um total de 560 prospeções.

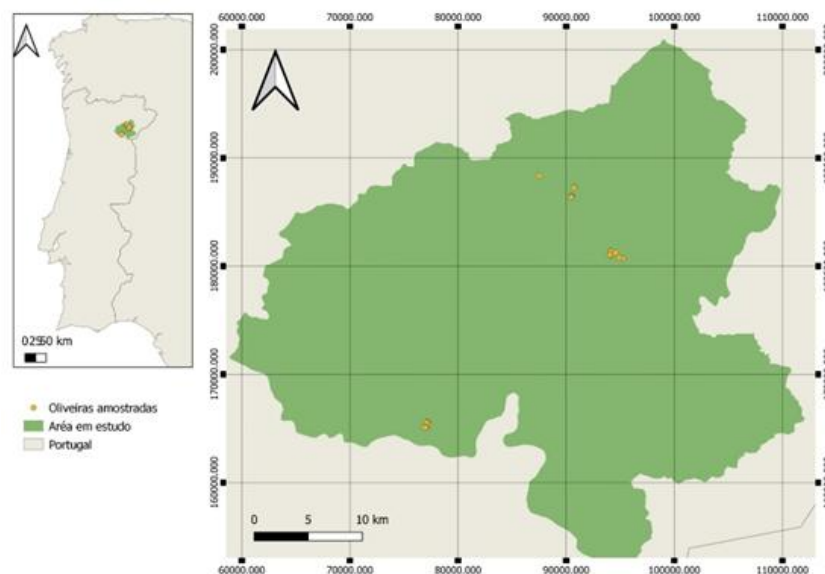


Figura 3 - Localização geográfica dos exemplares selecionados na região de Alfândega da Fé. Mapa projetado em ETRS89/PT-TM06 sistema.

3.2. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica das folhas, frutos e endocarpos de cada árvore foi realizada com base na análise de um conjunto de parâmetros quantitativos e qualitativos. Para cada exemplar, foram avaliadas 50 folhas e 50 frutos, selecionados de forma aleatória, juntamente com os respectivos endocarpos. A definição dos parâmetros e os critérios de medição seguiram as recomendações de UPOV (2011).

3.2.1. Folha

A avaliação das folhas incluiu a medição do peso (g), comprimento e largura (cm), bem como a determinação da forma (elíptica, elíptico-lanceolada ou lanceolada), segundo a relação comprimento/largura. Foram também avaliadas a curvatura longitudinal do limbo (epinástica, plana, hiponástica ou helicoidal) e a posição da largura máxima (central, basal ou apical).

A forma das folhas foi classificada em classes de comprimento: (reduzido < 5 cm, médio 5–7 cm, elevado > 7 cm) e largura (reduzida < 1 cm, média 1–1,5 cm, larga > 1,5 cm).



Figura 4 – Exemplos de folhas de oliveira, representando as principais características morfológicas avaliadas (forma, curvatura e proporções dimensionais).

3.2.2. Fruto

Nos frutos, foram avaliadas características externas, como o comprimento (cm), os diâmetros máximo e mínimo (cm), o peso (g), a forma (relação comprimento/largura), a simetria e a posição do diâmetro transversal máximo. Adicionalmente, observaram-se o ápice, a base, a presença de mamilo, bem como as lenticulas (número, tamanho e distribuição) e a cor da epiderme.

O peso dos frutos foi classificado em quatro categorias: baixo (< 2 g), médio (2–4 g), alto (4–6 g) e muito alto (> 6 g).



Figura 5 – Exemplos de frutos de oliveira, representando as principais características morfológicas avaliadas: dimensões, forma, simetria, presença de mamilo, lenticulas e cor da epiderme.

3.2.3. Endocarpo

Nos endocarpos, foram avaliadas características como o comprimento (cm), os diâmetros máximo e mínimo (cm), o peso (g), e a forma (obtida pela relação comprimento/largura). Foram também observadas a simetria, a posição do diâmetro máximo, a morfologia do ápice e da base, o grau de rugosidade da superfície, o número e distribuição dos sulcos fibrovasculares, e a presença ou ausência de mucrão no ápice.



Figura 6 – Exemplos de endocarpos de oliveira representando as principais características morfológicas avaliadas: dimensões, forma, simetria, rugosidade da superfície e presença de mucrão.

3.3. Extração de azeites

Para a extração dos azeites dos frutos de cada oliveira foi seguido o método descrito por Rodrigues et al., (2020). Após a colheita realizou-se a extração dos respectivos azeites, em Sistema Piloto Abencor (Comercial Abengoa S.A., Sevilha, Espanha) do laboratório AgroBioTecnologia-Azeites da Escola Superior Agrária de Bragança. Este sistema (Figura 7) é constituído por: um moinho (moinho de martelo MM100 da MC2., Sevilha, Espanha; com um crivo de 5,5 mm de diâmetro e um motor monofásico de 1,5 kW), uma termobatedora (Thermo-Mixer TB-100 da MC2., Sevilha, Espanha; com 8

orifícios de trabalho e 8 painéis de mistura com controlo de temperatura e hélices individuais para misturar a pasta) e uma centrífuga (Centrifugal Machine CF-100 da MC2., Sevilha, Espanha; com 1,5 kW motor trifásico, tambor inox com rotação máxima de 3500 rpm e temporizador automático).

As azeitonas foram moídas e utilizaram-se aproximadamente 700 g de pasta para cada unidade da termobatedora onde ficou em constante malaxação durante 30 minutos em banho-maria a 25 °C. Decorrido esse tempo, foi posteriormente centrifugada e decantada para a recolha do azeite.

Para posterior análise filtrou-se cada um dos azeites com papel de filtro (Whatman paper nº 4) e sulfato de sódio anidro para remover as partículas sólidas e alguma água que ainda possam conter. Os azeites foram armazenados em frascos de cor âmbar de 100 mL, protegidos da exposição à luz e mantidos à temperatura ambiente (20–25 °C), até à realização das análises posteriores.



Figura 7 – Processo de extração dos azeites em sistema piloto Abencor.

3.4. Parâmetros de qualidade do azeite

A determinação da qualidade do azeite baseia-se essencialmente na avaliação de diversos parâmetros físico-químicos, que permitem classificar o produto em diferentes categorias comerciais. De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2022/2104 da Comissão, de 29 de julho de 2022, os azeites podem ser classificados como azeite virgem extra, azeite virgem ou azeite lampante. Este último, por não poder ser comercializado, é submetido a um processo de refinação, após o qual deve ser misturado com azeite virgem extra ou virgem, podendo ser comercializado apenas sob a designação de azeite.

Para esta classificação, é necessário determinar um conjunto de parâmetros, nomeadamente:

- Acidez livre (expressa em % de ácido oleico por 100 g de azeite), que reflete a extensão da hidrólise dos triglicerídeos e, consequentemente, o estado de conservação da matéria-prima;
- Índice de peróxidos, indicador do estado de oxidação primária e da formação de peróxidos e hidroperóxidos;
- Coeficiente de extinção específica no ultravioleta (K_{232} e K_{268}), que permitem detetar compostos de oxidação primária e secundária, sendo essenciais para avaliar a pureza e a frescura do azeite.
- Análise sensorial (prova organoléptica) realizada por um painel de provadores treinados, que avalia os atributos negativos e positivos do azeite, bem como a sua intensidade. Com base nessa avaliação, determina-se se o azeite se enquadra na categoria de azeite virgem extra ou virgem, uma vez que a presença de defeitos exclui o produto das categorias superiores mesmo que os parâmetros físico-químicos estejam conformes.

3.4.1. Acidez

Para a análise da acidez, seguiu-se a metodologia descrita no Anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Foram pesadas 5 g de amostra de azeite num balão erlenmeyer de 100 mL e adicionado 50 mL de uma solução de etanol 96 %/éter dietílico (1:1) juntamente com 3 gotas de fenolftaleína (2%). Posteriormente, realizou-se a titulação com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 N, até atingir o ponto de viragem, ou seja, até à mudança de cor da solução, de amarelo-pálido para laranja-tijolo, que permanece durante pelo menos 10 segundos. Todas as amostras foram realizadas em duplicado. Os resultados da acidez são expressos em percentagem de ácido oleico por 100 g de azeite, calculado através da seguinte equação:

$$\text{Acidez (\% de ácido oleico)} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

Onde:

V- Volume de NaOH gasto na titulação (mL);

c- Concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro (=0,1 N) (mol/L);

M- Massa molar do ácido oleico (g/mol);

m- Massa da amostra (g);

3.4.2. Índice de Peróxidos

Para a determinação do índice de peróxidos, utilizou-se como referência a metodologia descrita no Anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Pesaram-se 1,2 g da amostra em balão erlenmeyer de 250 mL, onde se adicionou 10 mL de clorofórmio, 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. De seguida, este foi tapado com parafilm e agitado durante 1 minuto ao fim do qual foi colocado ao abrigo de luz por 5 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 75 mL de água destilada à mistura e 4 gotas de cozimento de amido a 1 g/100 mL (indicador) e efetuou-se a titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 0,01 M até ao ponto de viragem, ou seja, até à mudança de cor da solução de uma coloração escura para uma coloração totalmente transparente. Todas as amostras foram realizadas em duplicado. O resultado do índice de peróxidos foi expresso em mEq. O_2 /kg de azeite, sendo calculado pela equação:

$$\text{Índice de peróxidos (mEq. } \frac{\text{O}_2}{\text{kg}}) = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

Onde:

V - Volume de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) utilizado na titulação levando em consideração o ensaio do branco (mL);

T - Normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio = 0,0152 (mol/L);

m – Massa da amostra (g);

3.4.3. Coeficiente de extinção específico no ultravioleta

Para a análise do coeficiente de extinção específico no ultravioleta foi seguida a metodologia presente no Anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022, com algumas alterações. Pesou-se 0,60 g de amostra para tubos de falcon de 15 mL e completou-se o volume até 10 mL com isoctano (2,2,4-

trimetilpentano). As amostras foram homogeneizadas no vortex e feitas as devidas diluições, ou seja, a diluição 1:20 e 1:5. A diluição 1:20 foi utilizada para medir a absorvância a 232 nm, enquanto a diluição 1:5 permitiu a leitura da absorvância a 264, 268 e 272 nm. Os resultados das respectivas absorvâncias devem estar compreendidos entre 0,1 e 0,8 caso contrário as diluições devem ser ajustadas adequadamente. Cada amostra foi realizada em duplicado. A leitura das absorvâncias foram feitas utilizando um espectrofotômetro UV–VIS (UV 1280 Shimadzu). As equações para calcular os K_{232} , K_{264} , K_{268} , K_{272} e o valor de ΔK foram as seguintes:

$$K_{232} = \frac{A_{232} \times FD}{m \times 10}$$

$$K_{264} = \frac{A_{264} \times FD}{m \times 10}$$

$$K_{268} = \frac{A_{268} \times FD}{m \times 10}$$

$$K_{272} = \frac{A_{272} \times FD}{m \times 10}$$

$$\Delta K = K_{268} - \frac{(K_{264} + K_{272})}{2}$$

Onde:

A_{232} - Absorvância no comprimento de onda 232 nm;

A_{264} - Absorvância no comprimento de onda 264 nm;

A_{268} - Absorvância no comprimento de onda 268 nm;

A_{272} - Absorvância no comprimento de onda 272 nm;

FD - Fator de diluição;

m - Massa da respectiva amostra (g).

3.4.4. Análise sensorial descritiva

A análise sensorial dos azeites foi realizada de acordo com o Anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão, de 29 de julho de 2022, seguindo as normas oficiais estabelecidas para a classificação organoléptica. Para esta avaliação, recorreu-se a um painel de provadores treinados, garantindo a reprodutibilidade e consistência dos resultados.

Nos casos em que as amostras não apresentaram defeitos sensoriais, procedeu-se à análise detalhada do perfil sensorial, de acordo com a metodologia definida pelo Conselho Oleícola Internacional (COI, 2005), com pequenas adaptações na metodologia proposta por Rodrigues et al. (2020).

As provas foram realizadas numa sala adequada, com iluminação natural, temperatura controlada e ausência de odores interferentes, garantindo assim as condições ideais para a perceção sensorial. Foram utilizados copos oficiais de prova, conforme as normas do COI (2018), de cor azul ou vermelha, não sendo visível a cor do azeite, e disponibilizados aos provadores folhas de registo, água, maçã cortada e bolachas de água e sal, de modo a neutralizar o paladar entre as diferentes amostras. Os azeites foram mantidos a uma temperatura 28 °C, favorecendo a libertação de aromas, levando a resultados mais credíveis.

A avaliação foi efetuada com base numa escala de intensidade não estruturada entre 0 a 10, em que 0 corresponde à ausência de sensações e 10 à intensidade máxima percebida desse atributo. A avaliação contempla tanto os atributos olfativos como os gustativos. A primeira fase consiste na avaliação das características do azeite ao nível olfativo onde foram analisadas as sensações de frutado (verde ou maduro), as sensações de frutas e herbáceas, bem como a harmonia. Quanto às sensações gustativas, foi determinada a intensidade dos mesmos parâmetros mencionados nas sensações olfativas, acrescentando a avaliação dos atributos doce, amargo e picante. Nas sensações olfato-gustativas, foram avaliados os parâmetros de complexidade e persistência, em que a complexidade está relacionada à combinação das diferentes sensações positivas percebidas, e a persistência corresponde à duração das sensações que permanecem na boca após a prova da amostra.

3.5. Atividade antioxidante dos azeites

Para determinação da atividade antioxidante foram aplicados dois métodos complementares: a avaliação da atividade sequestradora realizada pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), e o método de Folin–Ciocalteu, para a quantificação do teor total de compostos fenólicos.

3.5.1. Preparação do extrato

Antes da realização destas análises foi necessário a preparação das amostras. Para isso utilizou-se como base a metodologia descrita por Pizarro et al. (2013). Em tubos

ependorf de 2 mL, pesaram-se 0,50 g de amostra e adicionou-se 1 mL de uma solução metanol-água (80:20, v/v). Após agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas a 13 000 rpm (centrifuga VWR Micro Star 21R) durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi recolhido e transferido para um tubo falcon de 15 mL. Este procedimento foi repetido três vezes, totalizando 3 mL de extrato. Em seguida, completou-se o volume com a solução metanol-água (80:20, v/v) até 5 mL. Os extratos obtidos foram protegidos da luz com papel de alumínio e armazenados no frigorífico a 4°C até posteriores análises.

3.5.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1 picrilhidrazilo (DPPH)

Para a avaliação da atividade antioxidante foi seguida a metodologia descrita por Pizarro et al. (2013), com algumas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH com 2,4 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Foram transferidos 500 µL do extrato para tubos de ensaio aos quais se adicionaram 3,5 mL da solução de DPPH (em metanol). Para o branco utilizaram-se 500 µL de metanol-água (80:20 v/v). Foi então homogeneizada em vortex e armazenada no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após o tempo de reação, as leituras das absorvâncias foram realizadas num espectrofotómetro UV-VIS (UV-1280 Shimadzu) a um comprimento de onda de 517 nm. Foi feito autozero no equipamento com metanol-água (80:20 v/v) seguido da leitura do branco e das leituras das amostras em “cuvette” de quartzo de percurso ótico de 1 cm, lavada entre amostras com metanol. A percentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$DPPH(\% \text{ de inibição}) = \frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} \times 100$$

Em que:

A_{DPPH} – valor da absorvância da solução DPPH, ou seja, o branco;

A_A – valor da absorvância da solução contendo o extrato;

3.5.3. Fenóis totais

A quantificação de fenóis totais foi efetuada pelo método de Folin-Ciocalteu (Hatano et al, 1988) com algumas modificações. Em tubos de ensaio, adicionaram-se 100 µL do extrato com 1500 µL de água destilada e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu.

Para o branco foram utilizados 100 µL metanol-água (80:20 v/v). Agitou-se em vortex e deixou-se em repouso durante 3 minutos. De seguida, foram adicionados 300 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20% e as amostras foram agitadas uma vez mais em vortex. Durante 60 minutos permaneceram armazenadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente. Após esse tempo foram efetuadas as leituras da absorvância a um comprimento de onda de 765 nm, num espectrofotómetro UV-VIS (UV-VIS/UV-1280 Shimadzu). Foi feito autozero no equipamento com o branco. Os resultados são apresentados em mg de ácido gálico por kg de azeite (mg ác. Gal./kg azeite), utilizando uma curva de calibração de ácido gálico dissolvido em metanol, a diferentes concentrações (0,002 a 0,125 mg/mL).

3.6. Caracterização genética

A caracterização genética dos 31 genótipos foi realizada com base na utilização de marcadores moleculares do tipo microsatélite (SSR).

As amostras de folhas, previamente armazenadas a -80 °C, foram maceradas com adição contínua de azoto líquido até se obter um pó fino, utilizando almofarizes autoclavados para o efeito.

Posteriormente, o material foi acondicionado em tubos eppendorf de 1,5 mL estéreis e armazenados a -80°C até ao momento da extração de DNA.

3.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando um kit de extração SpeedTools DNA Extraction Kit (Biotools, B&M Labs). O processo de extração foi efetuado de acordo com as instruções fornecidas, com pequenas alterações. Num tubo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 180 µL de tampão BT1, ao qual foi adicionada uma espátula de ditioneitol (DTT), que atua como antioxidante. Em seguida, foi adicionada a amostra (uma espátula) juntamente com 25 µL de Proteinase K. Após agitação em vortex, as amostras foram incubadas num termobloco (Thermo Scientific Thermal Mixer) a 56 °C por 3 horas, com agitação a 600 rpm.

Após o tempo decorrido, foram adicionados 200 µL de tampão BB3 e as amostras foram novamente agitadas em vortex e incubadas a 70 °C durante 10 minutos, com agitação a 600 rpm. Após incubação, foram centrifugadas durante 2 minutos a 13 000 rpm (centrifuga VWR Micro Star 21R) e recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo

ependorf de 1,5 mL, ao qual se adicionaram 210 µL de etanol absoluto (96%) seguido de agitação em vórtex.

A amostra foi então transferida para uma coluna com uma membrana de sílica e colocada num tubo de 2 mL e centrifugada durante 1 minuto a 13 000 rpm. O líquido retido no tubo foi descartado. Posteriormente, adicionaram-se 500 µL de tampão BBW à coluna, seguidos de centrifugação durante 1 minuto a 13 000 rpm e novo descarte do líquido. De seguida, foram adicionados 600 µL de tampão BB5 à coluna, centrifugou-se durante 1 minuto a 13 000 rpm e o líquido foi novamente descartado. Realizou-se ainda uma centrifugação adicional para secagem completa da membrana de sílica da coluna.

Para a eluição do DNA, a coluna foi colocada num novo tubo ependorf de 1,5 mL e adicionaram-se 30 µL de água ultrapura, previamente aquecida a 70 °C, no centro da membrana. Após incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos, procedeu-se à centrifugação durante 1 minuto a 13 000 rpm. Este passo foi repetido para um novo tubo ependorf de 1,5 mL, obtendo-se assim dois tubos de DNA por amostra.

Após extração, a pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria, através da determinação do valor da absorvância da razão dos comprimentos de onda 260/230 nm e 260/280 nm, medidas no Nanodrop, e quantificado com a leitura da absorvância a 260nm (Thermo Scientific NanoDrop One UV/VIS).

3.6.2. Amplificação do DNA

Para este trabalho, foram selecionados 11 marcadores moleculares (microsatélites) previamente identificados como polimórficos para *O. Europaea* L por diversos autores. Os marcadores moleculares utilizados foram: SSR1, SSR2, SSR3, SSR4, SSR5, SSR6, SSR7, SSR8, SSR9, SSR10 e SSR11 (Carriero et al., 2002, Cipriani et al., 2002, De la Rosa et al., 2002, Sefc et al., 2000).

A amplificação termocíclica dos 11 loci selecionados foi realizada por PCR num termociclador T100 Thermal Cycler (BioRad). A mistura de reação, para um volume final de 20 µl, continha 12,7 µl de água ultrapura, 4 µl de tampão (5x colorless GoTaq Reaction Buffer, Promega), 0,2 mM de dNTPs (Promega), 0,2 µM de cada iniciador oligonucleotídico (Frilabo), 0,5 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 2 µl de DNA. Os iniciadores oligonucleotídicos *forward* foram marcados com um dos fluoróforos, HEX ou 6-FAM, na extremidade 5' (Tabela 1).

A amplificação das moléculas de DNA iniciou com um passo inicial de desnaturação a 95 °C (5 minutos), seguido de 35 ciclos de um passo de desnaturação a

95 °C (20 segundos), hibridação a 50°C (30 segundos) e extensão a 72 °C (30 segundos). Após estes 35 ciclos seguiu-se um passo de extensão final a 72 °C durante 8 minutos. Uma vez terminada a amplificação as amostras foram mantidas a -20°C.

3.6.3. Análise de fragmentos

Após a amplificação, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado com TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x. Para tal, 4 µL do produto de PCR foram homogeneizados com 2 µL de tampão de carga (Blue/Orange 6x loading dye, Promega) e transferidos para o poço do gel. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder ready to use (BIORON, life science). A separação dos fragmentos de DNA foi realizada a 90 V durante aproximadamente 30-45 minutos e o gel visualizado com recurso ao sistema Bio-Rad Universal Hood II Gel Doc XR System.

