

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CAMPUS FREDERICO WESTPHALEN  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: AGRICULTURA  
E AMBIENTE

Julie dos Santos

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO*  
DE DUAS CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Frederico Westphalen, RS  
2018

**Jullie dos Santos**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DUAS  
CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Schmidt

Frederico Westphalen, RS  
2018

dos Santos, Jullie  
Otimização de protocolo de estabelecimento in vitro de  
duas cultivares de oliveira / Jullie dos Santos.- 2018.  
59 p.; 30 cm

Orientadora: Denise Schmidt  
Coorientador: Marcos Vinícius Marques Pinheiro  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós  
Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2018

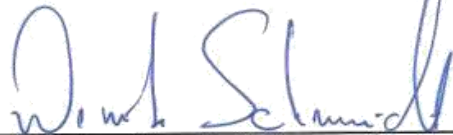
1. Olea europaea 2. Assepsia 3. Citocinina 4. Oxidação  
5. Antioxidantes I. Schmidt, Denise II. Pinheiro, Marcos  
Vinícius Marques III. Título.

**Jullie dos Santos**

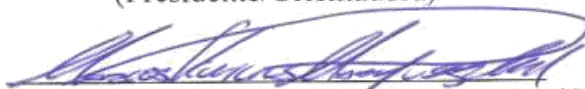
**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DUAS CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

**Aprovado em 02 de março de 2018:**



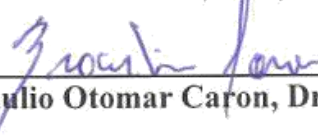
**Denise Schmidt, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



**Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Dr. (UFSM)**  
(Co-orientador)



**Cleber Witt Saldanha, Dr. (DDPA - SEAPI)**



**Bráulio Otomar Caron, Dr. (UFSM)**

## DEDICATÓRIA

*A Deus pela bênção da vida, pelo amparo e proteção. A minha mãe, Teresinha, por ser minha  
inspiração de força, luta e perseverança, pelo amor e doação a mim dispensados que me  
fizeram fortalecida até hoje,*

*DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

Para que este trabalho se tornasse concreto e real o auxílio, dedicação e compreensão de muitas pessoas fizeram-se necessários, deixo meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a execução e conclusão deste estudo e de maneira especial agradeço:

- a Deus por ter me concedido saúde, força e determinação para a realização deste trabalho, e por ter tranquilizado o meu espírito nos momentos mais difíceis da minha trajetória até então;

- a minha mãe pelo amor, compreensão, paciência, dedicação e principalmente pelo apoio em todos os momentos e por nunca deixar de acreditar na minha capacidade;

- a minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Denise Schmidt pela orientação, oportunidade, suporte e amizade, mas principalmente pela confiança em mim depositada durante estes dois anos de estudo;

- ao meu co-orientador Dr. Marcos V. M. Pinheiro pela orientação, correções, apoio e dedicação;

- ao Prof. Dr. Bráulio O. Caron pela amizade, suporte, conselhos e orientações;

- ao Prof. Dr. Nilton C. Mantovani pela indicação, colaboração e amizade;

- a Universidade pública, gratuita e de qualidade (UFSM) pela oportunidade de realização e concretização deste estudo;

- ao CNPq pelo consentimento da bolsa de estudos;

- a minha avó Elza M. dos Santos (*in memorian*) e minha tia Lucia Maria Lübke pela ajuda prestada, estímulo e amor;

- aos meus amigos pelas longas conversas e risadas no postinho, mas principalmente porque souberam compreender as minhas ausências, me apoiar, incentivar e torcer por mim;

- aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Extrativos Aromáticos pela compreensão, cumplicidade e disposição em me atender;

- aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Agricultura e Ambiente pela contribuição e suporte para a conquista deste título.

MUITO OBRIGADA!