Após a confirmação da qualidade do DNA amplificado e que os tamanhos dos fragmentos amplificados estavam de acordo com o esperado (Tabela 1), procedeu-se à preparação das misturas em placas de microtubos (96 poços). Em cada poço foram colocados entre dois a quatro produtos de PCR (7 µl de cada), correspondentes à mesma amostra, mas amplificados com *primers* distintos. A combinação dos produtos foi efetuada tendo em conta o fluoróforo associado e o tamanho previsto dos fragmentos amplificados. Fragmentos com comprimentos semelhantes puderam ser misturados desde que estivessem marcados com fluoróforos diferentes, de forma a evitar a sobreposição de picos correspondentes aos alelos amplificados durante a análise por eletroforese capilar.

O tamanho dos alelos amplificados presentes em cada mistura foi determinado por eletroforese capilar com deteção multicolor de fluorescência, recorrendo aos serviços da Stabvida (Portugal). Neste processo, os produtos de PCR marcados com fluoróforos migram através de capilares de sílica e são separados de acordo com o seu tamanho e carga. A deteção é realizada por leitura de fluorescência em tempo real, permitindo a identificação simultânea de múltiplos fragmentos.

Para a determinação precisa do tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se um marcador interno de tamanho conhecido (ROX500), também marcado com fluoróforo. Este padrão interno é co-injetado com as amostras e detetado no mesmo ensaio, garantindo a calibração precisa e a correção de eventuais variações de migração entre capilares. A comparação entre os picos de fluorescência obtidos para os produtos de

PCR e os do marcador padrão permitiu calcular com elevada precisão o tamanho de cada alelo separado.

Os resultados foram analisados na forma de eletroferogramas, representando graficamente os picos de fluorescência correspondentes aos diferentes alelos amplificados. Como as oliveiras são diploides, os eletroferogramas apresentam apenas um pico nos casos em que o indivíduo é homocigótico (ambos os alelos com tamanhos idênticos) e dois picos quando o indivíduo é heterocigótico (alelos com tamanhos diferentes).

Tabela 1- Loci utilizados e respectivos fluoróforos.

Locus	Sequência	Tamanho esperado	Fluoróforo
SSR8	F: AGAGGAAGAGTAATGATGAGATC R: TATGCGACTCTGTGTGTGTTCC	~186-205	6-FAM
SSR11	F: CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R: TGCTTTTGTGTTTGAGATGTTG	~227-255	6-FAM
SSR4	F: TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	~122-228	6-FAM
SSR1	F: AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	~168-184	6-FAM
SSR9	F: TGACTCCCTTTAAACTCATCAGG R: TGCGCATGTAGATGTGAATATG	~103-142	6-FAM
SSR7	F: GGATTTATTTAAAAGCAAACATACAAA R: CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	~180-200	6-FAM
SSR10	F: AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	~160-214	HEX
SSR5	F: CATGAAAGGAGGGGGACATA R: GGCACCTTGTGTGCAGATTG	~183-219	HEX
SSR6	F: TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG R: GGCCTGATCATCGATACCTC	~97-166	HEX
SSR2	F: CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA R: CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	~194-227	HEX
SSR3	F: CATCCGGATTTCTTGCTTTT R: AGCGAATGTAGCTTTGCATGT	~181-208	HEX

3.7. Tratamento estatístico e análise de dados

3.7.1. Análise estatística da caracterização morfológica de folhas, frutos, endocarpo e qualidade do azeite

Os dados obtidos na caracterização morfológica das folhas, frutos e endocarpos, bem como na caracterização química e sensorial dos azeites, foram analisados estatisticamente para avaliar a existência de diferenças significativas entre os genótipos selecionados. Para tal, aplicou-se análise de variância a um fator (one-way ANOVA), considerando como diferenças estatísticas os valores de $p < 0,05$, como muito significativas os valores de $p < 0,01$ e como altamente significativos os valores de $p < 0,001$. Sempre que a ANOVA revelou diferenças significativas, procedeu-se a testes *post hot* de comparação múltiplas de médias, utilizando o teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software livre RStudio (versão 3.6.2).

3.7.2. Tratamento e análise dos dados genéticos

Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados em cada genótipo foram analisados 11 microssatélites.

A determinação do tamanho dos alelos identificados para cada um dos 11 microssatélite foi realizada utilizando o Microsatellite Analysis Software (ThermoFisher Scientific).

A análise dos parâmetros de diversidade genética foi efetuada com o programa GenAlEx, versão 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Foram calculados diversos descritores genéticos, incluindo as frequências alélicas, o número médio de alelos por locus (N_a), o número de alelos efetivos (N_e), a heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) (Nei, 1987). Estes parâmetros permitem avaliar a variabilidade genética dentro da população estudada, refletindo o grau de diversidade genético presente.

Para a análise da estrutura genética populacional, recorreu-se a uma abordagem Bayesiana implementada no programa Structure, versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). O modelo utilizado foi o *admixture model* com frequências alélicas correlacionadas, permitindo estimar a proporção de ancestralidade de cada indivíduo em diferentes grupos genéticos. Para cada valor de K considerado (de 1 a 6) foram realizadas 20 corridas independentes, com o objetivo de verificar a consistência entre repetições. Cada corrida foi executada com 750.000 iterações MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) e um período de burn-in de 100.000 iterações, garantindo a estabilidade dos resultados.

A determinação do número ótimo de grupos genéticos (K) foi efetuada com base no teste ΔK de Evanno (Evanno et al., 2005), implementado no StructureSelector (Li e Liu, 2018).

A média das 20 corridas, para cada K, obtidas pelo Structure foi calculada e utilizada para construção da representação gráfica das proporções de ancestralidade atribuídas a cada indivíduo, através do pacote pophelper (Francis, 2017) do RStudio (Versão 3.6.2.) e da plataforma Pophelper Structure Web App V1.0.10..

A distância genética entre os indivíduos analisados (31 genótipos) foi avaliada por meio da construção de dendrogramas obtida a partir do tamanho dos alelos amplificados em cada locus. Foi construída uma matriz binária de presença/ausência, com base nos alelos identificados para os genótipos da população em estudo. Com base nessa matriz, foram calculados os coeficientes de dissimilaridade de Jaccard. A partir da matriz das distâncias genéticas obtidas, foi construído um dendrograma de agrupamento hierárquico, utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Esta análise foi realizada no software RStudio. Para a análise das relações genéticas entre genótipos foram também incluídos os perfis genéticos de cultivares referência previamente desenvolvidas (Verdeal, Madural, Cobrançosa, Negrinha, Arbequina e Picual) com vista à identificação dos 31 genótipos aqui analisados.



Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise morfológica

Os resultados da caracterização morfológica dos parâmetros quantitativos dos frutos, endocarpos e folhas são apresentados em tabelas, sob a forma de média \pm desvio padrão, com os respectivos valores mínimos e máximos entre parêntesis. Para os parâmetros qualitativos, os resultados são expressos em percentagem para cada genótipo avaliado.

4.1.1. Folhas

4.1.1.1. Parâmetros quantitativos

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes aos parâmetros quantitativos das folhas dos genótipos estudados (genótipos 76 a 106). De forma global, as folhas exibiram morfologia predominantemente lanceolada, com comprimento médio de 5,9 cm, largura de 1,1 cm, forma em torno de 6,0 e peso médio de 0,2 g.

A análise de variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas entre os genótipos para todas as variáveis morfológicas avaliadas nas folhas — comprimento, largura, forma (relação comprimento/largura) e peso (valor de $p < 0,001$). Esses resultados indicam uma elevada variabilidade entre genótipos, sugerindo que fatores genéticos influenciam fortemente no desenvolvimento e no tamanho das folhas.

O comprimento das folhas apresentou uma amplitude considerável entre os genótipos, variando entre 3,8 cm (genótipo 80) e 7,7 cm (genótipo 96), com um valor médio de aproximadamente 5,9 cm. As folhas mais longas foram observadas nos genótipos 96 (7,7 cm), 79 (7,1 cm) e 86 (7,0 cm), enquanto as folhas mais curtas verificaram-se nos genótipos 80 (3,8 cm) e 98 (4,5 cm).

A largura foliar variou entre 0,7 cm (genótipo 79) e 1,5 cm (genótipo 94), com um valor médio de 1,1 cm. Em geral, verificou-se que os genótipos com folhas mais longas apresentaram larguras moderadas (1,0 – 1,2 cm), sugerindo um alongamento foliar mais acentuado nestes genótipos.

A relação comprimento/largura (C/L), utilizada como indicador da forma da folha, oscilou entre 4,3 (genótipo 77) e 11,4 (genótipo 79), com uma média próxima de 5,9. Os genótipos 79 e 85 apresentaram folhas mais estreitas e alongadas, enquanto os genótipos 77 e 94 exibiram folhas mais largas e arredondadas, evidenciando uma variabilidade morfológica significativa a nível individual.

Relativamente ao peso médio das folhas, os valores oscilaram entre 0,1 g (genótipo 80) e 0,2 g (genótipo 96), com uma média de 0,2 g. As folhas com maior peso foram registadas nos genótipos 86, 94 e 96 (0,2 g), enquanto as folhas com menor peso corresponderam aos genótipos 80 e 79 (0,1 g).

Os resultados obtidos para a biometria das folhas da variedade Madural (genótipos 86 e 96) encontram-se em concordância com os dados reportados na literatura (Malheiro et al., 2015), nos quais o peso médio foi de 0,3 g, o comprimento médio de 7,3 cm e a largura média de 1,3 cm. Embora pequenas diferenças tenham sido observadas, principalmente no comprimento e na largura, os valores medidos mantêm-se consistentes com os parâmetros esperados para esta cultivar. Para a variedade Verdeal (genótipo 92), os dados obtidos apresentam peso e comprimento ligeiramente inferiores aos reportados por Malheiro et al. (2015) para folhas com peso médio de 0,2 g, comprimento médio de 7,2 cm e largura média de 1,0 cm. A largura, por sua vez, manteve-se próxima aos valores da literatura. Tais variações podem ser atribuídas a diferenças edafoclimáticas, maturação das folhas e posição na árvore, fatores que podem influenciar a biometria foliar da oliveira.

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis.

Genótipo	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Forma (C/L)	Peso (g)
76	6,0 ± 1,4 ^{cdef} (3,5 – 7,9)	0,9 ± 0,2 ^{ghijkl} (0,5 – 1,4)	7,3 ± 2,3 ^c (3,9 – 12,4)	0,2 ± 0,1 ^{defghij} (0,1 – 0,3)
77	5,5 ± 0,5 ^{efghij} (4,4 – 6,6)	1,3 ± 0,2 ^a (1,1 – 2,1)	4,3 ± 0,5 ^k (2,4 – 5,4)	0,2 ± 0,0 ^{bcdefgh} (0,13 – 0,2)
78	5,2 ± 0,6 ^{hijk} (4,0 – 6,4)	1,0 ± 0,1 ^{bcdefghi} (0,9 – 1,3)	5,0 ± 0,8 ^{hijk} (3,8 – 7,1)	0,1 ± 0,0 ^{fghijk} (0,1 – 0,2)
79	7,1 ± 0,8 ^a (5,8 – 9,0)	0,7 ± 0,2 ^{kl} (0,2 – 1,3)	11,4 ± 4,4 ^a (5,5 – 32,5)	0,1 ± 0,0 ^{ghijk} (0,1 – 0,2)
80	3,8 ± 0,7 ^l (0,2 – 4,7)	0,8 ± 0,1 ^{ijkl} (0,6 – 1,0)	4,7 ± 0,9 ^{ijk} (0,3 – 6,8)	0,1 ± 0,0 ^k (0,1 – 0,1)
81	6,0 ± 0,8 ^{cdefg} (4,3 – 7,1)	1,2 ± 0,1 ^{abcde} (0,9 – 1,5)	5,1 ± 0,6 ^{ghijk} (4,2 – 6,7)	0,2 ± 0,0 ^{abcdefg} (0,1 – 0,3)
82	5,2 ± 0,4 ^{ghijk} (4,4 – 5,8)	1,1 ± 0,1 ^{abcdef} (0,9 – 1,3)	4,6 ± 0,8 ^{jk} (4,0 – 5,7)	0,1 ± 0,0 ^{ijk} (0,1 – 0,2)

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis (continuação).

83	6,0 ± 0,7 ^{cd} (4,0 – 7,3)	0,8 ± 0,2 ^{ijkl} (0,5 – 1,5)	7,7 ± 2,0 ^{bc} (4,5 – 13,4)	0,1 ± 0,0 ^{ghijk} (0,1 – 0,3)
84	5,3 ± 0,7 ^{ghijk} (4,0 – 6,6)	1,1 ± 0,2 ^{abcde} (0,8 – 1,5)	5,0 ± 0,7 ^{hijk} (3,9 – 6,3)	0,2 ± 0,0 ^{cdefghij} (0,1 – 0,3)
85	5,5 ± 1,3 ^{efghij} (0,9 – 7,7)	0,7 ± 0,2 ^l (0,4 – 1,1)	8,5 ± 2,5 ^b (1,1 – 12,8)	0,1 ± 0,0 ^{jk} (0,1 – 0,2)
86	7,0 ± 1,1 ^{ab} (3,2 – 9,0)	1,1 ± 0,2 ^{abcde} (0,5 – 1,5)	6,7 ± 1,4 ^{cdef} (4,3 – 9,3)	0,2 ± 0,1 ^a (0,1 – 0,3)
87	6,4 ± 0,8 ^{abcd} (4,4 – 8,0)	1,2 ± 0,2 ^{abcd} (0,9 – 1,7)	5,3 ± 0,7 ^{ghijk} (4,3 – 6,9)	0,2 ± 0,1 ^{ab} (0,1 – 0,4)
88	6,5 ± 0,8 ^{abc} (4,4 – 8,0)	1,2 ± 0,2 ^{abc} (1,0 – 1,6)	5,3 ± 0,7 ^{ghijk} (3,9 – 6,5)	0,2 ± 0,1 ^{abc} (0,1 – 0,3)
89	6,0 ± 0,9 ^{cdefgh} (4,6 – 7,6)	0,8 ± 0,2 ^{hijkl} (0,6 – 1,7)	7,2 ± 1,0 ^{cd} (3,2 – 8,8)	0,1 ± 0,0 ^{hijk} (0,1 – 0,2)
90	4,8 ± 0,7 ^{jk} (3,6 – 6,1)	1,1 ± 0,2 ^{abcde} (0,8 – 1,6)	4,5 ± 0,5 ^k (3,0 – 5,4)	0,1 ± 0,1 ^{efghij} (0,1 – 0,3)
91	5,8 ± 0,7 ^{cdefghi} (4,1 – 7,2)	1,2 ± 0,2 ^{abcd} (0,7 – 1,6)	4,8 ± 0,5 ^{hijk} (3,9 – 5,9)	0,2 ± 0,1 ^{defghij} (0,1 – 0,3)
92	6,1 ± 0,8 ^{cdef} (4,7 – 7,5)	0,9 ± 0,1 ^{ghijk} (0,7 – 1,3)	6,8 ± 0,9 ^{cde} (5,2 – 8,6)	0,1 ± 0,0 ^{efghijk} (0,1 – 0,2)
93	5,5 ± 0,6 ^{cdefghi} (4,4 – 6,5)	1,2 ± 1,1 ^{ab} (0,8 – 8,0)	5,3 ± 1,0 ^{ghijk} (0,6 – 7,1)	0,2 ± 0,0 ^{abcde} (0,1 – 0,2)
94	6,6 ± 0,9 ^{cdef} (4,9 – 8,0)	1,5 ± 0,3 ^{ab} (1,0 – 2,0)	4,5 ± 0,5 ^{hijk} (2,6 – 5,6)	0,2 ± 0,1 ^{abcde} (0,1 – 0,4)
95	4,9 ± 0,6 ^{bcd} (3,6 – 6,1)	0,9 ± 0,1 ^{cdefghij} (0,5 – 1,2)	5,7 ± 0,7 ^{defg} (3,9 – 7,2)	0,1 ± 0,0 ^{abcde} (0,1 – 0,2)
96	7,7 ± 0,8 ^{cde} (6,1 – 9,7)	1,2 ± 0,2 ^{abcde} (0,9 – 1,6)	6,7 ± 0,7 ^{efghi} (4,3 – 7,8)	0,2 ± 0,1 ^{bcdefghi} (0,1 – 0,3)
97	4,7 ± 0,4 ^k (3,9 – 5,3)	1,0 ± 0,2 ^{bcdefghi} (0,7 – 1,4)	4,7 ± 0,7 ^k (3,0 – 6,0)	0,1 ± 0,0 ^{hijk} (0,1 – 0,2)
98	4,5 ± 0,7 ^{ghijk} (2,8 – 5,5)	1,0 ± 0,2 ^{defghij} (0,6 – 1,9)	4,7 ± 0,8 ^{ghijk} (2,3 – 6,3)	0,1 ± 0,0 ^{defghij} (0,1 – 0,2)
99	6,3 ± 0,7 ^{abc} (4,9 – 7,5)	1,1 ± 0,1 ^{abcde} (0,9 – 1,5)	5,8 ± 1,0 ^{efgh} (3,9 – 8,0)	0,2 ± 0,0 ^{abcd} (0,1 – 0,3)
100	6,5 ± 0,8 ^{cdefgh} (4,9 – 7,8)	1,1 ± 0,1 ^{bcdefghi} (0,9 – 1,5)	5,9 ± 0,6 ^{efghij} (4,5 – 7,0)	0,2 ± 0,0 ^{defghij} (0,1 – 0,3)

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nas folhas de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis (continuação).

101	5,7 ± 1,0 ^{ghijk} (4,1 – 7,6)	1,0 ± 0,1 ^{efghij} (0,8 – 1,4)	5,6 ± 1,0 ^{ghijk} (3,6 – 7,2)	0,2 ± 0,0 ^{hijk} (0,1 – 0,2)
102	4,4 ± 0,5 ^{ijk} (3,3 – 5,3)	0,9 ± 0,1 ^{cdefghij} (0,7 – 1,2)	4,8 ± 0,5 ^{hijk} (3,9 – 6,3)	0,1 ± 0,1 ^{cdefghij} (0,1 – 0,3)
103	5,8 ± 0,6 ^{bcde} (4,6 – 7,0)	1,1 ± 0,1 ^{abcd} (1,0 – 1,5)	5,1 ± 0,7 ^{ghijk} (3,5 – 6,9)	0,2 ± 0,0 ^{abcde} (0,1 – 0,3)
104	6,4 ± 0,6 ^{cdefgh} (5,2 – 7,6)	1,3 ± 0,1 ^{abcde} (0,9 – 1,6)	5,1 ± 0,4 ^{ghijk} (4,5 – 6,2)	0,2 ± 0,0 ^{cdefghij} (0,1 – 0,3)
105	5,3 ± 0,6 ^{defghi} (4,2 – 6,8)	1,1 ± 0,2 ^{abcde} (0,8 – 1,6)	4,9 ± 0,8 ^{hijk} (3,4 – 6,8)	0,1 ± 0,0 ^{cdefghij} (0,1 – 0,2)
106	6,2 ± 1,0 ^{abcde} (4,5 – 8,6)	1,2 ± 0,2 ^{abcde} (0,9 – 1,6)	5,2 ± 1,1 ^{fghijk} (3,4 – 7,4)	0,2 ± 0,0 ^{abcdf} (0,1 – 0,3)
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

4.1.1.2. Parâmetros qualitativos

Quanto aos parâmetros qualitativos, avaliou-se a curvatura longitudinal do limbo e a posição da largura máxima das folhas. A curvatura longitudinal do limbo, evidenciou predominância de folhas planas (55,9%), seguindo-se as folhas hiponásticas (41,6%), enquanto as folhas epinásticas (0,8%) e helicoidais (1,7%) foram pouco frequentes (Tabela 3). Estes resultados indicam uma predominância de folhas com limbo plano a ligeiramente curvado.

Relativamente à posição da largura máxima, verificou-se uma clara predominância da posição central (90,3%), sendo a posição apical observada em apenas 9,7% das folhas, não se registrando qualquer ocorrência de posição basal.

Tabela 3- Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência.

Genótipo	Curvatura Longitudinal Limbo				Posição Largura Máxima		
	Epinástica (%)	Plana (%)	Hiponástica (%)	Helicoidal (%)	Central (%)	Basal (%)	Apical (%)
76	0,0	55,0	45,0	0,0	92,5	0,0	7,5
77	0,0	90,0	10,0	0,0	92,5	0,0	7,5
78	0,0	65,0	15,0	20,0	100,0	0,0	0,0

Tabela 3- Características morfológicas da folha, em percentagem (%) de ocorrência (continuação).

79	0,0	77,5	22,5	0,0	100,0	0,0	0,0
80	0,0	42,5	57,5	0,0	90,0	0,0	10,0
81	0,0	22,5	77,5	0,0	62,5	0,0	37,5
82	2,5	52,5	45,0	0,0	85,0	0,0	15,0
83	0,0	55,0	45,0	0,0	90,0	0,0	10,0
84	0,0	55,0	45,0	0,0	100,0	0,0	0,0
85	2,5	62,5	35,0	0,0	100,0	0,0	0,0
86	7,5	42,5	47,5	2,5	95,0	0,0	5,0
87	7,5	60,0	32,5	0,0	87,5	0,0	12,5
88	0,0	42,5	55,0	2,5	95,0	0,0	5,0
89	0,0	82,5	17,5	0,0	97,5	0,0	2,5
90	5,0	55,0	40,0	0,0	87,5	0,0	12,5
91	0,0	85,0	15,0	0,0	50,0	0,0	50,0
92	0,0	72,5	27,5	0,0	95,0	0,0	5,0
93	0,0	80,0	20,0	0,0	95,0	0,0	5,0
94	0,0	70,0	30,0	0,0	57,5	0,0	42,5
95	0,0	80,0	20,0	0,0	100,0	0,0	0,0
96	0,0	15,0	85,0	0,0	85,0	0,0	15,0
97	0,0	45,0	52,5	2,5	85,0	0,0	15,0
98	0,0	42,5	57,5	0,0	100,0	0,0	0,0
99	0,0	52,5	47,5	0,0	90,0	0,0	10,0
100	0,0	70,0	22,5	7,5	100,0	0,0	0,0
101	0,0	32,5	67,5	0,0	100,0	0,0	0,0
102	0,0	15,0	85,0	0,0	97,5	0,0	2,5
103	0,0	17,5	75,0	7,5	92,5	0,0	7,5
104	0,0	70,0	25,0	5,0	100,0	0,0	0,0
105	0,0	80,0	20,0	0,0	87,5	0,0	12,5
106	0,0	45,0	50,0	5,0	90,0	0,0	10,0

4.1.2. Fruto e endocarpo

4.1.2.1. Parâmetros quantitativos

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros quantitativos dos frutos e endocarpos referentes aos trinta e um genótipos analisados (genótipo 76 a 106).

A análise de variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas entre os genótipos para todas as variáveis morfológicas do fruto — peso, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e comprimento (valor de $p < 0,001$). Estes resultados evidenciam uma

elevada variabilidade entre genótipos, demonstrando diferenças genéticas expressivas no desenvolvimento e no tamanho dos frutos.

O teste de comparações múltiplas de Tukey permitiu agrupar os genótipos em classes homogêneas distintas. Os genótipos 101 e 81 apresentaram as maiores médias de peso e dimensões do fruto, não diferindo significativamente entre si, mas diferindo dos restantes, em particular dos genótipos 77, 92, 93 e 94, que obtiveram os valores mais baixos. Genótipos como 83, 85, 97 e 100, apresentaram valores intermédios, sem diferenças estatisticamente semelhantes entre si.

Para o endocarpo, a análise de variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas entre os genótipos (valor de $p < 0,001$). Os genótipos 81, 88 e 101 apresentaram as maiores médias de peso e dimensões, indicando endocarpos mais desenvolvidos e de maior volume, enquanto os genótipos 89, 94, 96 e 105 registaram as menores médias, evidenciando diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos superiores. Esta tendência sugere uma correlação positiva entre o tamanho do fruto e o do endocarpo, uma vez que os mesmos genótipos se destacam em ambas as variáveis.

Entre os parâmetros avaliados do fruto, o peso apresentou a maior amplitude de variação, sendo o parâmetro mais variável dentro da amostra. O peso médio dos frutos variou entre 1,3 g (genótipo 77) e 4,2 g (genótipo 81), observando-se ainda valores elevados nos genótipos 76, 87, 88 e 101, cujos frutos ultrapassaram, em média, os 3,5 g (Tabela 4).

O comprimento médio dos frutos apresentou menor variação, oscilando entre 1,6 cm (genótipo 77) e 2,5 cm (genótipo 101). Estes resultados indicam uma maior uniformidade neste parâmetro morfológico, sugerindo que o comprimento do fruto é uma característica relativamente estável entre os genótipos avaliados.

Os diâmetros máximo e mínimo evidenciaram igualmente baixa variabilidade, com o diâmetro máximo a variar de 1,0 cm (genótipo 77) a 1,7 cm (genótipo 101), e o diâmetro mínimo entre 0,6 cm (genótipo 77) e 1,1 cm (genótipo 101) (Tabela 4).

Relativamente aos parâmetros quantitativos do endocarpo, observou-se uma variabilidade morfológica considerável entre genótipos, demonstrada nos valores médios e respetivos intervalos obtidos.

O peso médio do endocarpo variou entre 0,4 g (genótipo 89) e 0,9 g (genótipo 101), apresentando um valor médio de aproximadamente 0,5 g. Destacaram-se os genótipos 81, 88, 99, 100, 101 e 103 por apresentarem endocarpos com valores de massa mais elevados (0,6 g), enquanto os genótipos 77, 80, 84, 89, 98, 104 e 105 exibiram

valores inferiores a 0,5 g. O elevado desvio-padrão observado em alguns destes genótipos (81, 88 e 101) sugere uma maior heterogeneidade entre os frutos, possivelmente relacionada com diferenças no grau de maturação do fruto ou fatores ambientais. Nos genótipos de referência (Madural), os valores médios de peso do fruto e do endocarpo foram inferiores aos reportados por Chéu-Guedes et al., (2023), indicando diferenças na origem genética, condições edafoclimáticas ou práticas de cultivo.

O comprimento médio do endocarpo oscilou entre 1,3 cm (genótipos 91) e 1,9 cm (genótipos 101), apresentando um valor médio global de aproximadamente 1,5 cm. Os genótipos 81, 88, 100, 101 e 103 destacaram-se por apresentarem valores de endocarpos com comprimentos médios mais elevados (1,6 cm), enquanto os genótipos 77, 84, 91 e 95 apresentaram os valores mais reduzidos (1,5 cm). Tal como observado para o peso, o comprimento apresentou alguma variação entre genótipos, embora com coeficientes de variação geralmente inferiores a 10 %, indicando maior uniformidade dentro de cada genótipo.

Relativamente ao diâmetro máximo e mínimo dos endocarpos, os valores médios variaram entre 0,7 – 0,9 cm (genótipo 98 e 101) e 0,3 – 0,6 cm (genótipo 96 e 101). Os genótipos 81, 87, 88, 91, 99, 100, 101 e 103 apresentaram endocarpos mais largos ($\geq 0,8$ cm), e mais espessos ($\geq 0,5$ cm), enquanto os genótipos 80, 84, 86, 90, 92, 96, 98 e 104 apresentaram os valores mais reduzidos ($< 0,4$ cm). Os resultados evidenciam que os genótipos analisados apresentam variabilidade significativa em todos os parâmetros quantitativos, sendo o peso do fruto e do endocarpo os atributos mais heterogêneos, enquanto o comprimento do fruto e os diâmetros do fruto exibem maior uniformidade entre amostras.

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos e endocarpos de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis.

Genótipo	Fruto				Endocarpo			
	Peso (g)	Diâmetro Máximo (cm)	Diâmetro Mínimo (cm)	Comprimento (cm)	Peso (g)	Diâmetro Máximo (cm)	Diâmetro Mínimo (cm)	Comprimento (cm)
76	3,8 ± 0,5 ^{ab} (2,6 - 4,7)	1,7 ± 0,1 ^a (1,5 - 1,9)	0,8 ± 0,1 ^{ghij} (0,7 - 1,0)	2,3 ± 0,2 ^b (2,0 - 2,6)	0,5 ± 0,1 ^{ghijk} (0,6 - 0,3)	0,7 ± 0,0 ^{hi} (0,8 - 0,7)	0,4 ± 0,0 ^{lm} (0,5 - 0,3)	1,5 ± 0,1 ^{efghijk} (1,9 - 1,3)
77	1,3 ± 0,2 ^o (1,0 - 1,8)	1,0 ± 0,0 ^l (0,9 - 1,2)	0,6 ± 0,1 ^r (0,5 - 0,8)	1,6 ± 0,0 ^m (1,4 - 1,8)	0,4 ± 0,0 ^{kl} (0,3 - 0,6)	0,7 ± 0,0 ^{hijk} (0,6 - 0,8)	0,4 ± 0,1 ^{ij} (0,3 - 0,6)	1,3 ± 0,1 ^m (1,1 - 1,5)
78	2,0 ± 0,9 ^{klmn} (1,0 - 4,4)	1,3 ± 0,2 ^{hij} (0,9 - 1,7)	0,7 ± 0,1 ^{ijklmno} (0,5 - 1,0)	1,8 ± 0,3 ^{ijkl} (1,4 - 2,4)	0,6 ± 0,1 ^c (0,4 - 0,9)	0,8 ± 0,1 ^{cde} (0,7 - 1,0)	0,5 ± 0,0 ^{cdef} (0,4 - 0,6)	1,6 ± 0,1 ^{defg} (1,4 - 1,8)
79	3,1 ± 0,5 ^{cd} (2,0 - 4,3)	1,5 ± 0,1 ^c (1,2 - 1,7)	0,7 ± 0,1 ^{pqr} (0,6 - 0,8)	2,1 ± 0,1 ^{cd} (1,9 - 2,4)	0,6 ± 0,1 ^{cd} (0,3 - 0,8)	0,8 ± 0,1 ^{def} (0,7 - 0,9)	0,4 ± 0,0 ^{ij} (0,4 - 0,5)	1,6 ± 0,1 ^{bcd} (1,3 - 1,8)
80	2,5 ± 0,5 ^{efghi} (1,2 - 4,1)	1,4 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,7)	0,9 ± 0,1 ^{cde} (0,8 - 1,2)	2,0 ± 0,2 ^{defg} (1,5 - 2,4)	0,4 ± 0,1 ^{kl} (0,2 - 0,6)	0,7 ± 0,0 ^{hijk} (0,6 - 0,8)	0,4 ± 0,0 ^{ij} (0,3 - 0,5)	1,4 ± 0,1 ^{kl} (1,0 - 1,8)
81	4,2 ± 0,7 ^a (2,6 - 6,4)	1,6 ± 0,1 ^b (1,4 - 1,9)	0,7 ± 0,1 ^{mno pq} (0,6 - 0,9)	2,3 ± 0,2 ^b (1,9 - 2,8)	0,7 ± 0,1 ^b (0,6 - 1,2)	0,9 ± 0,1 ^{bcd} (0,7 - 1,1)	0,5 ± 0,1 ^{abc} (0,4 - 0,7)	1,7 ± 0,1 ^{bc} (1,4 - 2,1)
82	2,1 ± 0,3 ^{ijklmn} (1,7 - 2,9)	1,3 ± 0,1 ^{fghi} (1,2 - 1,5)	0,8 ± 0,1 ^{hijkl} (0,6 - 0,9)	1,9 ± 0,1 ^{ghijk} (1,8 - 2,1)	0,4 ± 0,1 ^{ghijkl} (0,3 - 0,7)	0,7 ± 0,1 ^{hijk} (0,7 - 0,8)	0,5 ± 0,0 ^{efg} (0,4 - 0,6)	1,5 ± 0,1 ^{ijkl} (1,2 - 1,7)
83	2,9 ± 0,6 ^{de} (1,8 - 4,1)	1,5 ± 0,1 ^c (1,3 - 1,7)	0,9 ± 0,1 ^{def} (0,8 - 1,1)	2,1 ± 0,2 ^{cde} (1,7 - 2,5)	0,6 ± 0,1 ^{cd} (0,4 - 0,9)	0,8 ± 0,1 ^{de} (0,7 - 0,9)	0,5 ± 0,1 ^{fgh} (0,4 - 0,6)	1,6 ± 0,1 ^{defghi} (1,2 - 1,9)
84	2,1 ± 0,3 ^{ijklmn} (1,5 - 2,6)	1,3 ± 0,1 ^{fgh} (1,2 - 1,5)	0,8 ± 0,1 ^{ghi} (0,7 - 0,9)	2,0 ± 0,1 ^{fghij} (1,7 - 2,2)	0,4 ± 0,1 ^{kl} (0,2 - 0,6)	0,7 ± 0,1 ^{hijk} (0,6 - 0,8)	0,4 ± 0,0 ^{kl} (0,3 - 0,5)	1,5 ± 0,1 ^{ghijk} (1,2 - 1,6)
85	2,7 ± 0,4 ^{efg} (1,8 - 4,2)	1,4 ± 0,1 ^{cde} (1,3 - 1,7)	0,8 ± 0,1 ^{fgh} (0,7 - 1,1)	2,0 ± 0,1 ^{defg} (1,7 - 2,3)	0,6 ± 0,1 ^c (0,1 - 0,8)	0,8 ± 0,1 ^{def} (0,7 - 1,0)	0,6 ± 0,1 ^{ab} (0,4 - 0,7)	1,5 ± 0,1 ^{defghijk} (1,2 - 1,8)
86	2,2 ± 0,3 ^{hijklm} (1,6 - 3,4)	1,3 ± 0,1 ^{fgh} (1,2 - 1,6)	0,8 ± 0,1 ^{ghijk} (0,6 - 0,9)	2,0 ± 0,1 ^{cdefg} (1,7 - 2,3)	0,5 ± 0,1 ^{fghij} (0,3 - 0,7)	0,7 ± 0,1 ^{hijk} (0,6 - 0,9)	0,4 ± 0,0 ^{klm} (0,3 - 0,5)	1,6 ± 0,1 ^{defgh} (1,2 - 1,9)

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos e endocarpos de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis (continuação).

87	3,5 ± 0,8 ^{bc} (1,8 - 5,2)	1,6 ± 0,1 ^{ab} (1,3 - 1,9)	1,0 ± 0,1 ^{cb} (0,8 - 1,3)	2,2 ± 0,2 ^c (1,7 - 2,5)	0,6 ± 0,1 ^{cde} (0,3 - 0,8)	0,9 ± 0,1 ^{bc} (0,7 - 0,9)	0,5 ± 0,0 ^{abc} (0,5 - 0,6)	1,5 ± 0,1 ^{fg hijk} (1,2 - 1,8)
88	3,7 ± 0,6 ^{ab} (2,7 - 5,1)	1,6 ± 0,1 ^{ab} (1,5 - 1,8)	1,1 ± 0,1 ^a (1,0 - 1,2)	2,3 ± 0,2 ^b (2,0 - 2,7)	0,8 ± 0,2 ^b (0,5 - 1,2)	0,9 ± 0,1 ^{ab} (0,7 - 1,1)	0,5 ± 0,1 ^{abc} (0,4 - 0,6)	1,7 ± 0,2 ^b (1,4 - 2,0)
89	2,1 ± 0,3 ^{hijklm} (1,6 - 2,9)	1,4 ± 0,1 ^{efg} (1,3 - 1,5)	0,8 ± 0,2 ^{ijklm} (0,6 - 2,0)	1,8 ± 0,2 ^{ijkl} (0,8 - 2,1)	0,4 ± 0,1 ^l (0,3 - 0,5)	0,7 ± 0,1 ^{hijk} (0,6 - 1,5)	0,4 ± 0,3 ^{lm} (0,3 - 2,3)	1,4 ± 0,1 ^{kl} (1,2 - 1,7)
90	2,4 ± 0,4 ^{fg hijk} (1,7 - 3,7)	1,4 ± 0,1 ^{cde} (1,3 - 1,7)	0,9 ± 0,1 ^{def} (0,8 - 1,0)	2,0 ± 0,2 ^{fg hi} (1,7 - 2,3)	0,4 ± 0,1 ^{hijkl} (0,3 - 0,6)	0,7 ± 0,1 ^{hij} (0,6 - 0,8)	0,4 ± 0,0 ^{klm} (0,3 - 0,5)	1,6 ± 0,2 ^{def ghij} (1,2 - 1,8)
91	2,4 ± 0,4 ^{ghijkl} (1,5 - 3,1)	1,5 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,6)	0,9 ± 0,1 ^{def} (0,7 - 1,0)	1,9 ± 0,1 ^{hijkl} (1,6 - 2,1)	0,5 ± 0,1 ^{defg} (0,3 - 0,7)	0,8 ± 0,1 ^{bcde} (0,7 - 2,0)	0,5 ± 0,1 ^{ghi} (0,3 - 0,6)	1,4 ± 0,1 ^{lm} (1,1 - 1,6)
92	1,7 ± 0,3 ^{no} (1,1 - 2,3)	1,2 ± 0,1 ^{jk} (1,0 - 1,4)	0,7 ± 0,1 ^{klmnop} (0,6 - 0,9)	1,8 ± 0,1 ^{ijkl} (1,6 - 2,2)	0,4 ± 0,1 ^{ijkl} (0,3 - 0,6)	0,7 ± 0,0 ^{hijk} (0,7 - 0,8)	0,5 ± 0,0 ^{ghi} (0,4 - 0,5)	1,5 ± 0,1 ^{fg hijk} (1,20 - 1,86)
93	1,9 ± 0,3 ^{mn} (1,2 - 2,8)	1,2 ± 0,1 ^{ij} (1,0 - 1,4)	0,8 ± 0,2 ^{hijkl} (0,6 - 1,7)	1,8 ± 0,2 ^{kl} (0,8 - 2,1)	0,5 ± 0,1 ^{ghijk} (0,3 - 0,7)	0,7 ± 0,1 ^{hij} (0,4 - 0,8)	0,4 ± 0,1 ^{hij} (0,3 - 0,7)	1,5 ± 0,1 ^{ijk} (1,1 - 1,7)
94	1,8 ± 0,3 ⁿ (1,1 - 2,4)	1,2 ± 0,1 ^k (0,6 - 1,4)	0,7 ± 0,1 ^{opqr} (0,5 - 0,8)	1,8 ± 0,1 ^l (1,5 - 2,0)	0,5 ± 0,1 ^{ghi} (0,3 - 0,8)	0,8 ± 0,1 ^{efg} (0,7 - 0,9)	0,5 ± 0,1 ^{cdef} (0,4 - 0,6)	1,5 ± 0,1 ^{kl} (1,2 - 1,7)
95	2,6 ± 0,6 ^{efg} (1,2 - 4,4)	1,5 ± 0,1 ^{cd} (1,1 - 1,8)	0,9 ± 0,1 ^{def} (0,6 - 1,1)	2,0 ± 0,2 ^{defgh} (1,4 - 2,3)	0,4 ± 0,1 ^{hijkl} (0,1 - 0,8)	0,7 ± 0,1 ^{gh} (0,5 - 0,9)	0,4 ± 0,0 ^{jk} (0,3 - 0,5)	1,4 ± 0,2 ^{kl} (0,9 - 1,7)
96	1,9 ± 0,5 ^{mn} (1,0 - 3,1)	1,2 ± 0,1 ^{hij} (0,9 - 1,5)	0,7 ± 0,1 ^{lmnop} (0,5 - 0,9)	2,0 ± 0,1 ^{defgh} (1,6 - 2,4)	0,4 ± 0,1 ^{ijkl} (0,2 - 0,7)	0,7 ± 0,2 ^{hijk} (0,5 - 1,6)	0,3 ± 0,0 ^m (0,3 - 0,5)	1,6 ± 0,2 ^{cde} (1,3 - 2,0)
97	2,6 ± 0,6 ^{efgh} (1,3 - 3,9)	1,4 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,7)	1,0 ± 0,1 ^{bc} (0,8 - 1,1)	2,1 ± 0,2 ^{cdef} (1,6 - 2,5)	0,4 ± 0,1 ^{ghijkl} (0,2 - 0,7)	0,7 ± 0,0 ^{hijk} (0,6 - 0,8)	0,5 ± 0,0 ^{cdef} (0,4 - 0,6)	1,5 ± 0,2 ^{ghijk} (1,0 - 1,9)
98	2,5 ± 0,5 ^{efghi} (1,5 - 3,7)	1,5 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,6)	1,0 ± 0,1 ^{bc} (0,9 - 1,1)	2,0 ± 0,2 ^{cdefg} (1,7 - 2,4)	0,4 ± 0,1 ^{kl} (0,2 - 0,6)	0,7 ± 0,1 ^k (0,5 - 0,7)	0,5 ± 0,0 ^{ghi} (0,4 - 0,5)	1,4 ± 0,2 ^{ijkl} (1,2 - 1,8)
99	2,5 ± 0,6 ^{efgh} (1,6 - 3,8)	1,4 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,7)	1,0 ± 0,1 ^{bcd} (0,8 - 1,2)	2,0 ± 0,2 ^{cdefg} (1,8 - 2,4)	0,6 ± 0,1 ^{cdef} (0,4 - 0,9)	0,8 ± 0,1 ^{cde} (0,7 - 1,0)	0,6 ± 0,0 ^{ab} (0,5 - 0,7)	1,5 ± 0,1 ^{defghij} (1,3 - 1,8)
100	2,8 ± 0,5 ^{def} (2,2 - 4,1)	1,5 ± 0,1 ^{cd} (1,3 - 1,6)	1,0 ± 0,1 ^{bcd} (0,8 - 1,1)	2,1 ± 0,1 ^{cde} (1,9 - 2,4)	0,6 ± 0,1 ^c (0,5 - 0,9)	0,8 ± 0,0 ^{cde} (0,7 - 0,9)	0,5 ± 0,0 ^{cdef} (0,5 - 0,6)	1,6 ± 0,1 ^{bcd} (1,4 - 1,9)

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão dos parâmetros quantitativos avaliados nos frutos e endocarpos de cada genótipo. Os valores mínimos e máximos observados encontram-se indicados entre parêntesis (continuação).