*Quem olha para baixo  
vê o mundo do tamanho dos seus passos.*

*Quem olha para o alto  
vê o mundo espetacularmente grande,  
um mundo de oportunidades a ser explorado.*

*Augusto Cury.*

## RESUMO

### OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DUAS CULTIVARES DE OLIVEIRA

AUTORA: Jullie dos Santos  
ORIENTADORA: Denise Schmidt

O amplo consumo dos produtos da oliveira, a azeitona de mesa e o azeite de oliva, têm demonstrado que a espécie possui elevado potencial, atraindo o interesse de produtores nacionais e internacionais. Para isso, a cultura de tecidos vegetais apresenta-se como uma técnica viável de produção de mudas em curto tempo e espaço, garantindo homogeneidade e qualidade fitossanitária das plantas produzidas, além de ser uma oportunidade de aperfeiçoar os processos de melhoramento genético e propagação desta espécie. Porém plantas lenhosas como a oliveira apresentam dificuldades no estabelecimento *in vitro* devido principalmente à contaminação e oxidação, o que torna necessária a adoção de técnicas eficientes de assepsia e controle da oxidação dos explantes nessas condições. Dessa forma o objetivo do primeiro experimento foi desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais de duas cultivares de oliveira desinfestados em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, isolados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3x3, sendo duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki), três concentrações de hipoclorito de sódio (0,6; 0,8 e 1,0% de cloro ativo) e três concentrações de BAP (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) totalizando 18 tratamentos. Conforme os resultados foi possível observar que os tratamentos testados neste experimento não foram eficientes no estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. Arbequina, entretanto a concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP e a concentração de hipoclorito de sódio 1 % cloro ativo, utilizada na desinfestação dos explantes, são ideais para o estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. Koroneiki. O segundo experimento objetivou avaliar os efeitos de diferentes agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de oliveira cvs. Koroneiki e Arbequina. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x3, sendo duas cultivares (Arbequina e Koroneiki) e três agentes antioxidantes (PVP; carvão ativado e ácido ascórbico), constituindo 6 tratamentos. Os resultados aos 21 dias após isolamento permitiram concluir que a cultivar Arbequina é menos susceptível a oxidação em comparação a Koroneiki e que o antioxidante ácido ascórbico na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> demonstrou-se eficiente no controle da oxidação de explantes de oliveira cvs. Arbequina e Koroneiki.

Palavras-chave: *Olea europaea*. Assepsia. Citocinina. Oxidação. Antioxidantes.



## ABSTRACT

### OPTIMIZATION OF AN IN VITRO ESTABLISHMENT PROTOCOL OF TWO OLIVE TREE CULTIVARS

AUTHOR: Jullie dos Santos

ADVISER: Denise Schmidt

The wide consumption of olive products, table olives and olive oil have shown that the species has a high potential, attracting the interest of national and international producers. For this, plant tissue culture is a viable technique for the production of seedlings in short time and space, guaranteeing homogeneity and phytosanitary quality of the plants produced, besides being an opportunity to improve the processes of genetic improvement and propagation of this species. However, woody plants like the olive tree present difficulties in the in vitro establishment due mainly to the contamination and oxidation, which makes it necessary to adopt efficient techniques of asepsis and control of the oxidation of explants under these conditions. The objective of the first experiment was to develop an in vitro establishment protocol from nodal segments of two olive cultivars desinfestation different concentrations of sodium hypochlorite isolated in WPM medium supplemented with different concentrations of BAP (6-benzylaminopurine). The experiment was conducted on completely randomized design, in a triple factorial scheme (2x3x3), two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki), three concentrations of sodium hypochlorite for the decontamination of the explants (0,6; 0,8 and 1,0% active chlorine) and three BAP concentrations (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) totalizing 18 treatments. According to the results, it was possible to observe that the treatments tested in this experiment were not efficient in the in vitro establishment of olive cv. Arbequina, however the concentration of 2,22  $\mu\text{M}$  of BAP and the concentration of sodium hypochlorite 1 % active chlorine, used in desinfestation of the explants, are ideal for the in vitro establishment of olive cv. Koroneiki. The second experiment objected evaluate the effects of different antioxidant agents in the in vitro establishment of olive cvs. Koroneiki and Arbequina. The experiment was conducted on completely randomized design, in factorial scheme (2x6), two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki), three concentrations of sodium hypochlorite for the decontamination of the explants (0,6; 0,8 and 1,0% active chlorine), totalizing 12 treatments. The results at 21 days after isolation allowed to conclude that cultivar Arbequina is less susceptible to oxidation compared to Koroneiki and the antioxidant ascorbic acid at the concentration of 1 g L<sup>-1</sup> was shown to be efficient in controlling the oxidation of olive explants cvs. Arbequina and Koroneiki.