101	4,1 ± 0,7 ^a (2,9 - 6,0)	1,7 ± 0,1 ^{ab} (1,5 - 1,8)	1,1 ± 0,1 ^a (0,9 - 1,2)	2,5 ± 0,1 ^a (2,2 - 2,9)	0,9 ± 0,15 ^a (0,7 - 1,4)	0,9 ± 0,0 ^a (0,9 - 1,0)	0,6 ± 0,0 ^a (0,5 - 0,7)	1,9 ± 0,1 ^a (1,6 - 2,2)
102	2,0 ± 0,4 ^{lmn} (1,0 - 2,9)	1,3 ± 0,1 ^{ghi} (1,1 - 1,4)	0,7 ± 0,1 ^{nopqr} (0,6 - 0,8)	1,8 ± 0,1 ^{ijkl} (1,6 - 2,2)	0,5 ± 0,1 ^{efghi} (0,3 - 1,0)	0,7 ± 0,1 ^{fgh} (0,6 - 0,9)	0,5 ± 0,1 ^{abc} (0,5 - 0,6)	1,5 ± 0,1 ^{hijk} (1,2 - 1,8)
103	2,6 ± 0,5 ^{efg} (1,8 - 4,0)	1,4 ± 0,1 ^{cd} (1,2 - 1,7)	0,9 ± 0,1 ^{efg} (0,7 - 1,1)	2,1 ± 0,1 ^{cdef} (1,8 - 2,4)	0,5 ± 0,1 ^{cdef} (0,3 - 0,9)	0,8 ± 0,1 ^{cde} (0,7 - 1,0)	0,5 ± 0,1 ^{abcd} (0,4 - 0,6)	1,6 ± 0,1 ^{def} (1,3 - 1,9)
104	2,5 ± 0,4 ^{efgh} (1,7 - 3,4)	1,3 ± 0,1 ^{fgh} (1,1 - 1,5)	0,7 ± 0,1 ^{lmnop} (0,6 - 1,0)	2,0 ± 0,1 ^{fghij} (1,7 - 2,2)	0,4 ± 0,1 ^{ijkl} (0,3 - 0,5)	0,7 ± 0,0 ^{ijk} (0,6 - 0,8)	0,4 ± 0,0 ^{klm} (0,3 - 0,5)	1,5 ± 0,1 ^{ijk} (1,2 - 1,7)
105	2,5 ± 0,6 ^{fghij} (1,1 - 3,5)	1,4 ± 0,1 ^{def} (1,1 - 1,6)	0,6 ± 0,1 ^{qr} (0,4 - 0,8)	2,0 ± 0,2 ^{efgh} (1,4 - 2,4)	0,4 ± 0,1 ^{kl} (0,2 - 0,5)	0,7 ± 0,0 ^{jk} (0,6 - 0,8)	0,5 ± 0,0 ^{defg} (0,4 - 0,6)	1,5 ± 0,2 ^{defghijk} (0,7 - 1,8)
106	2,1 ± 0,4 ^{ijklmn} (1,1 - 3,1)	1,3 ± 0,1 ^{fgh} (1,1 - 1,6)	0,8 ± 0,1 ^{fgh} (0,69 - 1,0)	1,9 ± 0,2 ^{ghijk} (1,4 - 2,2)	0,6 ± 0,1 ^{cde} (0,2 - 0,8)	0,8 ± 0,1 ^{cde} (0,6 - 1,0)	0,5 ± 0,1 ^{bcde} (0,4 - 0,6)	1,5 ± 0,1 ^{defghijk} (1,0 - 1,7)
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

4.1.2.2. Parâmetros qualitativos

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros morfológicos qualitativos do fruto, nomeadamente a simetria, posição do diâmetro transversal máximo, forma do ápice e da base, bem como presença ou evidência do mamilo, para os genótipos analisados (genótipos 76 a 106).

A simetria do fruto apresentou variabilidade entre os genótipos. Em média, 16,1% dos frutos eram simétricos, 57,0% ligeiramente assimétricos e 26,4% assimétricos, evidenciando uma predominância de frutos com ligeira assimetria. Os genótipos 80, 85, 87, 91, 95 e 99 apresentaram uma maior percentagem de frutos simétricos ($\geq 30,0\%$), enquanto os genótipos 79, 93 e 105 evidenciaram percentagens elevadas de frutos assimétricos ($\geq 57,5\%$).

Relativamente à posição do diâmetro transversal máximo, observou-se uma notável uniformidade entre as amostras, sendo este maioritariamente central em 94,3% dos frutos. Apenas 1,7% dos frutos apresentaram o diâmetro transversal máximo junto à base e 4,0% junto ao ápice, confirmando que esta característica se manteve bastante constante entre os genótipos.

Quanto à forma do ápice, a maioria dos frutos (65,4%) apresentou ápice arredondado, enquanto 34,6% apresentaram ápice pontiagudo. Observou-se um padrão inverso em alguns genótipos, nomeadamente 79, 82, 93, 96 e 97, nos quais predominaram frutos com ápice pontiagudo ($\geq 70,0\%$). Em contrapartida, os genótipos 80, 83, 84, 87, 88, 89, 90, 92, 95 e 99 apresentaram uma predominância de ápice arredondados, com valores superiores a 90%.

Em relação à forma da base, verificou-se predominância de bases truncadas (83,4%), sendo apenas 16,6% arredondada. Algumas exceções foram registadas nos genótipos 92, 104 e 106, em que predominou a base arredondada.

Quanto à presença de mamilo, a maioria dos frutos apresentou mamilo ausente (55,0%), enquanto 7,7% evidenciou mamilo presente. Algumas diferenças estatísticas significativas foram observadas entre genótipos, o genótipo 85 apresentou todos os frutos com mamilo evidente, enquanto os genótipos 101 e 102 apresentaram percentagens elevadas de frutos com mamilo ($\geq 40,0\%$). Por outro lado, os genótipos 80, 81, 88, 89, 90, 95 e 106 evidenciaram ausência quase total do mamilo.

Tabela 5- Frequência de ocorrência (%) das diferentes características morfológicas observadas nos frutos de cada genótipo.

Genótipo	Simetria			Posição			Ápice		Base		Mamilo		
	Simétrico (%)	Ligeiramente assimétrico (%)	Assimétrico (%)	Junto à base (%)	Central (%)	Junto ao ápice (%)	Pontiagudo (%)	Arredondado (%)	Truncada (%)	Arredondada (%)	Evidente (%)	Pouco evidente (%)	Ausente (%)
76	0,0	40,0	60,0	2,5	97,5	0,0	17,5	82,5	97,5	2,5	12,5	70,0	17,5
77	2,5	62,5	35,0	0,0	72,5	27,5	42,5	57,5	32,5	67,5	0,0	65,0	35,0
78	12,0	44,0	44,0	0,0	100,0	0,0	90,0	10,0	100,0	0,0	32,5	60,0	7,5
79	2,5	22,5	75,0	0,0	100,0	0,0	77,5	22,5	92,5	7,5	32,5	52,5	15,0
80	32,5	65,0	2,5	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	7,5	92,5
81	17,5	42,5	40,0	0,0	100,0	0,0	15,0	85,0	92,5	7,5	2,5	22,5	75,0
82	10,0	47,5	42,5	45,0	55,0	0,0	92,5	7,5	100,0	0,0	32,5	62,5	5,0
83	2,5	80,0	17,5	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	72,5	27,5	0,0	60,0	40,0
84	17,5	55,0	27,5	0,0	100,0	0,0	10,0	90,0	100,0	0,0	0,0	70,0	30,0
85	67,5	32,5	0,0	0,0	100,0	0,0	72,5	27,5	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
86	27,5	70,0	2,5	0,0	100,0	0,0	2,5	97,5	47,5	52,5	0,0	2,5	97,5
87	35,0	60,0	5,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	20,0	80,0
88	20,0	55,0	25,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
89	0,0	90,0	10,0	0,0	100,0	0,0	5,0	95,0	97,5	2,5	0,0	0,0	100,0
90	37,5	52,5	10,0	0,0	100,0	0,0	2,5	97,5	100,0	0,0	0,0	5,0	95,0
91	25,0	70,0	5,0	0,0	100,0	0,0	30,0	70,0	100,0	0,0	0,0	30,0	70,0
92	30,0	60,0	10,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	5,0	95,0	0,0	22,5	77,5
93	0,0	15,0	85,0	0,0	22,5	77,5	97,5	2,5	92,5	7,5	0,0	80,0	20,0

Tabela 5- Frequência de ocorrência (%) das diferentes características morfológicas observadas nos frutos de cada genótipo (continuação).

94	17,5	77,5	5,0	0,0	100,0	0,0	87,5	12,5	82,5	17,5	0,0	95,0	5,0
95	32,5	60,0	7,5	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	10,0	90,0
96	0,0	37,5	62,5	0,0	82,5	17,5	92,5	7,5	22,5	77,5	0,0	62,5	37,5
97	0,0	55,0	45,0	0,0	100,0	0,0	72,5	27,5	100,0	0,0	0,0	72,5	27,5
98	0,0	75,0	25,0	0,0	100,0	0,0	35,0	65,0	100,0	0,0	0,0	35,0	65,0
99	22,5	72,5	5,0	0,0	97,5	2,5	5,0	95,0	100,0	0,0	0,0	5,0	95,0
100	17,5	77,5	5,0	0,0	95,0	5,0	20,0	80,0	100,0	0,0	0,0	20,0	80,0
101	10,0	47,5	42,5	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
102	20,0	47,5	32,5	0,0	90,0	10,0	65,0	35,0	92,5	7,5	40,0	42,5	17,5
103	12,5	45,0	42,5	0,0	100,0	0,0	67,5	32,5	100,0	0,0	0,0	67,5	32,5
104	7,5	75,0	17,5	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	2,5	97,5	2,5	60,0	37,5
105	5,0	37,5	57,5	0,0	100,0	0,0	70,0	30,0	90,0	10,0	12,5	57,5	30,0
106	25,0	67,5	7,5	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados referentes à caracterização qualitativa dos endocarpos dos 31 genótipos avaliados.

Relativamente à simetria A, verificou-se uma predominância de endocarpos ligeiramente simétricos (53,4%), enquanto 38,3% foram classificados como assimétricos e apenas 8,3% como simétricos. Na simetria B, observou-se a mesma tendência, ou seja, prevaleceram os endocarpos ligeiramente simétricos (58,7%), observando-se percentagens inferiores de exemplares totalmente simétricos (41,3%).

Quanto à posição do maior diâmetro, a maioria dos endocarpos apresentou o diâmetro ao centro do fruto (90,3%), sendo residual a ocorrência de frutos com diâmetro junto à base (1,8%) ou junto ao ápice (7,8%).

No que se refere à forma do ápice, predominou a forma pontiaguda (87,4%), sendo a forma arredondada observada em 12,6% das amostras e a forma truncada em 8,7%. Em relação à base, verificou-se uma distribuição equilibrada entre as formas pontiaguda (48,0%) e arredondada (43,3%), sendo a base truncada registada em apenas 8,7% dos endocarpos analisados.

A superfície do endocarpo apresentou, maioritariamente textura lisa (46,2%) ou rugosa (43,0%), sendo muito rugosa em apenas 10,8% dos endocarpos, o que evidencia uma variabilidade moderada entre genótipos quanto a esta característica.

O número de sulcos, apresentou maioritariamente valores intermédios, com 39,4% dos endocarpos apresentando entre 7 e 10 sulcos, seguindo-se os com número reduzido (<7 sulcos, 34,4%) e, por último, aqueles com número elevado (>10 sulcos, 26,1%). A distribuição dos sulcos revelou-se predominantemente uniforme (95,1%), sendo agrupada apenas em 4,9%.

Relativamente à presença de mucrão na extremidade apical, a maioria dos endocarpos apresentou esta característica (85,8%), enquanto 14,2% dos endocarpos foram classificados como ausentes de mucrão.

Tabela 6- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.

Genótipo	Simetria A			Simetria B		Posição		
	Simétrico (%)	Ligeiramente simétrico (%)	Assimétrico (%)	Simétrico (%)	Ligeiramente simétrico (%)	Junto à base (%)	Central (%)	Junto ao ápice (%)
76	0,0	20,0	80,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
77	32,5	50,0	17,5	52,5	47,5	25,0	52,5	22,5
78	0,0	67,5	32,5	40,0	60,0	0,0	100,0	0,0
79	2,5	67,5	30,0	32,5	67,5	0,0	100,0	0,0
80	7,5	75,0	17,5	60,0	40,0	0,0	100,0	0,0
81	7,5	27,5	65,0	7,5	92,5	0,0	100,0	0,0
82	10,0	72,5	17,5	77,5	22,5	22,5	65,0	12,5
83	0,0	72,5	27,5	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
84	2,5	55,0	42,5	27,5	72,5	0,0	100,0	0,0
85	10,0	85,0	5,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
86	2,5	47,5	50,0	40,0	60,0	0,0	100,0	0,0
87	2,5	67,5	30,0	12,5	87,5	0,0	100,0	0,0
88	15,0	60,0	25,0	55,0	45,0	0,0	100,0	0,0
89	2,5	62,5	35,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
90	2,5	50,0	47,5	100,0	0,0	2,5	97,5	0,0
91	5,0	77,5	17,5	45,0	55,0	2,5	97,5	0,0
92	0,0	40,0	60,0	7,5	92,5	0,0	97,5	2,5
93	32,5	50,0	17,5	32,5	67,5	0,0	20,0	80,0
94	10,3	89,7	0,0	10,3	89,7	0,0	100,0	0,0
95	2,5	82,5	15,0	47,5	52,5	0,0	100,0	0,0
96	5,0	32,5	62,5	97,5	2,5	0,0	67,5	32,5
97	0,0	45,0	55,0	37,5	62,5	0,0	95,0	5,0
98	0,0	47,5	52,5	32,5	67,5	0,0	100,0	0,0
99	5,0	55,0	40,0	40,0	60,0	0,0	57,5	42,5
100	7,5	35,0	57,5	22,5	77,5	0,0	80,0	20,0
101	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	85,0	15,0
102	7,5	35,0	57,5	10,0	90,0	0,0	100,0	0,0
103	0,0	35,0	65,0	17,5	82,5	0,0	62,5	37,5
104	5,0	77,5	17,5	5,0	95,0	0,0	100,0	0,0
105	0,0	30,0	70,0	30,0	70,0	0,0	97,5	2,5
106	10,0	55,0	35,0	35,0	65,0	0,0	97,5	2,5

Tabela 7- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.

Genótipo	Ápice			Base		Superfície		
	Pontiagudo (%)	Arredondado (%)	Truncada (%)	Pontiagudo (%)	Arredondada (%)	Lisa (%)	Rugosa (%)	Muito rugosa (%)
76	90,0	10,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
77	72,5	27,5	12,5	65,0	22,5	90,0	10,0	0,0
78	97,5	2,5	7,5	45,0	47,5	5,0	95,0	0,0
79	90,0	10,0	7,5	25,0	67,5	0,0	92,5	7,5
80	100,0	0,0	0,0	7,5	92,5	97,5	2,5	0,0
81	87,5	12,5	0,0	17,5	82,5	0,0	60,0	40,0
82	100,0	0,0	17,5	22,5	60,0	60,0	40,0	0,0
83	2,5	97,5	2,5	20,0	77,5	100,0	0,0	0,0
84	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	97,5	2,5	0,0
85	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
86	100,0	0,0	0,0	97,5	2,5	97,5	2,5	0,0
87	95,0	5,0	2,5	0,0	97,5	0,0	100,0	0,0
88	100,0	0,0	0,0	12,5	87,5	100,0	0,0	0,0
89	100,0	0,0	0,0	57,5	42,5	100,0	0,0	0,0
90	97,5	2,5	0,0	90,0	10,0	27,5	72,5	0,0
91	100,0	0,0	12,5	5,0	82,5	22,5	72,5	5,0
92	100,0	0,0	0,0	75,0	25,0	100,0	0,0	0,0
93	97,5	2,5	0,0	92,5	7,5	100,0	0,0	0,0
94	100,0	0,0	23,1	71,8	5,1	0,0	100,0	0,0
95	100,0	0,0	0,0	22,5	77,5	92,5	7,5	0,0
96	95,0	5,0	0,0	100,0	0,0	77,5	22,5	0,0
97	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
98	92,5	7,5	0,0	95,0	5,0	80,0	20,0	0,0
99	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	12,5	87,5	0,0
100	100,0	0,0	0,0	90,0	10,0	7,5	92,5	0,0
101	100,0	0,0	30,0	0,0	70,0	0,0	2,5	97,5
102	100,0	0,0	2,5	20,0	77,5	22,5	77,5	0,0
103	100,0	0,0	0,0	85,0	15,0	0,0	67,5	32,5
104	100,0	0,0	0,0	67,5	32,5	0,0	100,0	0,0
105	87,5	12,5	0,0	87,5	12,5	7,5	87,5	5,0
106	100,0	0,0	47,5	2,5	50,0	80,0	20,0	0,0

Tabela 8- Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência.

Genótipo	Nº Sulcos			Distribuição sulcos		Extremidade Ápice	
	Reduzido (<7) (%)	Médio (7-10) (%)	Elevado (>10) (%)	Uniforme (%)	Agrupados (%)	Sem mucrão (%)	Com mucrão (%)
76	0,0	2,5	97,5	100,0	0,0	22,5	77,5
77	35,0	65,0	0,0	100,0	0,0	57,5	42,5
78	72,5	27,5	0,0	100,0	0,0	7,5	92,5
79	2,5	25,0	72,5	100,0	0,0	10,0	90,0
80	87,5	7,5	5,0	100,0	0,0	0,0	100,0
81	2,5	67,5	30,0	92,5	7,5	0,0	100,0
82	10,0	27,5	62,5	92,5	7,5	45,0	55,0
83	0,0	2,5	97,5	100,0	0,0	42,5	57,5
84	97,5	0,0	2,5	100,0	0,0	0,0	100,0
85	0,0	32,5	67,5	100,0	0,0	0,0	100,0
86	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
87	0,0	80,0	20,0	100,0	0,0	0,0	100,0
88	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
89	0,0	40,0	60,0	100,0	0,0	0,0	100,0
90	0,0	35,0	65,0	100,0	0,0	2,5	97,5
91	25,0	62,5	12,5	100,0	0,0	20,0	80,0
92	95,0	2,5	2,5	100,0	0,0	0,0	100,0
93	0,0	92,5	7,5	100,0	0,0	2,5	97,5
94	0,0	79,5	20,5	28,2	71,8	0,0	100,0
95	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	2,5	97,5
96	2,5	5,0	92,5	100,0	0,0	0,0	100,0
97	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	12,5	87,5
98	62,5	37,5	0,0	100,0	0,0	7,5	92,5
99	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
100	80,0	20,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
101	40,0	60,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
102	95,0	5,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
103	40,0	50,0	10,0	100,0	0,0	0,0	100,0
104	2,5	90,0	7,5	42,5	57,5	0,0	100,0
105	0,0	72,5	27,5	90,0	10,0	0,0	100,0
106	92,5	7,5	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0

4.2. Parâmetros de qualidade

Para avaliar a qualidade dos azeites obtidos a partir dos diferentes genótipos, foram determinados vários parâmetros físico-químicos e sensoriais. De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2022/2104 da Comissão de 29 de julho de 2022, para que um azeite possa ser classificado como azeite virgem extra, é necessário cumprir um conjunto de critérios, nomeadamente: acidez $\leq 0,8\%$; índice de peróxidos ≤ 20 mEq. O₂/kg; K₂₃₂ $\leq 2,50$; K₂₆₈ $\leq 0,22$; $\Delta K \leq 0,01$. O azeite deve estar isento de defeitos sensoriais e apresentar uma mediana de frutado superior a zero.

4.2.1. Acidez

A avaliação da acidez do azeite é um dos parâmetros utilizados para a caracterização comercial do azeite, uma vez que reflete o teor de ácidos gordos livres, principalmente o ácido oleico, presente no produto final. No presente trabalho, foram analisadas 31 amostras de azeite obtendo-se valores de acidez que variaram entre 0,11% e 0,28 %.

A maioria das amostras (cerca de 77%) apresentou acidez de 0,23%, demonstrando uma elevada uniformidade entre os azeites analisados. Apenas cinco amostras atingiram 0,28%, enquanto o azeite do genótipo 80 apresentou o valor mínimo de 0,11%. Todos os resultados estão consideravelmente abaixo do limite máximo de 0,80% estabelecido pelo Regulamento de Execução (UE) 2022/2104 para a categoria comercial azeite virgem extra, indicando que todas as amostras cumprem os requisitos estabelecidos para este parâmetro de qualidade.

As ligeiras variações observadas podem ser atribuídas a diferentes graus de maturação da azeitona. Resultados semelhantes foram reportados por Rodrigues et al., (2020) em azeites provenientes de oliveiras centenárias do nordeste de Portugal, das variedades Lentisca, Madural, Rebolã, Redondal, Verdeal e Verdeal Transmontana, com valores de acidez entre 0,20 e 0,30%.

4.2.2. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos das amostras de azeite dos diferentes genótipos analisados apresentou valores compreendidos entre 5,0 e 19,1 mEq O₂/kg azeite. Observou-se que a maioria das amostras apresentou valores entre 5,0 e 10,0 mEq O₂/kg azeite, evidenciando

um baixo nível de oxidação primária e, conseqüentemente, uma elevada estabilidade oxidativa.

Alguns genótipos, como o genótipo 80, apresentou valores superiores (19,1 mEq O₂/kg azeite), o que poderá indicar início de degradação oxidativa, possivelmente associada a maior exposição ao oxigénio ou à luz, ou ainda à diferença na composição em ácidos gordos e antioxidantes naturais (como tocoferóis e polifenóis).

De acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2022/2104, o valor máximo permitido para azeite virgem extra é de 20,0 mEq O₂/kg azeite. Assim, todas as amostras analisadas encontram-se dentro dos limites regulamentares para a categoria de azeite virgem extra. Resultados semelhantes foram mencionados por Rodrigues et al., (2020), onde obteve valores de índice de peróxidos a variar entre de 3,0 a 5,2 mEq.O₂/kg azeite das variedades Lentisca, Madural, Rebolã, Redondal, Verdeal. Contudo, quando comparados com o genótipo 86 e 96 (Madural) e genótipo 92 (Verdeal), os valores obtidos neste estudo foram ligeiramente superiores, facto também reportado por Chéu Guedes et al., (2023) em diferentes regiões geográficas, com valores acima de 8,0 mEq.O₂/kg azeite.

4.2.3. Coeficiente de extinção no ultravioleta

Os coeficientes de extinção específicos no ultravioleta (K₂₃₂ e K₂₆₈) das amostras de azeite dos diferentes genótipos analisados (genótipos 76 a 106) apresentaram valores que variaram entre 1,50 e 2,52 para K₂₃₂ e entre 0,11 e 0,22 para K₂₆₈.

O parâmetro K₂₃₂ está associado à presença de dienos conjugados, formados durante as fases iniciais da oxidação lipídica. A maioria das amostras apresentou valores de K₂₃₂ entre 1,60 e 2,10, o que indica baixo grau de oxidação primária. Algumas amostras, nomeadamente a 94 (2,39), apresentam valores mais elevados, sugerindo o início de processos oxidativos ou possíveis variações nas condições de armazenamento. Apenas o genótipo 89 (2,52) ultrapassa ligeiramente os limites estabelecidos pela legislação em vigor, Regulamento de Execução (UE) 2022/2104, que fixa valores máximos de $K_{232} \leq 2,50$. As restantes amostras encontravam-se dentro dos limites regulamentares, confirmando a conformidade dos azeites.

O coeficiente K₂₆₈, relacionado à presença de trienos conjugados (produtos secundários de oxidação, como aldeídos e cetonas), variou entre 0,11 e 0,22. Todos os valores obtidos encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação em vigor, Regulamento de Execução (UE) 2022/2104, que fixa valores máximos de $K_{268} \leq 0,22$

para azeites classificados como virgem extra. Assim, todas as amostras analisadas cumprem os critérios legais de qualidade.

A variabilidade observada entre os genótipos evidencia o papel determinante da genética na composição e estabilidade dos azeites. Embora todos os genótipos apresentem parâmetros dentro dos limites legais para azeite virgem extra, estas diferenças permitem identificar genótipos com maior potencial de estabilidade, como 76, 78, 81 e 104 e outros mais suscetíveis à oxidação, nomeadamente os genótipos 88, 89 e 94.

Os valores médios obtidos para os parâmetros de qualidade dos azeites dos diferentes genótipos (acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{268} e ΔK , encontram-se representados na Tabela 9.

Tabela 9- Valores médios \pm desvios padrões dos parâmetros de qualidade, nomeadamente a acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (mEq.O₂/kg de azeite), K_{232} , K_{268} e ΔK , determinados para os diferentes genótipos.

Genótipo	Acidez (% ácido oleico)	IP (mEq.O ₂ /kg de azeite)	K_{232}	K_{268}	ΔK
76	0,23 \pm 0,00 ^b	5,0 \pm 0,0 ^j	1,64 \pm 0,11 ^{klm}	0,13 \pm 0,01 ^h	0,00 \pm 0,00 ^a
77	0,23 \pm 0,00 ^c	11,6 \pm 0,0 ^b	1,90 \pm 0,06 ^{fghi}	0,19 \pm 0,00 ^{cd}	0,00 \pm 0,00 ⁱ
78	0,23 \pm 0,00 ^c	5,8 \pm 0,0 ⁱ	1,62 \pm 0,00 ^{klm}	0,16 \pm 0,00 ^{efg}	0,00 \pm 0,00 ^{bcdef}
79	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	5,8 \pm 0,0 ⁱ	1,61 \pm 0,06 ^{klm}	0,18 \pm 0,00 ^{de}	0,00 \pm 0,00 ^{abcd}
80	0,11 \pm 0,00 ^b	19,1 \pm 0,0 ^a	2,03 \pm 0,00 ^{defg}	0,15 \pm 0,00 ^{gh}	0,00 \pm 0,00 ^{bcdef}
81	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	5,8 \pm 0,0 ⁱ	1,66 \pm 0,03 ^{klm}	0,17 \pm 0,00 ^{def}	0,00 \pm 0,00 ^{bcdef}
82	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	11,6 \pm 0,0 ^b	1,91 \pm 0,07 ^{fghi}	0,18 \pm 0,01 ^{def}	0,00 \pm 0,00 ^{abcdef}
83	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	10,0 \pm 0,0 ^d	1,50 \pm 0,03 ^m	0,16 \pm 0,00 ^{efg}	0,00 \pm 0,00 ^{ab}
84	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	1,92 \pm 0,09 ^{fghi}	0,19 \pm 0,00 ^{bcd}	0,00 \pm 0,00 ^{abcde}
85	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	5,8 \pm 0,0 ⁱ	1,83 \pm 0,08 ^{fghijk}	0,22 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^{ab}
86	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	10,0 \pm 0,0 ^d	2,37 \pm 0,00 ^{abc}	0,19 \pm 0,00 ^{cd}	0,00 \pm 0,00 ^{defg}
87	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	7,5 \pm 0,0 ^g	1,87 \pm 0,06 ^{fghij}	0,17 \pm 0,01 ^{defg}	0,00 \pm 0,00 ^{abc}
88	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	5,8 \pm 0,0 ⁱ	1,96 \pm 0,02 ^{efgh}	0,22 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^{bcdef}
89	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	2,52 \pm 0,10 ^a	0,22 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^{hi}
90	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	9,1 \pm 0,0 ^c	2,06 \pm 0,06 ^{def}	0,20 \pm 0,00 ^{abc}	0,00 \pm 0,00 ^{fg}
91	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	1,91 \pm 0,00 ^{fghi}	0,19 \pm 0,00 ^{bcd}	0,00 \pm 0,00 ^{abcde}
92	0,28 \pm 0,00 ^a	6,7 \pm 0,0 ^h	1,87 \pm 0,14 ^{fghij}	0,18 \pm 0,01 ^{def}	0,00 \pm 0,00 ^{cdf}
93	0,28 \pm 0,00 ^a	7,5 \pm 0,0 ^g	1,96 \pm 0,05 ^{efgh}	0,18 \pm 0,00 ^{de}	0,00 \pm 0,00 ^{efg}
94	0,28 \pm 0,00 ^a	10,0 \pm 0,0 ^d	2,39 \pm 0,14 ^{ab}	0,22 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^{gh}
95	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	2,20 \pm 0,21 ^{bcd}	0,17 \pm 0,00 ^{defg}	0,00 \pm 0,00 ^{cdefg}
96	0,28 \pm 0,00 ^a	10,8 \pm 0,0 ^c	1,91 \pm 0,00 ^{fghi}	0,19 \pm 0,00 ^{de}	0,00 \pm 0,00 ^{cdefg}
97	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	9,1 \pm 0,0 ^e	1,65 \pm 0,05 ^{klm}	0,19 \pm 0,00 ^{cd}	0,00 \pm 0,00 ^{abc}

Tabela 9- Valores médios \pm desvios padrões dos parâmetros de qualidade, nomeadamente a acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (mEq.O₂/kg de azeite), K₂₃₂, K₂₆₈ e Δ K, determinados para os diferentes genótipos (continuação).

98	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	7,5 \pm 0,0 ^g	1,58 \pm 0,05 ^{lm}	0,18 \pm 0,00 ^{def}	0,00 \pm 0,00 ^{abcde}
99	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	1,82 \pm 0,00 ^{ghijk}	0,16 \pm 0,00 ^{fgh}	0,00 \pm 0,00 ^{efg}
100	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	10,0 \pm 0,0 ^d	1,79 \pm 0,01 ^{hijkl}	0,15 \pm 0,00 ^{gh}	0,00 \pm 0,00 ^{cdefg}
101	0,28 \pm 0,00 ^a	10,8 \pm 0,0 ^c	1,68 \pm 0,06 ^{ijkl}	0,19 \pm 0,00 ^{bcd}	0,00 \pm 0,00 ^{fg}
102	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	10,0 \pm 0,0 ^d	2,16 \pm 0,01 ^{cde}	0,21 \pm 0,00 ^{ab}	0,00 \pm 0,00 ^{ab}
103	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	7,5 \pm 0,0 ^g	1,81 \pm 0,11 ^{ghijkl}	0,15 \pm 0,01 ^{fgh}	0,00 \pm 0,00 ^{defg}
104	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	7,5 \pm 0,0 ^g	1,74 \pm 0,00 ^{hijkl}	0,11 \pm 0,00 ⁱ	0,00 \pm 0,00 ^{abcd}
105	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	8,3 \pm 0,0 ^f	1,95 \pm 0,02 ^{efgh}	0,21 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^{ab}
106	0,23 \pm 0,00 ^{bc}	10,8 \pm 0,0 ^c	1,81 \pm 0,00 ^{ghijkl}	0,16 \pm 0,00 ^{efg}	0,00 \pm 0,00 ⁱ
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

4.2.4. Análise Sensorial

A análise sensorial revelou diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos para algumas sensações olfativas (Tabela 10), demonstrando variação no perfil sensorial dos azeites analisados. As diferenças mais notórias foram observadas nas sensações olfativas, nos atributos frutado verde, banana, tomate, couve, erva fresca, rama de tomateira e folha de oliveira, enquanto os atributos de maçã, frutos secos e harmonia não apresentaram variação significativa.

A sensação de frutado verde apresentou intensidade entre 1,7 (genótipos 83 e 99) e 3,4 (genótipo 86), demonstrando que existem diferentes intensidades entre amostras. A sensação olfativa de maçã não apresentou diferenças significativas entre genótipos. A intensidade deste atributo variou entre 1,6 e 3,0, indicando uma presença homogênea deste atributo nas amostras, contudo, as intensidades obtidas foram inferiores aos reportados por Rodrigues et al., (2020) para a variedade Madural (genótipos 86 e 96) e variedade Verdeal (genótipo 92).

A sensação de banana destacou-se pela sua variabilidade, sendo mais intenso nos azeites dos genótipos 77, 84, 89 e 90, enquanto nos genótipos 97, 104 e 105 teve intensidade baixa ou estava ausente. De forma semelhante, a sensação de tomate apresentou elevada intensidade nos genótipos 93, 94, 102 e 103, variando os valores entre 3,0 e 3,5. Por outro lado, genótipos como 89 e 104 apresentaram valores de intensidade significativamente menores, 1,5 e 1,2, respetivamente.

A sensação de frutos secos variou entre 1,5 e 3,0. Em contraste, a sensação de couve revelou diferenças altamente significativas, com alguns genótipos a destacarem-se

pela maior intensidade deste atributo, nomeadamente 93, 102 e 103. A sensação de erva fresca evidenciou variação significativa entre genótipos, com intensidades mais elevadas nos genótipos 93, 94 e 102 (2,9; 2,9; 3,4, respetivamente), enquanto os genótipos 97 e 104 apresentaram valores mais reduzidos de 1,4 e 1,9, respetivamente. Por sua vez, a sensação rama de tomateira, embora ausente na maioria dos genótipos, foi detetada em alguns azeites, nomeadamente 80, 82, 93 e 103, que se distinguiram pela presença deste aroma, com valores a variar entre 2,4 e 2,7.

A sensação de folha de oliveira, ausente na maioria dos genótipos, foi detetada apenas nos genótipos 93, 95 e 103, com valores entre 1,7 e 2,5, evidenciando diferenças altamente significativas. A ausência deste aroma na maioria dos azeites sugere que se trata de um descritor sensorial específico de determinados genótipos, possivelmente associado à composição volátil característica de cada um.

Apesar das diferenças detetadas em alguns atributos, o parâmetro harmonia não apresentou diferenças estatísticas (valor de $p > 0,05$), com valores entre 8,5 e 9,2. Este resultado indica que, independentemente do perfil aromático específico de cada amostra, todos os azeites apresentaram equilíbrio sensorial.

A avaliação gustativa (Tabela 11) evidenciou diferenças significativas entre os genótipos para os diferentes atributos detetados, confirmando a influência da origem genética no perfil organolético dos azeites analisados.

O atributo de frutado verde apresentou elevada variabilidade, com intensidades mais elevadas nos genótipos 85, 93, 98, 101 e 103, que se distinguiram por apresentarem maior intensidade de frutado verde. Em contraste, os genótipos 104 e 106 apresentaram menos intensidade de frutado verde. Em comparação com os resultados obtidos por Rodrigues et al., (2020) referentes às mesmas variedades Madural (genótipos 86 e 96) Verdeal (genótipo 92), observa-se que os valores de frutado verde obtiveram menos intensidade.

O atributo de doce apresentou grande variabilidade, destacando-se os genótipos 77 e 104 por apresentarem maior intensidade (4,8 e 4,2), enquanto as restantes amostras apresentarem menores intensidades.

O atributo de amargo variou significativamente, sendo que os genótipos 85, 91, 98 e 99 apresentarem intensidades mais elevadas. Já os genótipos 77, 104 e 106 apresentaram intensidades menores.

De forma semelhante, o atributo de picante mostrou diferenças estatísticas entre os genótipos, a apresentar maior intensidade os genótipos 93, 98, 99 e 101, enquanto os genótipos 77, 96 e 106 obtiveram menor intensidade.

Quanto aos atributos frutados, a sensação de maçã não apresentou diferenças significativas, havendo uniformidade entre os genótipos. A sensação de tomate não foi detetada nos genótipos 77, 78, 79, 87 e 92, contudo obteve maior intensidade nos genótipos 93 e 98. A sensação de banana não foi detetada na maioria das amostras, contudo destacam-se os genótipos 77, 89, 100 e 104, por apresentarem valores de intensidades superiores.

Já nas sensações herbáceas, a couve e erva fresca apresentaram diferenças significativas nos genótipos 76, 89, 94 e 99 a evidenciarem maior intensidade desses atributos. A sensação de rama tomateira apenas foi detetada nos genótipos 80, 82 e 103, com intensidades entre 2,4 e 2,7. Por sua vez, o atributo de folha de oliveira foi detetado nos genótipos 93, 95 e 103, variando as intensidades entre 1,7 e 2,5.

Os atributos harmonia, complexidade e persistência apresentaram valores elevados e sem diferenças significativas entre genótipos, demonstrando o elevado equilíbrio sensorial dos azeites analisados. Destacaram-se os genótipos 85, 91, 98 e 99 por apresentarem maior intensidade de harmonia (8,6–9,1), complexidade (7,0–8,8) e persistência (7,5–9,1).

Importa salientar que não foram detetados defeitos sensoriais em nenhuma amostra analisada, o que evidencia a elevada qualidade e a concordância com os resultados físico-químicos previamente obtidos.

Tabela 10- Sensações olfativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites.

Genótipo	Sensações olfativas								
	Frutado Verde	Maçã	Tomate	Banana	Frutos secos	Couve	Erva fresca	Rama Tomateira	Folha Oliveira
76	2,9 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,4 ^{bcde}	2,2 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,0 ^{bc}	2,3 ± 0,0 ^a	nd	nd
77	1,9 ± 0,4 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	nd	3,6 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	nd	3,2 ± 0,7 ^a	nd	nd
78	2,0 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	nd	2,9 ± 0,5 ^{ab}	2,0 ± 0,4 ^a	nd	2,0 ± 0,4 ^{ab}	nd	nd
79	1,9 ± 0,4 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	nd	3,2 ± 0,1 ^{ab}	2,1 ± 0,4 ^a	nd	3,1 ± 0,6 ^a	nd	nd
80	2,8 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,1 ^{abcd}	nd	1,9 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,1 ^{abc}	1,9 ± 0,3 ^{ab}	2,6 ± 0,2 ^a	nd
81	2,3 ± 0,7 ^a	1,9 ± 0,6 ^a	2,6 ± 0,2 ^{bcde}	nd	1,6 ± 0,7 ^a	2,6 ± 0,1 ^c	nd	nd	nd
82	2,8 ± 0,4 ^a	2,3 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,2 ^{ab}	nd	2,3 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,2 ^{abc}	2,7 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,4 ^a	nd
83	1,7 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,6 ^a	2,2 ± 0,6 ^{abcde}	nd	1,6 ± 0,6 ^a	nd	2,3 ± 0,7 ^a	nd	nd
84	2,7 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,4 ^{abcde}	3,5 ± 0,4 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	nd	2,6 ± 0,4 ^a	nd	nd
85	3,0 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,4 ^{ab}	nd	1,5 ± 0,6 ^a	nd	2,2 ± 0,5 ^a	nd	nd
86	3,4 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,3 ^{abc}	nd	2,0 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,4 ^{bc}	2,4 ± 0,1 ^a	nd	nd
87	1,8 ± 0,6 ^a	2,3 ± 0,7 ^a	nd	nd	1,7 ± 0,7 ^a	nd	1,8 ± 0,7 ^{ab}	nd	nd
88	2,7 ± 0,3 ^a	2,7 ± 0,3 ^a	3,0 ± 0,1 ^{abc}	nd	2,0 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,0 ^{bc}	2,0 ± 0,3 ^{ab}	nd	nd
89	2,0 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,6 ^{de}	3,0 ± 0,6 ^c	2,3 ± 0,7 ^a	nd	3,1 ± 0,8 ^a	nd	nd
90	2,3 ± 0,6 ^a	2,3 ± 0,6 ^a	1,6 ± 0,4 ^{cde}	3,1 ± 0,5 ^c	1,6 ± 0,5 ^a	nd	2,2 ± 0,9 ^a	nd	nd
91	2,6 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,0 ^{abcd}	nd	2,4 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,1 ^{bc}	2,7 ± 0,2 ^a	nd	nd
92	2,0 ± 0,6 ^a	2,3 ± 0,1 ^a	nd	nd	1,9 ± 0,4 ^a	nd	1,8 ± 0,2 ^{ab}	nd	nd
93	2,8 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,0 ^{abc}	nd	2,0 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,1 ^{abc}	2,9 ± 0,1 ^a	nd	2,3 ± 0,1 ^a
94	2,4 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,4 ^{ab}	nd	2,1 ± 0,3 ^a	nd	3,4 ± 0,6 ^a	nd	nd
95	2,8 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,7 ^{abcde}	2,8 ± 0,4 ^{ab}	1,7 ± 0,8 ^a	nd	2,3 ± 0,6 ^a	nd	1,7 ± 0,7 ^b
96	2,1 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^{abcde}	nd	1,7 ± 0,4 ^a	nd	2,1 ± 0,1 ^{ab}	nd	nd
97	2,1 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,4 ^{abcde}	nd	1,6 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,6 ^d	1,4 ± 0,6 ^{ab}	nd	nd
98	3,1 ± 0,2 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,4 ^{ab}	nd	1,6 ± 0,0 ^a	nd	2,3 ± 0,3 ^a	nd	nd
99	1,7 ± 0,6 ^a	2,9 ± 0,6 ^a	2,2 ± 0,6 ^{abcde}	nd	1,8 ± 0,6 ^a	3,0 ± 0,8 ^{bc}	2,2 ± 1,1 ^a	nd	nd

Tabela 10- Sensações olfativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites (continuação).

100	2,1 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	2,2 ± 0,1 ^{bcde}	2,2 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,3 ^a	nd	1,8 ± 0,2 ^{ab}	nd	nd
101	3,0 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,1 ^{abc}	nd	2,1 ± 0,6 ^a	nd	2,1 ± 0,6 ^{ab}	nd	nd
102	2,8 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,4 ^a	3,4 ± 0,4 ^a	nd	2,5 ± 0,7 ^a	3,9 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	nd	nd
103	3,1 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	nd	1,7 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,1 ^{ab}	3,1 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,1 ^a
104	1,9 ± 0,6 ^a	2,9 ± 0,8 ^a	1,2 ± 0,4 ^{ef}	3,0 ± 0,8 ^{ab}	3,0 ± 0,7 ^a	nd	1,9 ± 0,8 ^{ab}	nd	nd
105	2,1 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,7 ^a	1,6 ± 0,6 ^{de}	2,2 ± 0,6 ^b	2,8 ± 0,8 ^a	nd	1,7 ± 0,6 ^{ab}	nd	nd
106	2,7 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,4 ^{abcd}	nd	2,1 ± 0,5 ^a	nd	2,9 ± 0,4 ^a	nd	nd
Valor de p	0,006	0,108	< 0,001	< 0,001	0,194	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey); nd = não detectado.