Keywords: *Olea europaea*. Asepsis. Cytokinin. Oxidation. Antioxidants.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para desenvolver protocolo de estabelecimento *in vitro* de cultivares de *Olea europaea*.....35

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Agentes oxidantes adicionados ao meio de cultura WPM no controle da oxidação *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).....49

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1 - Porcentagem de contaminação fúngica (A), porcentagem de oxidação (B) e porcentagem de sobrevivência (C) de cultivares de *Olea europaea* durante o estabelecimento *in vitro*.....36

Figura 2 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de cultivares de *Olea europaea* L. submetidas a diferentes concentrações de BAP (A) e hipoclorito de sódio (B).....37

Figura 3 - Teste de Kruskal Wallis para os dados de somatório de contaminação fúngica (A), somatório de oxidação (B) e somatório de sobrevivência/estabelecimento (C) de segmentos nodais de cultivares de *Olea europaea* L. *in vitro*.....38

Figura 4 - Explantes de *Olea europaea in vitro* cv. Koroneiki: estabelecido (A), sobrevivente (B), 50 % oxidado (C) e (D) 100 % oxidado.....39

### ARTIGO 2

Figura 1 - Porcentagem de oxidação em explantes de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea*), cultivados *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes agentes antioxidantes, aos 7 DAI, 14 DAI e 21 DAI.....50

Figura 2 - Explantes de oliveira (*Olea europaea*) cvs. Arbequina e Koroneiki cultivadas *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (A.A 5) e a 20 g L<sup>-1</sup> de PVP (A.A 2) aos 21 DAI.....51

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE .....	15
<b>2.1.1 Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.)</b> .....	15
2.2 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE .....	16
2.3 CULTIVARES .....	18
<b>2.3.1 Arbequina</b> .....	18
<b>2.3.2 Koroneiki</b> .....	18
2.4 PRODUÇÃO DE MUDAS DE OLIVEIRA ( <i>Olea europaea</i> L.) .....	19
2.5 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS .....	19
<b>2.5.1 Etapas da cultura de tecidos</b> .....	20
2.5.1.1 Estabelecimento .....	20
2.5.1.1.1 Desinfestação .....	20
2.5.1.1.2 Oxidação fenólica .....	21
2.5.1.2 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	22
2.5.1.2.1 Fitorreguladores de crescimento .....	22
2.5.1.3 Enraizamento .....	23
2.5.1.4 Aclimatização .....	23
2.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE OLIVEIRA ( <i>Olea europaea</i> L.) .....	24
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
<b>3 ARTIGO 1: ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE OLIVEIRA “ARBEQUINA” E “KORONEIKI”</b> .....	30
3.1 RESUMO .....	30
3.2 ABSTRACT .....	30
3.3 INTRODUÇÃO .....	31
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
<b>3.4.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo</b> .....	33
<b>3.4.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas</b> .....	34
3.5 RESULTADOS .....	35
3.6 DISCUSSÃO .....	39
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
<b>4 ARTIGO 2: REDUÇÃO DA OXIDAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA cvs. “ARBEQUINA” E “KORONEIKI”</b> .....	45
4.1 RESUMO .....	45
4.2 ABSTRACT .....	45

4.3 INTRODUÇÃO.....	46
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
<b>4.4.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2 Análise Estatística.....</b>	<b>48</b>
4.5 RESULTADOS .....	49
4.6 DISCUSSÃO .....	52
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
<b>5 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie perene pertencente à família Oleaceae cultivada e apreciada mundialmente, inclusive no Brasil, pela relevância de seus produtos, a azeitona e o azeite de oliva (SOUZA et al., 2012). Estudos recentes comprovam os efeitos benéficos do azeite de oliva para saúde, principalmente no tratamento de doenças cardiovasculares e na confecção de produtos farmacêuticos (SANTOS et al., 2015).

No Brasil os estudos sobre olivicultura iniciaram na década de 1940, porém alavancaram no ano 2000, devido a estudos de zoneamento agroclimático e econômico realizados pelo Ministério da Agricultura, que definiram as regiões brasileiras com características adequadas para o plantio de oliveira em longa escala (MELLO & PINHEIRO, 2012). Atualmente, estes plantios já em fase de produção e beneficiamento de azeitona, concentram-se principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina (COUTINHO et al., 2015). Entre as cultivares mais plantadas no Brasil estão a cultivar espanhola Arbequina considerada de expressiva importância devido ao seu vigor vegetativo, precocidade, alto rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças. Também há a cultivar de origem grega Koroneiki, resistente a seca, com produtividade elevada e constante (SANTOS et al., 2015). Apesar da crescente demanda pelos produtos da oliveira, a olivicultura no Brasil ainda carece de manejos adequados e conhecimento por técnicas modernas de formação e condução dos plantios (DONINI et al., 2008).