Tabela 11- Sensações gustativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites.

Genótipo	Sensações gustativas											
	Frutado Verde	Doce	Amargo	Picante	Maçã	Banana	Tomate	Frutos secos	Couve	Erva fresca	Rama Tomateira	Folha Oliveira
76	3,9 ± 0,1 ^{abcde}	1,4 ± 0,5 ^{cd}	3,1 ± 0,1 ^{abcde}	3,2 ± 0,1 ^{abcde}	2,6 ± 0,1 ^a	nd	3,2 ± 0,1 ^{ab}	2,1 ± 0,0 ^a	4,2 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,3 ^a	nd	nd
77	2,3 ± 0,6 ^{edef}	4,8 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,4 ^e	1,9 ± 0,4 ^{cd}	3,2 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,1 ^a	nd	2,3 ± 0,4 ^a	nd	2,1 ± 0,5 ^{abc}	nd	nd
78	2,7 ± 0,5 ^{bcdef}	2,2 ± 0,6 ^{bcd}	2,7 ± 0,7 ^{abcde}	3,1 ± 0,8 ^{abcd}	2,7 ± 0,4 ^a	nd	2,6 ± 0,7 ^{ab}	1,9 ± 0,3 ^a	nd	2,8 ± 0,6 ^{ab}	nd	nd
79	2,2 ± 0,1 ^{ef}	3,2 ± 0,6 ^{abc}	2,1 ± 0,3 ^{abcde}	3,0 ± 0,1 ^{abcd}	2,4 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,1 ^{bc}	nd	2,1 ± 0,4 ^a	nd	3,3 ± 0,3 ^{ab}	nd	nd
80	3,4 ± 0,0 ^{abcdef}	1,5 ± 0,7 ^{cd}	2,9 ± 0,1 ^{abcde}	3,4 ± 0,0 ^{abcd}	2,7 ± 0,5 ^a	nd	3,2 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,4 ^a	3,0 ± 0,1 ^{abc}	2,2 ± 0,6 ^{abc}	nd	nd
81	2,7 ± 0,5 ^{bcdef}	1,5 ± 0,4 ^{cd}	3,2 ± 0,5 ^{abcde}	3,2 ± 0,5 ^{abcd}	2,1 ± 0,6 ^a	nd	2,8 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,5 ^a	3,1 ± 0,1 ^{abc}	nd	nd	nd
82	2,9 ± 0,6 ^{abcdef}	2,8 ± 0,7 ^{abcd}	2,2 ± 0,6 ^{abcde}	2,8 ± 0,6 ^{abcd}	2,2 ± 0,6 ^a	nd	2,8 ± 0,6 ^{ab}	2,1 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,2 ^{abc}	2,2 ± 0,4 ^{abc}	nd	nd

Tabela 11- Sensações gustativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites (continuação).

83	2,8 ± 0,6 ^{bcdef}	2,1 ± 0,6 ^{cd}	3,4 ± 0,8 ^{abcd}	3,9 ± 0,9 ^{abc}	2,7 ± 0,7 ^a	nd	3,4 ± 0,8 ^{ab}	2,0 ± 0,8 ^a	nd	2,9 ± 0,7 ^{ab}	2,7 ± 0,0 ^a	nd
84	2,5 ± 0,5 ^{bcdef}	2,5 ± 0,6 ^{bcd}	1,8 ± 0,4 ^{bcde}	2,6 ± 0,6 ^{abcd}	2,0 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,6 ^{cd}	2,0 ± 0,1 ^{abc}	1,6 ± 0,1 ^a	nd	2,8 ± 0,4 ^{ab}	nd	nd
85	4,0 ± 0,1 ^{abcd}	1,9 ± 0,2 ^{cd}	3,4 ± 0,0 ^{abcd}	3,5 ± 0,8 ^{abcd}	2,2 ± 0,4 ^a	nd	2,8 ± 0,1 ^{ab}	1,6 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,2 ^c	1,2 ± 0,2 ^{bc}	nd	nd
86	3,0 ± 0,1 ^{abcdef}	3,3 ± 0,0 ^{abc}	1,9 ± 0,4 ^{bcde}	2,6 ± 0,2 ^{abcd}	2,7 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,1 ^{bc}	2,7 ± 0,2 ^{ab}	2,0 ± 0,2 ^a	2,6 ± 0,4 ^{bc}	2,1 ± 0,5 ^{abc}	nd	nd
87	2,4 ± 0,6 ^{bcdef}	2,4 ± 0,6 ^{bcd}	3,0 ± 0,5 ^{abcde}	3,5 ± 0,4 ^{abcd}	2,9 ± 0,6 ^a	nd	3,5 ± 0,4 ^a	2,0 ± 1,0 ^a	2,8 ± 0,9 ^{abc}	2,2 ± 1,0 ^{abc}	nd	nd
88	3,7 ± 0,1 ^{abcde}	0,8 ± 0,1 ^d	3,5 ± 0,2 ^{abcd}	2,7 ± 0,1 ^{abcd}	2,7 ± 0,1 ^a	nd	3,2 ± 0,4 ^{ab}	1,9 ± 0,0 ^a	3,2 ± 0,2 ^{abc}	2,2 ± 0,1 ^{abc}	nd	2,9 ± 0,1 ^c
89	3,4 ± 0,1 ^{abcdef}	3,4 ± 0,0 ^{abc}	1,9 ± 0,3 ^{bcde}	2,8 ± 0,3 ^{abcd}	2,8 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,2 ^{ab}	1,5 ± 0,1 ^{bcd}	2,3 ± 0,1 ^a	nd	3,6 ± 0,8 ^a	nd	nd
90	3,5 ± 0,6 ^{abcdef}	1,7 ± 0,8 ^{cd}	2,9 ± 0,7 ^{abcde}	3,5 ± 0,7 ^{abcd}	2,4 ± 0,6 ^a	nd	3,6 ± 0,7 ^a	1,7 ± 0,8 ^a	3,7 ± 0,7 ^{ab}	3,0 ± 0,9 ^{ab}	1,7 ± 0,8 ^b	nd
91	3,3 ± 0,6 ^{abcdef}	1,5 ± 0,7 ^{cd}	4,1 ± 0,6 ^a	3,4 ± 0,5 ^{abcd}	2,7 ± 0,4 ^a	nd	2,7 ± 0,6 ^{ab}	2,0 ± 0,2 ^a	4,0 ± 0,6 ^{ab}	2,8 ± 0,2 ^{ab}	nd	3,4 ± 0,4 ^a
92	2,2 ± 0,5 ^{ef}	1,9 ± 0,7 ^{cd}	2,9 ± 0,3 ^{abcde}	2,9 ± 0,3 ^{abcd}	2,3 ± 0,2 ^a	nd	3,1 ± 0,1 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^a	nd	3,0 ± 0,1 ^{ab}	nd	nd
93	4,1 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^d	3,1 ± 0,8 ^{abcde}	3,8 ± 0,6 ^{abc}	2,7 ± 0,0 ^a	nd	3,3 ± 0,0 ^{ab}	2,2 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,2 ^{ab}	2,6 ± 0,4 ^{ab}	nd	3,2 ± 0,1 ^a
94	2,8 ± 0,3 ^{abcdef}	2,0 ± 0,3 ^{cd}	2,8 ± 0,5 ^{abcde}	3,4 ± 0,4 ^{abcd}	2,9 ± 0,6 ^a	nd	3,4 ± 0,6 ^{ab}	2,2 ± 0,6 ^a	nd	3,4 ± 0,8 ^{ab}	nd	nd
95	3,0 ± 0,4 ^{abcdef}	1,8 ± 0,9 ^{cd}	3,0 ± 0,4 ^{abcde}	3,6 ± 0,3 ^{abcd}	3,0 ± 0,5 ^a	3,0 ± 0,5 ^{bcd}	3,6 ± 0,4 ^a	1,7 ± 1,0 ^a	3,7 ± 0,4 ^{ab}	3,1 ± 0,6 ^{ab}	nd	1,9 ± 0,8 ^a
96	2,6 ± 0,1 ^{bcdef}	1,4 ± 0,6 ^{cd}	2,5 ± 0,3 ^{abcde}	2,0 ± 0,1 ^{bcd}	1,4 ± 0,3 ^a	nd	2,4 ± 0,1 ^{ab}	1,8 ± 0,2 ^a	nd	2,2 ± 0,1 ^{abc}	nd	nd
97	2,3 ± 0,4 ^{def}	1,7 ± 0,1 ^{cd}	3,1 ± 0,0 ^{abcde}	3,6 ± 0,1 ^{abcd}	2,4 ± 0,1 ^a	nd	2,8 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,1 ^{bc}	1,9 ± 0,3 ^{abc}	nd	nd

Tabela 11- Sensações gustativas avaliadas na análise sensorial para cada um dos azeites (continuação).

98	4,6 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,4 ^{cd}	3,9 ± 0,1 ^{ab}	3,9 ± 0,1 ^{ab}	2,8 ± 0,1 ^a	nd	4,0 ± 0,6 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,5 ^{ab}	3,1 ± 0,4 ^{ab}	nd	nd
99	3,5 ± 0,8 ^{abcdef}	1,8 ± 0,6 ^{cd}	3,6 ± 0,9 ^{abcd}	4,2 ± 0,8 ^a	3,0 ± 0,8 ^a	nd	3,6 ± 0,8 ^a	2,2 ± 1,1 ^a	3,7 ± 0,7 ^{ab}	3,1 ± 0,8 ^{ab}	nd	nd
100	3,0 ± 0,6 ^{abcdef}	3,0 ± 0,6 ^{abc}	2,1 ± 0,7 ^{abcde}	3,5 ± 0,6 ^{abcd}	2,9 ± 0,7 ^a	2,1 ± 0,7 ^d	2,1 ± 0,8 ^{abc}	1,6 ± 0,6 ^a	nd	3,2 ± 0,5 ^{ab}	nd	nd
101	4,0 ± 0,0 ^{abcd}	1,70,5 ± ^{cd}	3,8 ± 0,4 ^{abc}	4,3 ± 0,4 ^a	1,7 ± 0,6 ^a	nd	2,8 ± 0,8 ^{ab}	1,6 ± 0,7 ^a	3,3 ± 0,7 ^{ab}	2,9 ± 0,8 ^{ab}	nd	nd
102	3,3 ± 0,4 ^{abcdef}	2,7 ± 0,4 ^{bcd}	2,7 ± 0,3 ^{abcde}	3,4 ± 0,4 ^{abcd}	3,2 ± 0,6 ^a	nd	2,7 ± 0,6 ^{ab}	1,8 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,8 ^{abc}	2,8 ± 0,9 ^{ab}	nd	nd
103	4,1 ± 0,2 ^{abc}	1,9 ± 0,1 ^{cd}	3,0 ± 0,1 ^{abcde}	3,0 ± 0,1 ^{abcd}	2,4 ± 0,1 ^a	nd	3,0 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,3 ^{ab}	2,6 ± 0,2 ^{ab}	2,6 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,1 ^b
104	1,8 ± 0,4 ^f	4,2 ± 0,1 ^{ab}	1,7 ± 0,4 ^{cde}	2,4 ± 0,4 ^{abcd}	3,0 ± 0,6 ^a	3,6 ± 0,6 ^{abc}	0,6 ± 0,1 ^{cd}	3,2 ± 0,4 ^a	nd	1,7 ± 0,5 ^{abc}	nd	nd
105	2,3 ± 0,5 ^{def}	1,6 ± 0,6 ^{cd}	3,4 ± 0,9 ^{abcd}	3,4 ± 0,9 ^{abcd}	2,2 ± 0,8 ^a	nd	2,9 ± 0,8 ^{ab}	2,2 ± 0,8 ^a	nd	2,3 ± 0,8 ^{abc}	nd	nd
106	2,1 ± 0,6 ^{ef}	3,2 ± 0,4 ^{abc}	1,6 ± 0,6 ^{de}	1,7 ± 0,6 ^d	2,2 ± 0,6 ^a	nd	2,8 ± 0,6 ^{ab}	2,1 ± 0,7 ^a	nd	2,2 ± 0,8 ^{abc}	nd	nd
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,106	< 0,001	< 0,001	0,844	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey); nd = não detetado.

4.3. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

A capacidade antioxidante dos azeites foi avaliada através do método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Este método permite determinar a atividade antirradicalar, refletindo a eficácia do azeite em neutralizar radicais livres. Assim, a percentagem de inibição obtida traduz o potencial antioxidante de cada amostra. Na Figura 8 apresentam-se os resultados relativos à percentagem de inibição dos azeites provenientes dos 31 genótipos avaliados (genótipo 76 a 106).

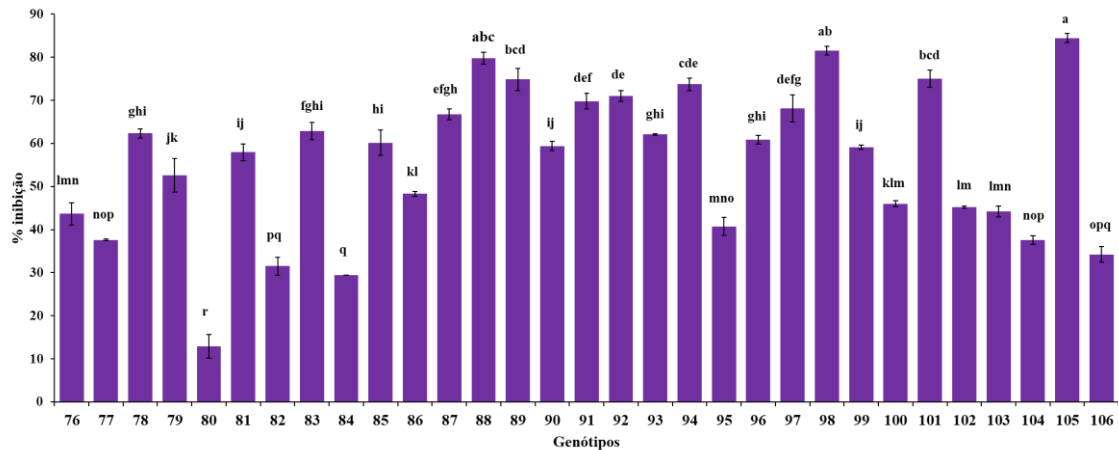


Figura 8 – Atividade antioxidante, expressa em % de inibição, determinada pelo método DPPH. Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

A análise de variância revelou diferenças altamente significativas (valor de $p < 0,001$) entre os genótipos analisados (genótipo 76 a 106).

Os valores de inibição do DPPH variaram de 12,9% (genótipo 80) e 84,5% (genótipo 105), com uma média de 55,9%, demonstrando uma variação significativa na atividade antioxidante entre os genótipos. Estes resultados indicam diferenças genéticas na capacidade de síntese e acumulação de compostos antioxidantes.

Verificou-se que alguns genótipos, nomeadamente os genótipos 88, 98, 105, apresentaram percentagens de inibição superior a 70,0%, demonstrando assim uma elevada capacidade antioxidante. Tais genótipos podem ser destacados como promissores para futuros estudos de melhoramento genético ou desenvolvimento de produtos funcionais, dado seu elevado potencial de neutralização de radicais livres. Por outro lado, os genótipos 80 (12,9%) e 104 (37,6%) apresentaram menores percentagens de inibição. As restantes amostras apresentaram valores de DPPH entre 40,0% e 75,0%. Esta variabilidade de valores, reforça a influência do fator genético.

4.4. Teor em Fenóis Totais

Uma outra forma de avaliar a atividade antioxidante dos azeites, é através da determinação do teor de fenóis totais, que indica a quantidade total de compostos fenólicos presentes no azeite, expressa em mg de ácido gálico por kg de azeite (mg ác. Gal./kg azeite). Na Figura 9 encontram-se os resultados obtidos para o teor de fenóis totais provenientes dos diferentes genótipos estudados (genótipo 76 a 106).

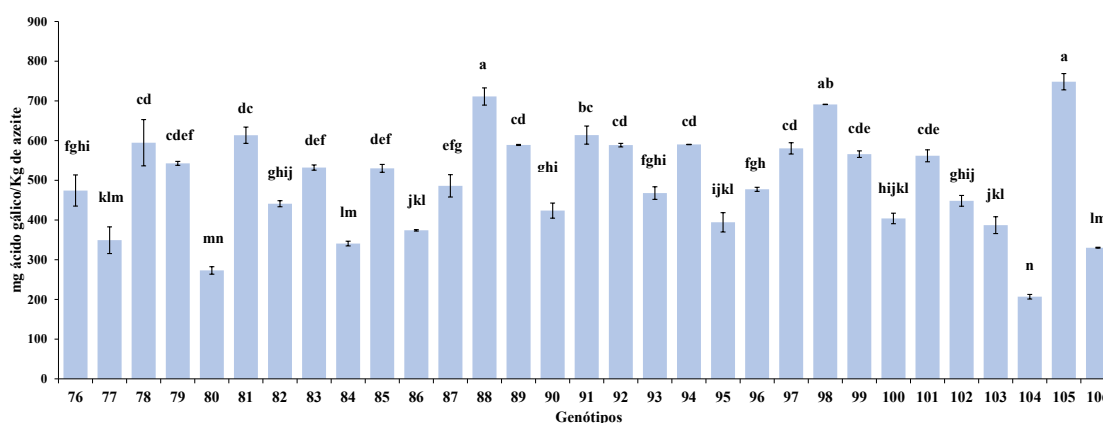


Figura 9 - Teor de fenóis totais nos diferentes genótipos, expresso em mg de ácido gálico por kg de azeite (mg ác. Gal./kg azeite). Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

Os valores obtidos apresentaram um valor médio de 494,0 mg ác. Gal./kg azeite. Entre os genótipos, verificou-se uma elevada variabilidade, com valores compreendidos entre 206,7 mg ác. Gal./kg azeite no genótipo 104 e 748,2 mg ác. Gal./kg azeite no genótipo 105, evidenciando diferenças estatísticas significativas.

A análise de variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas entre os genótipos (valor de $p < 0,001$). Observa-se que alguns genótipos, nomeadamente 88, 98 e 105, apresentaram os maiores valores de fenóis totais, superiores a 690,0 mg ác. Gal./kg azeite, indicando elevada atividade antioxidante. Em contraste, os genótipos 104 (206,7 mg ác. Gal./kg azeite) e 80 (273,0 mg ác. Gal./kg azeite) apresentaram os menores valores, demonstrando menor teor em fenóis totais.

Comparando com a literatura, os genótipos de referência Madural, genótipos 86 (373,9 mg ác. Gal./kg azeite), 96 (477,2 mg ác. Gal./kg azeite) e Verdeal, genótipo 92 (588,6 mg ác. Gal./kg azeite), apresentaram teores de fenóis totais ligeiramente superiores aos obtidos por Lamas et al., (2021) para estas mesmas variedades. Comparando os

valores de fenóis totais com os valores de DPPH, verifica-se que os genótipos 88, 98 e 105 apresentaram os teores mais elevados, em ambas as análises, indicando uma relação entre o teor de fenóis totais e DPPH.

4.5. Caracterização genética

A caracterização genética foi feita por comparação com uma base de dados genéticos do laboratório AgroBioTecnologia na qual estão validadas 6 variedades de oliveira: Verdeal, Madural, Cobrançosa, Negrinha, Arbequina e Picual. Por este motivo com base na análise por microssatélites apenas se conseguiu identificar alguns genótipos.

4.5.1. Frequências alélicas

As frequências alélicas indicam a abundância de cada um dos alelos (Tavares, 2007). Na população analisada foram identificados 55 alelos distribuídos por 11 microssatélites, o que sugere um nível considerável de diversidade de alelos dentro da população em estudo. As frequências alélicas variaram entre 0,016 e 0,968, revelando a coexistência de alelos raros, caracterizados por frequências alélicas inferiores a 5% (frequência $\leq 0,05$) (Alves, 2007) e alelos altamente frequentes. Esta amplitude de frequências alélicas demonstram que, embora alguns loci apresentem dominância acentuada de determinados alelos, outros mantêm uma distribuição mais equilibrada, refletindo uma estrutura genética heterogênea.

A presença de alelos raros (frequência $\leq 0,05$) foi observada em praticamente todos os loci, nomeadamente SSR1, SSR2, SSR4, SSR5, SSR6, SSR7, SSR8, SSR9, SSR10 e SSR11 (Tabela 12). Esta elevada proporção de alelos de baixa frequência podem ter resultado da ocorrência de mutações não difundidas na população em estudo, ou por pressões seletivas a que as oliveiras da região em estudo foram sendo expostas ao longo da sua história evolutiva e que foram moldando a diversidade genética (Floriano e Lipka, 2025). Ao contrário de variantes alélicas com maior frequência, a presença de alelos raros podem apresentar alguma especificidade ao nível da população (Floriano e Lipka, 2025).