A propagação de oliveira geralmente ocorre através de métodos assexuados, principalmente para evitar a segregação genética e a longa fase juvenil de plantas originadas por sementes (SOUZA et al., 2012). A cultura de tecidos vegetais surge como uma alternativa promissora por proporcionar a produção de mudas com elevada qualidade fitossanitária em larga escala e em tempo e espaço reduzidos, além de permitir o armazenamento de recursos genéticos de plantas através da formação de bancos de germoplasma *in vitro* (BEZERRA et al., 2014).

No entanto, procedimentos e técnicas adotadas durante o estabelecimento *in vitro* como condição da planta matriz, tempo de manipulação do material vegetal, vigor dos explantes e a imersão destes em soluções desinfestantes são fatores que podem influenciar esta fase (PELIZZA et al., 2013), na qual a ocorrência de contaminação e oxidação fenólica são os maiores comprometedores. Os principais contaminantes que afetam o sucesso da

cultura de tecidos são geralmente fungos e bactérias, para isso são utilizadas substâncias com ação germicida a base de cloro como hipoclorito de sódio e cálcio, além de etanol e detergentes, a fim de eliminar impurezas e detritos trazidos do meio externo (PELIZZA et al., 2013).

A oxidação fenólica, outro entrave enfrentado na cultura de tecidos, principalmente quando se trata de espécies lenhosas, devido à liberação de compostos fenólicos tóxicos como fenóis, flavonoides e taninos capazes de comprometer o crescimento do explante (MELO et al., 2001). No controle desse efeito substâncias com ação antioxidante são comumente empregadas junto ao meio de cultura ou na lavagem do material vegetal antes do isolamento. Essas substâncias possuem a capacidade de adsorver as substâncias oxidantes presentes no meio ou acumuladas em torno das extremidades excisadas dos explantes.

A composição do meio de cultura bem como a concentração de fitorreguladores adicionada a ele é de fundamental importância, pois têm o papel de estimular os propágulos a responderem ao que se espera, haja vista que o crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pelo balanço e interação entre os reguladores de crescimento no meio nutritivo (BEZERRA et al., 2014). As citocininas são fitorreguladores que influenciam diretamente na expansão foliar, quebra de dominância apical e formação de gemas adventícias, sua concentração vai variar de acordo com a necessidade da espécie estudada e seu nível hormonal endógeno (BEZERRA et al., 2014).

A geração de conhecimentos destinados à evolução da olivicultura no Brasil relacionados à produção de mudas, manejo e condução dos pomares, nutrição e adubação, controle de pragas e doenças, pós-colheita e processamento dos frutos é de fundamental importância, visando a produção de cultivares adaptadas às diversas condições ambientais brasileiras, dessa forma, o cultivo *in vitro*, como metodologia moderna, assume papel importante neste processo (CANÇADO et al., 2010).

Diante do contexto realizou-se o presente estudo objetivando determinar um protocolo de estabelecimento *in vitro* para duas cultivares de oliveira, Arbequina e Koroneiki, para fins de micropropagação. Para tanto foram formuladas as seguintes hipóteses:

- As cultivares de oliveira, Arbequina e Koroneiki, apresentam dificuldade de estabelecimento *in vitro*;
- O estabelecimento *in vitro* de oliveira, cvs. Arbequina e Koroneiki é influenciado pela concentração do agente descontaminante aplicado;

- O regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) facilita o estabelecimento e estimula a multiplicação *in vitro* de oliveira, cvs. Arbequina e Koroneiki, favorecendo sua propagação;
- A adição de agentes antioxidantes ao meio de cultura reduz a ocorrência de oxidação fenólica *in vitro* em oliveira, cvs. Arbequina e Koroneiki, favorecendo a sobrevivência e estabelecimento dos explantes.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

#### 2.1.1 Oliveira (*Olea europaea* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie da família botânica Oleaceae da qual pertencem cerca de 30 gêneros, incluindo *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Syringa* e *Olea* (PIO et al., 2005); sendo este último, constituído por aproximadamente 35 espécies (COUTINHO et al., 2009). Árvore perenifólia, com altura que pode variar de 7 a 11 m, tronco ereto e cilíndrico, com casca fissurada longitudinalmente e de coloração acinzentada. Ramos longos e oblíquo, formando copa aberta e arredondada. Folhas simples, alternas, coriáceas, lanceoladas, com superfície superior verde-escura e a inferior prateada, com dimensões de 3,5 - 6,0 cm de comprimento por cerca de 1 cm de largura, com pecíolo de menos de 0,5 cm. A inflorescência é em panícula axilar curta, com flores brancas, suavemente perfumadas (LORENZI et al., 2003). A Oliveira é a única espécie da família oleaceae que produz frutos comestíveis (COUTINHO et al., 2015). Seus frutos, as azeitonas, são drupáceos elipsoides, de 1,5-3,0 cm de comprimento, polpa amarga, contendo uma única semente (LORENZI et al., 2003) usadas para consumo *in natura* (azeitona de mesa) e para produção de azeite (WREGE et al., 2009); um líquido amarelo-esverdeado, transparente e aromático, utilizado desde a antiguidade como ingrediente na culinária (MELLO & PINHEIRO, 2012); devido ao processo de extração, geralmente por prensagem mecânica, o azeite de oliva é considerado um produto natural de alta qualidade.

Trata-se de uma planta de cultivo tão antigo quanto o trigo e a videira (MELLO & PINHEIRO, 2012); tendo seus primeiros registros cerca de quatro mil anos a.C., na região do Mar Morto, região geográfica que vai desde o sul do Cáucaso até as planícies do Irã, Palestina e zona costeira da Síria (VILLA et al. 2010); expandindo-se pela bacia do Mediterrâneo. Atualmente a espécie é cultivada em todos os continentes (OLIVEIRA et al., 2010); incluindo o Norte da África, Américas do Sul e do Norte e alguns países da Ásia (WREGE et al., 2009).

Para que a expansão da olivicultura no Brasil se torne realidade, é necessário realizar um estudo aprofundado a fim de conhecer aspectos básicos que envolvam o desenvolvimento

da espécie, como por exemplo, a adaptabilidade fora do seu centro de origem (MARTINS et al., 2012).

A oliveira tem seu desenvolvimento variável dependendo da cultivar e o meio em que cresce (CAPELLARO, 2013). É planta de clima temperado e em função da sua estrutura xerofítica se desenvolve bem, mesmo em ambientes com longos períodos quentes e secos, e com baixos índices pluviométricos. No clima mediterrâneo, durante o inverno, ocorre acúmulo de frio, o que é considerado indispensável para que a espécie saia da dormência e atinja, posteriormente, florescimento uniforme. A temperatura base, abaixo da qual não ocorre crescimento, é de 12,5 °C (COUTINHO et al., 2009.) Já a temperatura adequada para que ocorra a frutificação efetiva, deve estar entre os 25 °C e 35 °C. As plantas, contudo, são capazes de suportar altas temperaturas no verão próximas a 40 °C, sem que os ramos e folhas sofram queimaduras. Porém, a atividade fotossintética passa a ser inibida quando a temperatura ultrapassa os 35 °C (WREGGE et al., 2015). Planta rústica que pode ser encontrada em terrenos de baixa fertilidade natural e em climas extremamente áridos. Porém, em terrenos férteis e em locais com boa pluviometria, pode expressar melhor o seu potencial produtivo.

Uma das principais características da oliveira é sua grande longevidade. Existindo árvores em bom vigor produtivo com 300 a 400 anos de idade (CAPELLARO, 2013).

## 2.2 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE

A oliveira (*Olea europaea* L.) originária da região do Mediterrâneo, hoje tem seu cultivo estendido pelo mundo todo, compreendendo uma área de 9,7 milhões de hectares, liderados principalmente pela União Europeia, responsável por 75% da produção de azeitonas onde a Espanha e a Itália se destacam por serem os países produtores mais importantes (AHMAD et al., 2016). A produção mundial de azeitonas de mesa nos últimos 30 anos, cresceu de forma constante, de uma produção de 950 000 t em 1990/91 para 2 953 500 t em 2017/18, um aumento de 211% (+2 003 500 t). O consumo mundial para a safra 2016/2017 foi calculado em aproximadamente 2.803.000 t segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2017).