Por outro lado, alguns loci apresentaram distribuição alélica menos uniforme, com predomínio de um único alelo. É o caso dos loci SSR6 (alelo 129 com frequência de 0,968), SSR3 (alelo 185 com 0,790), SSR2 (alelo 211 com 0,774), SSR7 (alelo 186 com 0,783) e SSR8 (alelo 194 com 0,565). Nestes casos, a forte dominância de um alelo pode refletir efeitos de deriva genética ou pressões seletivas naturais ou artificiais, que resultaram na fixação parcial ou total desses alelos em determinados loci.

Em contraste, os loci SSR1, SSR4, SSR9, SSR10 e SSR11 apresentaram uma distribuição mais equilibrada das frequências alélicas, com vários alelos de frequência intermediária. Estes loci são considerados altamente polimórficos e, portanto, mais informativos para estudos de diversidade genética. Em particular, o locus SSR1 mostrou frequências próximas entre os alelos 168 (0,355) e 178 (0,339), enquanto SSR4 e SSR10 exibiram múltiplos alelos com valores entre 0,100 e 0,400, evidenciando a manutenção de elevada variabilidade interna.

De forma geral, os resultados indicam que a população estudada apresenta elevada diversidade genética, ainda que com heterogeneidade entre loci. Alguns loci mostram sinais de fixação alélica, enquanto outros mantêm diversidade equilibrada, o que é característico de populações naturais com história genética complexa, sujeitas a diferentes pressões seletivas e processos de recombinação. A presença de alelos raros reforça a importância da conservação genética desta população, uma vez que tais variantes podem desempenhar um papel essencial na capacidade adaptativa da população face a alterações ambientais futuras.

Tabela 12- Frequências alélicas para cada um dos locus analisados e o tamanho dos respectivos alelos, em pares-base (pb).

Locus	Alelos (pb)	Frequência Alélica
SSR1	168	0,355
	170	0,129
	174	0,161
	178	0,339
	184	0,016
SSR2	211	0,774
	221	0,194
	223	0,016
	225	0,016
SSR3	185	0,790
	187	0,210
SSR4	122	0,065
	124	0,194
	145	0,016
	154	0,387
	160	0,016

Tabela 12- Frequências alélicas para cada um dos locus analisados e o tamanho dos respectivos alelos, em pares-base (pb) (continuação).

SSR4	165	0,016
	174	0,258
	178	0,048
SSR5	184	0,016
	190	0,016
	192	0,274
	198	0,210
	200	0,339
	217	0,145
SSR6	98	0,016
	129	0,968
	144	0,016
SSR7	165	0,200
	170	0,033
	179	0,017
	185	0,033
	186	0,717
SSR8	186	0,032
	192	0,242
	194	0,565
	196	0,016
	199	0,145
SSR9	110	0,032
	112	0,306
	114	0,194
	120	0,081
	122	0,194
	126	0,194
SSR10	161	0,250
	171	0,017
	183	0,117
	191	0,050
	193	0,233
	205	0,333

Tabela 12- Frequências alélicas para cada um dos locus analisados e o tamanho dos respectivos alelos, em pares-base (pb) (continuação).

SSR11	228	0,017
	236	0,333
	244	0,150
	246	0,117
	250	0,383
Nº total de alelos	55	

4.5.2. Estimativas da diversidade genética

Para caracterizar a diversidade genética das oliveiras, foram calculados vários índices de diversidade clássicos em marcadores do tipo microsatélite (SSR), nomeadamente: o número de alelos por locus (N_a), o número efetivo de alelos (N_e), a heterozigotia esperada (H_e) e a heterozigotia observada (H_o). Estes parâmetros têm sido amplamente adotados em estudos de diversidade genética com marcadores microsatélite (Gao et al., 2024; Liu et al., 2022).

4.5.2.1. Número de alelos por locus (N_a)

O número de alelos por locus mede o número de alelos diferentes identificados para cada locus na população em estudo. Diversos trabalhos dedicados à avaliação da diversidade genética com base na utilização de microsatélites, reportam frequentemente este parâmetro como parte integrante da caracterização da variabilidade genética (Gao et al., 2024; Liu et al., 2022). Este parâmetro reflete a diversidade genética da população. Quanto maior o valor de N_a , maior o número de variantes alélicas detetada o que indica maior potencial de variabilidade genética na população em estudo. No entanto, este parâmetro não reflete o equilíbrio entre as frequências alélicas: quanto existem muitos alelos, mas apenas um com alta frequência e os restantes muito raros, o contributo efetivo na caracterização da diversidade genética é menor.

O número de alelos (N_a) variou de 2 (SSR3) a 8 (SSR4) mostrando uma variação moderada a alta na riqueza alélica entre locus. Locus como SSR4, SSR5, SSR8, SSR10 mostraram ser os mais polimórficos (mais alelos) enquanto SSR3 e SSR6 apresentaram baixa diversidade alélica, com 2 e 3 alelos identificados, respetivamente, o que pode indicar regiões mais conservadas ou possível homozigosidade elevada.

4.5.2.2. Número efetivo de alelos (N_e)

O número efetivo de alelos (N_e) representa a diversidade alélica ponderada pelas frequências dos alelos, refletindo o número de alelos que contribuem de forma efetiva para a variabilidade genética de um locus. Este parâmetro tem em conta que alelos raros, com reduzida frequência alélica, têm um contributo reduzido para a diversidade total. Desta forma, reflete o equilíbrio entre as frequências dos alelos identificados para cada locus, e por isso, constitui uma medida de diversidade genética efetiva, independentemente do número total de alelos por locus previamente calculado. Por definição, N_e é inferior ou igual ao N_a , e quanto mais equilibradas forem as frequências alélicas, maior será o valor de N_e . Este parâmetro constitui, portanto, uma estimativa mais realista da diversidade genética “efetiva” dentro de cada locus (Gao et al., 2024).

O número efetivo de alelos (N_e) variou de 1,07 (SSR6) até 4,68 (SSR9) (Tabela 13). Valores mais altos foram detetados para os microssatélites SSR4, SSR5, SSR8 e SSR10, indicando maior equilíbrio na frequência dos alelos. Os valores mais elevados detetados para os referidos marcadores sugerem ainda que estes contribuem de forma mais significativa para a caracterização da diversidade genética da população em estudo. Valores de N_e mais baixos foram detetados para os microssatélites SSR6 (1,07) e SSR3 (1,5), o que indica uma assimetria acentuada na distribuição das frequências alélicas para os respetivos loci, reduzindo a diversidade efetiva, e por isso com menor capacidade de descrever a diversidade genética da população.

4.5.2.4. Heterozigotia esperada e observada

A heterozigotia esperada (H_e) representa a probabilidade de que dois alelos escolhidos ao acaso da mesma população sejam diferentes, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987). Valores de H_e próximos de 1 sugerem a presença de alta diversidade genética dentro da população, enquanto valores próximos de 0 indicam baixa variabilidade. Já a heterozigosidade observada (H_o) corresponde à proporção de indivíduos heterozigóticos detetados para um determinado locus, ou seja, quantos genótipos contêm dois alelos com tamanhos diferentes para um determinado locus em relação ao número total de genótipos.

A heterozigotia observada variou de 0,065 (SSR5) a 1,000 (SSR1, SSR5, SSR9, SSR11), com uma média de 0,720, enquanto a H_e variou entre 0,063 (SSR5) e 0,786 (SSR8), com uma média de 0,570 (Tabela 13). De forma geral, H_o apresentou valores superiores a H_e , o que sugere a presença de uma proporção de heterozigóticos acima do

que seria esperado, o que pode indicar que a população em estudo é composta por indivíduos geneticamente distintos, ou pertencentes a variedades diferentes.

Tabela 13- Estimativas da diversidade genética dos 31 genótipos selecionados.

	SSR1	SSR2	SSR3	SSR4	SSR5	SSR6	SSR7	SSR8	SSR9	SSR10	SSR11
N	31	31	31	31	31	31	30	31	31	30	30
Na	5	4	2	8	6	3	5	5	6	6	5
Ne	3,527	1,569	1,496	3,829	3,914	1,067	1,798	2,503	4,676	4,091	3,396
Ho	1,000	0,452	0,419	0,968	1,000	0,065	0,500	0,613	1,000	0,900	1,000
He	0,716	0,363	0,331	0,739	0,745	0,063	0,444	0,600	0,786	0,756	0,706

N, número de genótipos analisados para cada microssatélite; Na, número de alelos; Ne, número efetivo de alelos; Ho, heterozigotia observada; He, heterozigotia esperada.

4.5.3 Análise da estrutura genética

4.5.3.1. Structure

Para analisar a estrutura genética foi utilizado o programa Structure (Pritchard et al., 2000). Este software permite analisar todos os indivíduos, assinalando-os com uma percentagem de probabilidade a cada número de grupos (K) consideradas dentro da população. Para verificar qual o número de grupos (K) mais provável utilizou-se o teste de Evanno ΔK (Evanno et al., 2005).

Após a análise da Figura 10, relativo ao teste de Evanno ΔK , podemos afirmar que o ΔK ótimo foi conseguido quando $K=2$, valor alusivo ao pico mais alto ($\Delta K = 47,9$) (Anexo A 2), e por isso representativo da estrutura da população em estudo dividido em dois grupos genéticos principais.

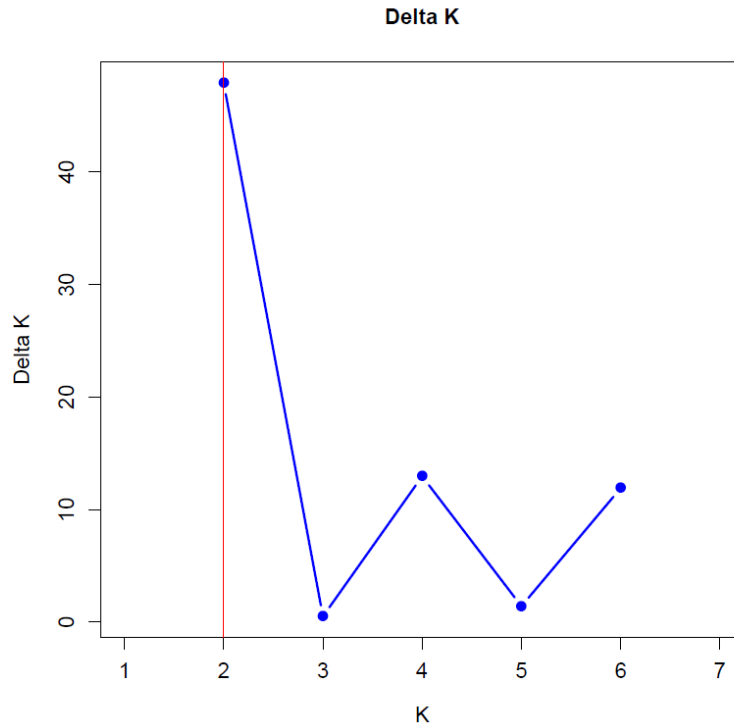


Figura 10- Valores de ΔK determinados para um número de grupos (K) de 1 a 6 da população de 31 genótipos de oliveira.

Após a análise da figura 11, podemos verificar a diferenciação da população de oliveiras para um $K=2$, com a divisão dos indivíduos em dois grupos, representados a cores vermelha e azul. Cada barra vertical representa um genótipo e cada cor representa um cluster genético (K), isto é, um grupo genético. A altura relativa das cores em cada barra indica a proporção de ancestralidade daquele indivíduo atribuída a cada cluster. O eixo vertical mostra a proporção genética (de 0 a 1), e o eixo horizontal representa cada um dos genótipos estudados (76 a 106).

Considerando um $K= 2$, são assumidas duas populações principais em que os indivíduos são divididos em dois grandes grupos (vermelho e azul). Para este valor de K , os genótipos foram distribuídos em dois grupos principais, observando-se ainda vários casos de genótipos com perfis genéticos intermédios, indicativos de mistura entre os dois grupos. Estes resultados sugerem que os genótipos aqui analisados não são geneticamente homogêneos e portanto, provavelmente composto por dois grupos principais com diferentes níveis de ancestralidade partilhada.

Ao aumentar o número de clusters para $K = 3$, é possível observar um terceiro grupo genético, revelando uma subestrutura dentro dos dois grupos anteriores, o que sugere que uma das populações contém diversidade interna. Para valores de K superiores,

ocorre fragmentação progressiva, com a formação de novos grupos que representam subpopulações adicionais. Com valores mais elevados de K, ocorre uma possível superestimação de estrutura da população em estudo, que podem refletir uma variação genética residual entre os genótipos.

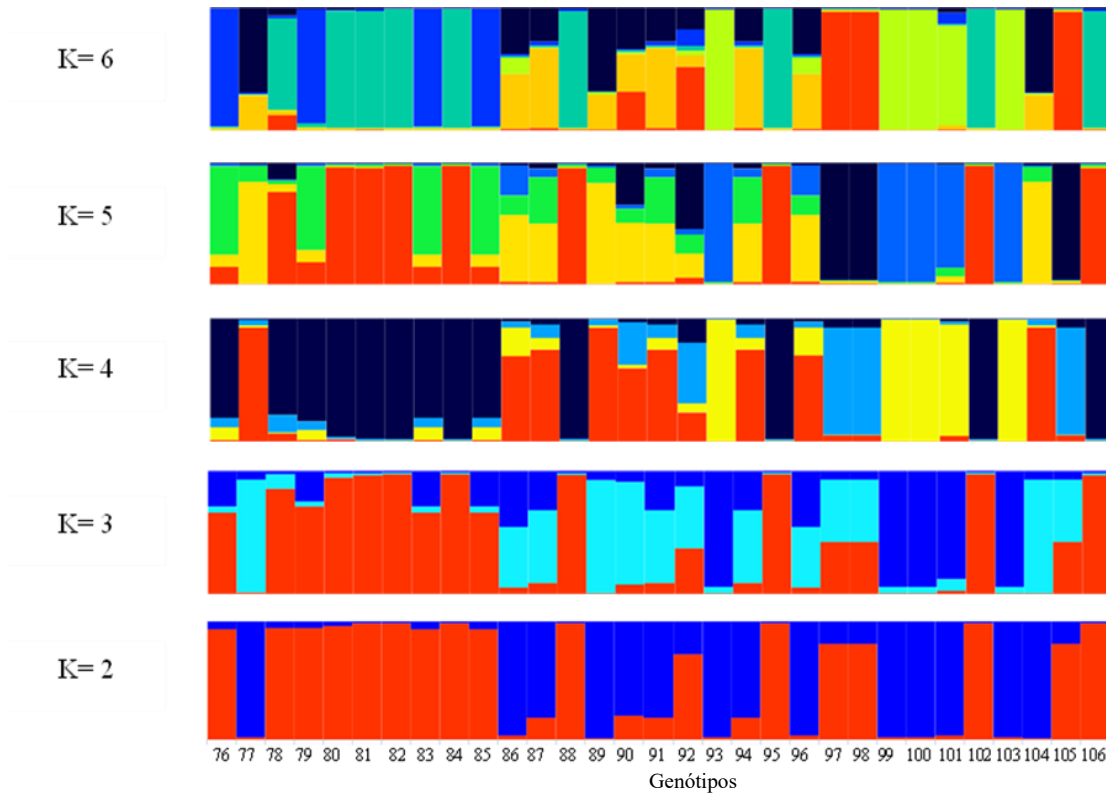


Figura 11- Estrutura populacional inferida pelo programa Structure para valores de K variando de 2 a 6.

4.5.3.2. Relações genéticas e agrupamento varietal

Os grupos, nos métodos hierárquicos, são vulgarmente representados por um diagrama bi-dimensional designado por dendrograma ou diagrama de árvore. O dendrograma foi construído a partir da matriz de distâncias genéticas com base no índice Jaccard.

A altura das ramificações (eixo Y) representa a distância genética, ou seja, o nível de dissimilaridade entre os indivíduos: quanto maior a altura, mais distante geneticamente são os grupos.

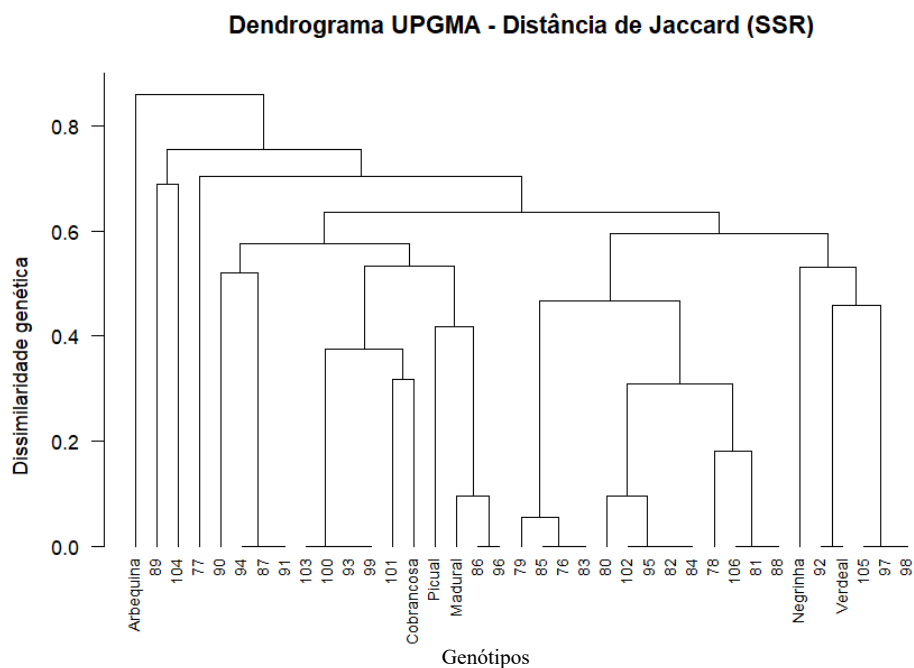


Figura 12- Dendrograma de agrupamento hierárquico baseado em distâncias genéticas, entre os genótipos analisados, com base no índice de Jaccard.

Observou-se que o genótipo 92 agrupou-se diretamente com a cultivar “Verdeal”, apresentando distância genética praticamente nula, o que confirma sua identidade com essa cultivar. É possível ainda observar que determinados grupos de genótipos, de que são exemplo o 102, 95, 82 e 84, devido à elevada semelhança a nível do perfil de alelos pertencem provavelmente à mesma cultivar.

As restantes amostras não se associaram diretamente a nenhuma das cultivares conhecidas, formando ramos separados ou grupos independentes, o que pode refletir divergência genética significativa, origem distinta ou a presença de cultivares locais não caracterizados. Esses resultados reforçam o potencial da população amostrada como fonte de diversidade genética, e destacam a importância de integrar análises moleculares e morfológicas para a confirmação da identidade varietal.

A identificação dos restantes genótipos será feita em colaboração com o Banco Mundial de Germoplasma de Oliveira (Córdoba) para comparação dos fragmentos obtidos com a base de dados mundial de modo a tentar identificar se estes pertencem a cultivares já conhecidas e caracterizadas ou se estamos na presença de cultivares distintas.



Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão e perspectivas futuras

A presente dissertação teve como principal objetivo a caracterização morfológica (folha, fruto e endocarpo), química e genética (por análise de microssatélites) de 31 exemplares de oliveiras centenárias localizados no concelho de Alfandega da Fé, região de forte tradição olivícola em Trás-os-Montes. A identificação e a valorização destes exemplares assumem grande importância não só pela sua relevância produtiva e cultural, mas sobretudo pelo seu contributo para a preservação da diversidade genética do património olivícola nacional.

A análise morfológica das folhas, frutos e endocarpos demonstrou uma elevada variabilidade entre os genótipos estudados. Quando consideradas em conjunto, estas características permitiram distinguir diferentes perfis morfológicos, ainda que não tenham sido suficientes para identificar inequivocamente todas as cultivares presentes. Entre os parâmetros analisados, o endocarpo revelou-se o parâmetro morfológico mais discriminante, contribuindo de forma significativa para a diferenciação entre os exemplares. Os parâmetros de qualidade dos azeites obtidos encontraram-se, de forma geral, dentro dos parâmetros obrigatórios para a categoria “azeite virgem extra”, evidenciando o potencial tecnológico e sensorial das variedades em estudo. Algumas amostras apresentaram valores próximos dos limites legais, o que reforça a necessidade de estudos complementares sobre os fatores agronómicos e ambientais que possam influenciar a composição química dos azeites em questão. A nível genético, os 11 loci utilizados neste estudo permitiram detetar 55 alelos nos 31 genótipos estudados, obtendo uma média de cinco alelos por locus. A elevada diversidade genética observada ao nível dos 31 genótipos foi confirmada pelos diversos parâmetros de diversidade calculados. No conjunto de loci analisados, seis (SSR9, SSR10, SSR5 e SSR4) apresentaram alta variabilidade genética, e por isso considerados mais informativos para descrever a diversidade genética existente na população em estudo. Estes marcadores moleculares destacaram-se pelo elevado número de alelos observados ($N_a \geq 6$), número efetivo de alelos ($N_e \geq 3,8$), e altos valores de H_e e H_o , o que sugere um elevado grau de polimorfismo e uma distribuição equilibrada das frequências alélicas. Por outro lado, os loci SSR3 e SSR6, apresentaram níveis de polimorfismo reduzidos e limitada capacidade para descrever de forma mais detalhada as diferenças genéticas entre os genótipos analisados.

Os resultados obtidos revelaram uma diversidade genética considerável, confirmada pelos índices de diversidade e pela presença de alelos raros, indicadores de

um património genético singular. A análise de estrutura populacional e o dendrograma hierárquico evidenciaram a existência de duas formações genéticas principais.

Foi possível identificar a correspondência genética de alguns exemplares com cultivares de referência, nomeadamente Madural e Verdeal, enquanto a maioria das amostras formou grupos independentes, sugerindo a presença de genótipos locais ainda não caracterizados. Estes resultados reforçam a hipótese de que o olival tradicional Transmontano constitui um importante reservatório de diversidade genética, com potencial para contribuir para programas de melhoramento e certificação varietal.

Dada a elevada variabilidade genética observada e o valor patrimonial dos exemplares estudados, torna-se essencial promover a conservação e valorização das oliveiras centenárias, quer como recurso genético, quer como elemento distintivo da paisagem e da identidade cultural de Trás-os-Montes. Recomenda-se a continuidade deste trabalho através da comparação dos perfis genéticos obtidos com bases de dados internacionais, como o Banco Mundial de Germoplasma de Oliveira (Córdoba), de modo a clarificar a identidade varietal dos genótipos não identificados e integrar este conhecimento em estratégias de proteção e certificação das cultivares autóctones.

Tendo em conta os resultados obtidos, considera-se pertinente dar continuidade a este estudo através da ampliação do número de amostras e da inclusão de exemplares provenientes de outros concelhos da região de Trás-os-Montes, de modo a obter uma visão mais abrangente da variabilidade genética existente. Recomenda-se igualmente a comparação dos perfis genéticos identificados com bases de dados internacionais de germoplasma, de forma a confirmar a identidade varietal e identificar possíveis novas cultivares autóctones. Seria também relevante complementar a caracterização morfológica com análises de metabolómica e genómica funcional, permitindo relacionar os perfis genéticos com características agronómicas e qualitativas dos azeites. A integração de métodos de fenotipagem digital e análise de imagem poderá ainda otimizar a identificação morfológica de cultivares.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- 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.
- Barranco, D.N., Fernandez-Escobar, R. & Rallo Romero, L. (2008). El cultivo del olivo (6a ed. revisada y ampliada). Mundi-Prensa.
- Böhm, J. (2013). O grande livro da oliveira e do azeite: Portugal oleícola. *Dinalivro*, Lisboa 100-134.
- Brito, C., Dinis, L.-T., Moutinho-Pereira, J. & Correia, C.M. (2019). Drought Stress Effects and Olive Tree Acclimation under a Changing Climate. *Plants*, 8, 232. <https://doi.org/10.3390/plants8070232>
- Carrão, H., Naumann, G. & Barbosa, P. (2016). Mapping global patterns of drought risk: An empirical framework based on sub-national estimates of hazard, exposure and vulnerability. *Global Environmental Change*, 39, 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.04.012>
- 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, 301-307. <https://doi.org/10.1007/s001220100691>
- 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, 223-228. <https://doi.org/10.1007/s001220100685>
- Chéu-Guedes, M.H., La Rubia, M.D., Sánchez, S., Ramos, N. & Pacheco, R. (2023). Characterization of Flavoured Olive Oils of ‘Madural’ Variety. *Processes*, 11, 205. <https://doi.org/10.3390/pr11010205>
- COI (2005). Conselho Oleícola Internacional. COI/T.20/Doc. no. 22 November 2005. Disponível online em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.20-Doc.-No-22-2005-Eng-1.pdf>. Acedido a 15 de julho de 2025.
- COI (2011). Conselho Oleícola Internacional. COI/OH/Doc. No 1 November 2011. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-OH-Doc.-1-2011-Eng.pdf>. Acedido a 20 de setembro de 2025.

- COI (2018). Conselho Oleícola Internacional. COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 10. Disponível online em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T20-Doc.-15-REV-10-2018-Eng.pdf>. Acedido a 2 de outubro de 2025.
- COI (2019). Conselho Oleícola Internacional. Disponível online em: <https://www.confagri.pt/comercioazeite-rota-crescimento-todo-mundo/>. Acedido a 20 de setembro de 2025.
- COI (2024). Conselho Oleícola Internacional. Disponível online em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2023/12/IOC-Olive-Oil-Dashboard.html#production-1>. Acedido a 20 de dezembro de 2024.
- Comissão Europeia (2020). *Olive Oil*. Disponível em: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/olive-oil_pt. Acedido a 23 de dezembro de 2024.
- Cordeiro, A., Inês, C. & Morais, N. (2014). Aspetos gerais da cultura da oliveira: principais cultivares de oliveira existentes em Portugal. Boas Práticas no Olival e no Lagar; INIAV, IP, Ed.; SIG—Sociedade Industrial Gráfica: Lisboa, Portugal 37–54.
- Correia, M. (2014). Clima e olivicultura. Potencialidades locais na região de Alvega. *GOT*, 5, 117–142. <https://doi.org/10.17127/got/2014.5.005>
- De Gennaro, B., Notarnicola, B., Roselli, L. & Tassielli, G. (2012). Innovative olive-growing models: an environmental and economic assessment. *Journal of Cleaner Production*, 28, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.11.004>
- DGAV. (2023) Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. *Registo Nacional de Variedades de Fruteiras*. Disponível online em: https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2023/01/DGAV_RNVF_01_2023.pdf. Acedido a 12 agosto de 2025.
- Dono, G., Cortignani, R., Dell’Unto, D., Deligios, P., Doro, L., Lacetera, N., Mula, L., Pasqui, M., Quaresima, S., Vitali, A. & Roggero, P.P. (2016). Winners and losers from climate change in agriculture: Insights from a case study in the Mediterranean basin. *Agricultural Systems*, 147, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.05.013>
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study*. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.

- FAOSTAT. (2023). Food and agriculture organization of the United Nations. Acedido a 28 de janeiro de 2024. Disponível online em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acedido a 20 de agosto de 2025.
- Fernandes, G. M. M. R. (2014). Caracterização morfológica e genética de cultivares de oliveiras centenárias e tradicionais para a obtenção de produtos diferenciados. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11449>
- Finicelli, M., Squillaro, T., Galderisi, U. & Peluso, G. (2021). Polyphenols, the Healthy Brand of Olive Oil: Insights and Perspectives. *Nutrients*, *13*, 3831. <https://doi.org/10.3390/nu13113831>
- Fraga, H., Moriondo, M., Leolini, L. & Santos, J.A. (2020a). Mediterranean Olive Orchards under Climate Change: A Review of Future Impacts and Adaptation Strategies. *Agronomy*, *11*, 56. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010056>
- Fraga, H., Pinto, J.G. & Santos, J.A. (2020b). Olive tree irrigation as a climate change adaptation measure in Alentejo, Portugal. *Agricultural Water Management*, *237*, 106193. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106193>
- Francis, R. M. (2017). Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol Ecol Resour*, *17*, 27–32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
- Gao, C., Chen, C., Liu, N., Liu, F., Su, X., Liu, C. & Huang, Q. (2024). Genetic Diversity and Association Analysis of Traits Related to Water-Use Efficiency and Nitrogen-Use Efficiency of *Populus deltoides* Based on SSR Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*, 11515. <https://doi.org/10.3390/ijms252111515>
- Gomes, S., Martins-Lopes, P. & Guedes-Pinto, H. (2012a). Olive Tree Genetic Resources Characterization Through Molecular Markers. Em M. Caliskan (Ed.), *Genetic Diversity in Plants*. InTech. <https://doi.org/10.5772/32973>
- GPP (2023). Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral *CULTIVAR: cadernos de análise e prospetiva*. N.º 28, junho de 2023: Estruturas agrárias. Lisboa: GPP, 2023. ISSN 2183-5624. Disponível em: <https://www.gpp.pt/index.php/publicacoes-gpp/cultivar-cadernos-de-analise-e-prospetiva>. Acedido a 6 de janeiro de 2025.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* *36*, 2090–2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>

- Hosseini-Mazinani, M., Mariotti, R., Torkzaban, B., Sheikh-Hassani, M., Ataei, S., Cultrera, N.G.M., Pandolfi, S. & Baldoni, L. (2014). High Genetic Diversity Detected in Olives beyond the Boundaries of the Mediterranean Sea. *PLOS ONE*, 9, e93146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093146>
- INE (2007). Estatísticas Agrícolas 2007. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P., 2007. Disponível online em: <https://www.ine.pt/xportal>. Acedido a 17 de janeiro de 2025.
- INE (2023) Estatísticas Agrícolas 2023. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística. 2024. Disponível online em url: <https://www.ine.pt/xurl/pub/439500127>. Acedido a 16 de janeiro de 2025.
- Inês, C., Arias-Calderón, R., Gomez-Jimenez, M.C. & Cordeiro, A.M. (2017a). Coleção Portuguesa de Referência de Cultivares de Oliveira (CPRCO): vigor vegetativo e produção de 31 cultivares na campanha de 2016/17. Livro de Resumos VIII Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas, Coimbra, 07-10 junho, p. 163. ISBN:978-972-8936-27-3.
- Inês, C. & Cordeiro A.M. (2017b). Como podem os recursos genéticos responder às necessidades de uma olivicultura moderna? (INIAV, I.P.). *Vida Rural* N.º 1831 pp. 36-38.
- Kalia, R., Rai, M., Kalia, S., Singh, R. & Dhawan, A. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, 309-334.
- Kostelenos, G. & Kiritsakis, A. (2017). Olive Tree History and Evolution, in: *Olives and Olive Oil as Functional Foods*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 1–12. <https://doi.org/10.1002/9781119135340.ch1>.
- Koubouris, G.C., Metzidakis, I.T. & Vasilakakis, M.D. (2009). Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.002>
- Lamas, S., Rodrigues, N., Peres, A.M. & Pereira, J.A. (2022). Azeites aromatizados e fortificados — Prós e contras. *Trends Food Sci. Technol.*, 124, 108–127. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.013>
- Larbi, A., Vázquez, S., El-Jendoubi, H., Msallem, M., Abadía, J., Abadía, A. & Morales, F. (2015). Canopy light heterogeneity drives leaf anatomical, eco-physiological, and photosynthetic changes in olive trees grown in a high-density plantation.

Photosynthesis Research, 123, 141–155 <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0052-2>

- Leitão, F.A., Potes, M.F, Calado, M.L. & Almeida, F.J. (1986). Descrição de 22 Cultivares de Oliveira Cultivadas em Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Direcção - Geral de Planeamento e Agricultura, Lisboa, pp.18 - 102.
- Li, N., Yang, Y., Xu, F., Chen, X., Wei, R., Li, Z., Pan, W. & Zhang, W. (2022). Genetic Diversity and Population Structure Analysis of *Castanopsis hystrix* and Construction of a Core Collection Using Phenotypic Traits and Molecular Markers. *Genes (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/genes13122383>
- Li, Y.L. & Liu, J.X. (2018) StructureSelector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18:176–177
- Lopes, J.I., Arrobas, M., Raimundo, S., Gonçalves, A., Brito, C., Martins, S., Pinto, L., Moutinho-Pereira, J., Correia, C.M. & Rodrigues, M.Â. (2022). Photosynthesis, Yield, Nutrient Availability and Soil Properties after Biochar, Zeolites or Mycorrhizal Inoculum Application to a Mature Rainfed Olive Orchard. *Agriculture*, 12, 171.
- Maia, F. M. G. (2014). Estudos de estabilidade oxidativa em azeites monovarietais. https://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/2604/1/TM_FERNANDO_MAIA.pdf
- Malheiro, R., Casal, S., Paptista, P. & Pereira, J.A. (2015) Physico-chemical characteristics of olive leaves and fruits and their relation with *Bactrocera oleae* (Rossi) cultivar oviposition preference. *Scientia Horticulturae*, 194, 208-214 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.017>
- Mariotti, R., Belaj, A., De la Rosa, R., Muleo, R., Cirilli, M., Forgione, I., Valeri, M.C. & Mousavi, S. (2023). Genealogical tracing of *Olea europaea* species and pedigree relationships of var. *europaea* using chloroplast and nuclear markers. *BMC Plant Biology*, 23, 452.
- Marques, A. (2018). Análise Técnico-Financeira de um Olival em Dois Modos de Produção Diferentes: Biológico e Convencional. Tese de Mestrado em Gestão de Empresas Agrícolas Coimbra. Instituto Politécnico de Coimbra: Instituto Superior de Contabilidade e Administração de Coimbra.
- Martínez, J.B. (2017) caracterización morfológica y molecular de variedades italianas de olivo (*Olea europaea* L.) instaladas en el jardín de introducción de inia las brujas.

- MiPAAF, I. (2010). La discussione sul futuro della Pac: quadro comunitario e interessi dell'Italia. Roma, Ottobre.
- Mohanty, P., Singh, P.K., Chakraborty, D., Mishra, S. & Pattnaik, R. (2021). Insight Into the Role of PGPR in Sustainable Agriculture and Environment. *Front. Sustain. Food Syst.*, 5, 667150. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667150>
- Monteiro, M. A. (1999). A oliveira: Património Natural Transmontana.
- Moreira, P.M.R.M. & Veloso, M.M. (2009). Landraces inventory for Portugal. In European Landraces: On Farm Conservation, Management and Use, 1st ed.; Vetelainen, M., Negri, V., Maxted, N., Eds.; Bioersity Technical Bulletin No. 15; Bioersity International: Rome, Italy, 124–136, ISBN 978-92-9043-805-2.
- Muluneh, M.G. (2021). Impact of climate change on biodiversity and food security: a global perspective—a review article. *Agric & Food Secur*, 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s40066-021-00318-5>
- Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, p. 254-286.
- Nguyen, T., Mula, L., Cortignani, R., Seddaiu, G., Dono, G., Viridis, S., Pasqui, M. & Roggero, P. (2016). Perceptions of Present and Future Climate Change Impacts on Water Availability for Agricultural Systems in the Western Mediterranean Region. *Water*, 8, 523. <https://doi.org/10.3390/w8110523>
- Oliveira, A.M., Calado, M.L., Oliveira, N., Oliveira, A. & Carvalho, M.T. (2010). Variedades de Oliveira: '*Galega Vulgar*'; Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro: Castelo Branco, Portugal. Disponível online em: https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/018_variedades_oliveira_galega_vulgar_nov10.pdf . Acedido a 16 de dezembro de 2024
- Özcan, M.M. & Matthäus, B. (2017). A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Eur Food Res Technol*, 243, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2726-9>
- Ozturk, T., Ceber, Z.P., Türkeş, M. & Kurnaz, M.L. (2015). Projections of climate change in the Mediterranean Basin by using downscaled global climate model outputs. *Intl Journal of Climatology*, 35, 4276–4292. <https://doi.org/10.1002/joc.4285>
- Peakall, R. & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. 6.4 Molecular Ecology Notes. 6, 288 - 295.

- Peres, A. M., Baptista, P., Malheiro, R., Dias, L. G., Bento, A. & Pereira, J. A. (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, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.11.001>
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M. & Beltrán, R. (2013). Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Analytical Methods*, 6, 123–132. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9420-8>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). *Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics*, 155, 945–959.
- Rallo, L., Barranco, D., Castro-García, S., Connor, D.J., Gómez del Campo, M. & Rallo, P. (2013). High-Density Olive Plantations. *Horticultural Reviews*, 41, 303–384. <https://doi.org/10.1002/9781118707418.ch07>
- Rallo, L., Díez, C.M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F. & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034>
- Ramos-Román, M.J., Jiménez-Moreno, G., Anderson, R.S., García-Alix, A., Camuera, J., Mesa-Fernández, J.M. & Manzano, S. (2019). Climate controlled historic olive tree occurrences and olive oil production in southern Spain. *Global and Planetary Change*, 182, 102996. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2019.102996>
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. & Trujillo, I. (2018). Genotypic and phenotypic identification of olive cultivars from north-western Spain and characterization of their extra virgin olive oils in 62 terms of fatty acid composition and minor compounds. *Scientia Horticulturae*, 232, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.015>
- Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão, de 29 de julho de 2022, que estabelece as regras relativas aos controlos de conformidade das normas de comercialização do azeite e aos métodos de análise das características do azeite. *Jornal oficial* L284, pp. 23-48. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R2105&from=PT>
- Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 da Comissão, de 29 de julho de 2022, que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante às normas de comercialização do azeite e que revoga o

- Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão e o Regulamento de Execução (UE) n.º 29/2012 da Comissão. Jornal oficial L284, pp. 1-22. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2022/2104/oj?locale=pt
- Reis, P. (2014). O olival em Portugal dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural. Animar/Projecto RURANIMAR, Ed.
- Rodrigues, N. (2018) Characterization of wild and centenarian olive trees for their valorisation. Universid de Léon, 1-246
- Rodrigues, N., Baptista, P., Casal, S. & Pereira, J. A. (2018). Azeites de Portugal—Guia 2018. Cv. Santulhana - Uma cultivar de oliveira a redescobrir, 58, 56–57.
- Rodrigues, N., Casal, S., Peres, A.M., Baptista, P. & Pereira, J.A. (2020). Seeking for sensory differentiated olive oils? The urge to preserve old autochthonous olive cultivars. *Food Research International*, 128, 108759. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108759>
- Rodrigues, N., Peres, A.M., Baptista, P. & Pereira, J.A. (2022). Olive Oil Sensory Analysis as a Tool to Preserve and Valorize the Heritage of Centenarian Olive Trees. *Plants*, 11, 257. <https://doi.org/10.3390/plants11030257>
- Rodríguez Díaz, J.A., Weatherhead, E.K., Knox, J.W. & Camacho, E. (2007). Climate change impacts on irrigation water requirements in the Guadalquivir River basin in Spain. *Reg Environ Change*, 7, 149–159. <https://doi.org/10.1007/s10113-007-0035-3>
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonça, D., Santos, M.R.D, Machado, M.L.D.C. & Machado, A.D.C. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9, p. 1171–1173. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00954.x>
- Soares, I. & Dias, F. (2024). O Potencial de Regeneração do Património Olivícola em Portugal com Suporte no Turismo Criativo. *Rev. Port. de Estud. Reg.*, 68, 29–46. <https://doi.org/10.59072/rper.vi68.603>
- Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A. & Pereira, J. A. (2014). Antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrançosa olives affected through the maturation process. *Journal of Functional Foods*, 11, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.024>
- Tanasijevic, L., Todorovic, M., Pereira, L.S., Pizzigalli, C. & Lionello, P. (2014). Impacts of climate change on olive crop evapotranspiration and irrigation requirements in

- the Mediterranean region. *Agricultural Water Management*, 144, 54–68.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.05.019>
- 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.
- Tous, J., Romero, A. & Plana, J. (1998). IRTA-18 clone da variedade de azeite 'Arbequina' selecionada pelo IRTA. *Agricultura*, 788, 224–225.
- Agustí, M (2004). Fruticultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 493
- UPOV (2011). -International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability. https://www.upov.int/upov_collection/en/
- Vilar, J., Santos, P., Caño, S., Caldeira, B., Dias, P. & Rosário, L. (2023). Alentejo: A liderar a olivicultura moderna internacional. Relatório Final.

Anexos

Anexo A 1- Coordenadas dos genótipos selecionados na região de Alfândega da Fé.

Genótipo	Coordenada
76	41.3596052; -7.0871499
77	41.3424923; -7.0517417
78	41.3423911; -7.0521558
79	41.3422149; -7.0521162
80	41.3417293; -7.0519402
81	41.3417099; -7.0520948
82	41.3498244; -7.048623
83	41.349811; -7.0488061
84	41.3494224; -7.0489362
85	41.1558021; -7.2136593
86	41.1557677; -7.213486
87	41.1546883; -7.2132416
88	41.1546315; -7.2131111
89	41.1545548; -7.212972
90	41.1554383; -7.2142249
91	41.1552838; -7.2144952
92	41.1516266; -7.2153971
93	41.1514815; -7.2154333
94	41.1515029; -7.2153602
95	41.1511495; -7.2158634
96	41.2899810; -6.9957355
97	41.2961469; -7.0096841
98	41.2959444; -7.0093931
99	41.2932562; -7.0088639
100	41.2932153; -7.0086130
101	41.2928207; -7.0098356
102	41.2931369; -7.0100096
103	41.2930870; -7.0100912
104	41.2907185; -6.9996518
105	41.2907392; -6.9998788
106	41.2948529; -7.0042084

Anexo A 2- Valores relativos ao teste de Evanno ΔK .

DeltaK:

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	20	-779.95000	0.89648	NA	NA	NA
2	20	-712.91500	0.85856	67.03500	41.13500	47.91141
3	20	-687.01500	0.76384	25.90000	0.39000	0.51058
4	20	-660.72500	1.36955	26.29000	17.75000	12.96049
5	20	-652.18500	9.89164	8.54000	14.03000	1.41837
6	20	-657.67500	11.15257	-5.49000	132.73000	11.90129
7	20	-795.89500	513.37290	-138.22000	NA	NA