Na América do Sul, a Argentina é o principal produtor e exportador de azeitona e azeite, com mais de 100 mil hectares plantados (SILVA et al., 2012). No Brasil os estudos sobre olivicultura iniciaram na década de 1940, porém alavancaram no ano 2000, devido a estudos de zoneamento agroclimático e econômico realizados pelo Ministério da Agricultura, que definiram as regiões brasileiras com características adequadas para o plantio de oliveira

em longa escala (MELLO & PINHEIRO, 2012). Atualmente, estes plantios já em fase de produção e beneficiamento de azeitona, concentram-se principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina (COUTINHO et al., 2016).

Segundo a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul (SEAPI, 2017) o estado encerrou o ano de 2016 com uma área de cerca de 2.000 hectares plantados, por aproximadamente 160 produtores, especialmente da Metade Sul do estado, destacando os municípios de Caçapava do Sul, Pinheiro Machado, Cachoeira do Sul e Santana do Livramento, no entanto, apesar dos avanços, a área plantada e a produção ainda representam muito pouco perto da demanda existente no mercado brasileiro; sendo hoje, o Brasil um dos maiores importadores de azeitonas e derivados do mundo, importando praticamente todo azeite e azeitona que consome (FERREIRA et al., 2015) destacando-se como um dos maiores mercados consumidores dos produtos da oliveira, movimentando mais de um bilhão de reais no mercado nacional (OLIVEIRA et al., 2012).

Na década de 60, o Conselho Oleícola Internacional (COI) iniciou uma série de estudos científicos que objetivaram avaliar os benefícios das propriedades do azeite na saúde humana, os quais demonstraram efeito benéfico no tratamento de doenças cardiovasculares e na diminuição de riscos de aparecimento de cânceres como os de mama e de ovário, e nas doenças degenerativas como hipertensão, reumatismo, osteoporose, além de maior controle da hiperglicemia nos diabéticos, conferir melhoras na digestão, na memória e na longevidade (SILVA, 2008; WREGGE et al., 2009).

Os frutos da oliveira e o extrato de suas folhas são ricos em propriedades nutriterapêuticas, demonstrando elevado teor de polifenóis, como flavonoides, verbacoside e antocianina, com comprovada capacidade antioxidante (OLIVEIRA, 2009). Outros compostos como feniletanois, secoiridoides e lignanas também foram encontrados em plantas do gênero *Olea*, aos quais são atribuídos efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e antivirais. Relatórios recentes demonstraram ação anti-amiloidogênica da oleuropeína, principal secoiridoide de folhas e frutos de oliveira, indicando um possível papel protetor contra a doença de Alzheimer (MICHEL et al., 2015). O reconhecimento dos efeitos positivos do consumo do azeite de oliva à saúde é o principal responsável pela intensificação, modernização e ampliação do cultivo de oliveiras no mundo (WREGGE et al., 2009).

## 2.3 CULTIVARES

As inúmeras cultivares de oliveira plantadas atualmente são oriundas de cruzamentos e seleções de materiais cultivados desde períodos remotos, assim esta diversidade necessita ser avaliada em condições específicas de ambiente (OLIVEIRA et al., 2012).

### 2.3.1 Arbequina

Originária da região da Lérida na Espanha, também conhecida por Arbequí, Arbequín e Blancal, tem seu cultivo estendido por inúmeras regiões do mundo, entre elas Argentina, Estados Unidos, Chile e Austrália (EMBRAPA, 2012).

Cultivar autocompatível, muito apreciada pela precocidade de produção, elevada produtividade, bom rendimento graxo e excelente qualidade do azeite produzido, porém de baixa estabilidade. Planta de vigor reduzido o que possibilita um maior adensamento de plantio (COUTINHO et al., 2009).

Possui inflorescência com dimensões que variam de 35 a 38 mm de comprimento contendo aproximadamente 25 flores por racimo floral. Folhas elípticas de curto comprimento, largura mediana com curvatura longitudinal do limbo. Seus frutos são simétricos e de baixo peso, forma esférica, ápice redondo, base truncada, lenticelas escassas e pequenas. A colheita ocorre em meados de fevereiro e março (ROSSINI, 2016). O conteúdo de azeite é considerado alto (entre 16% e 18%) (EMBRAPA, 2012), com caráter distinto, rico em propriedades organolépticas. Trata-se de uma planta rústica, apresentando resistência ao frio e à geada, respondendo bem à poda.

### 2.3.2 Koroneiki

Originária da Grécia, onde a cultivar tem sua maior área plantada, também sendo distribuída pela Argentina, Estados Unidos, Chile e Austrália. Com produtividade elevada e constante (COUTINHO et al., 2009), está entre as cultivares mais plantadas mundialmente, destinada à produção de azeite. Seu fruto possui elevado teor de óleo (28%), rico em polifenóis e com alta estabilidade (PENSO et al., 2016); rendendo ao azeite características sensoriais muito apreciadas (COUTINHO et al., 2009).

Planta de vigor médio, copa com densidade mediana e aberta. Inflorescência de comprimento médio (entre 30 a 35 mm) com número mediano de flores, aproximadamente 20 por racimo. Folhas estreitas, elíptico-lanceoladas de comprimento curto (aproximadamente 3

cm), frutos com baixo peso (menos que 2 g), esféricos, simétricos, ápice pontiagudo e base truncada (COUTINHO et al., 2016).

Quando jovens, as plantas são sensíveis ao frio, por isso recomenda-se que o plantio seja iniciado na segunda quinzena de agosto, podendo-se estender até o final de novembro (COUTINHO et al., 2015).

#### 2.4 PRODUÇÃO DE MUDAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

Rotineiramente a propagação vegetativa de oliveira ocorre principalmente por estaquia e enxertia, porém é sabido que o processo de enraizamento das estacas compromete a produção de mudas em grande escala, além disso, a indução de raízes adventícias parte essencial da técnica, diminui com a idade da planta doadora (CID et al., 2015). Já a enxertia, a nível comercial apresenta-se como uma técnica cara e laboriosa, além de oferecer riscos de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, além da possibilidade de transmissão mecânica de vírus (CID et al., 2015). A propagação seminal apresenta inúmeras desvantagens relacionadas à variabilidade genética e longo período juvenil, além da baixa taxa de germinação em condições de campo, o que inviabiliza a produção comercial da espécie (SANTOS et al., 2015).

Sendo assim, a cultura de tecidos vegetais surge como uma alternativa promissora para acelerar a multiplicação ou até mesmo a seleção de novos genótipos de oliveira, servindo como ferramenta de pesquisa para vários fins (SOUZA et al., 2012), capaz de superar as limitações encontradas nos métodos tradicionais de propagação, além de proporcionar a multiplicação clonal em grande escala e servir de modelo para estudos bioquímicos, fisiológicos e no aperfeiçoamento dos processos de melhoramento genético da espécie (CANÇADO et al. 2010).

#### 2.5 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais, também chamada de cultura e/ou propagação *in vitro* é uma técnica baseada na totipotencialidade das células, teoria proposta por Haberlandt em 1902, a qual afirma que cada célula vegetal possui capacidade genética de gerar um novo organismo idêntico ao que lhe deu origem (CANÇADO et al., 2010) viabilizando a clonagem de plantas a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz (MENDES et al., 2015) com o objetivo de obter um grande número de plantas, multiplicação de híbridos com a manutenção das características genéticas, produção de mudas durante o ano

todo e rápida propagação de indivíduos resultantes de programas de melhoramento com finalidade comercial, além de produzir plantas isentas de patógenos, principalmente vírus (SANTOS et al., 2016).

A propagação *in vitro* em condições assépticas permite certa homogeneidade para fatores que em condições *ex vitro* são de difícil controle, como os ambientais, por exemplo, o que possibilita a clonagem dos genótipos, reduzindo as diferenças causadas pela variação genética (CANÇADO et al., 2010). A técnica apresenta-se também como uma ferramenta promissora de investigação da fisiologia básica e bioquímica das células vegetais (BASKARAN et al., 2015). O cultivo *in vitro* de plantas consiste na pré-seleção de uma planta matriz, da qual serão retirados os explantes para o início do processo. Para isso, a sanidade desta é um fator importante, pois está relacionada diretamente com a descontaminação do explante no processo de isolamento (MOREIRA, 2014). Frequentemente, os fatores de maior influência para o sucesso da micropropagação de espécies vegetais é a fonte de explante e o meio nutritivo onde são cultivados (MIYATA et al., 2014).

A cultura de tecidos vegetais proporciona aumentos na produção e diminuição de danos ambientais contribuindo com os laboratórios e países adotantes da técnica para que tenham maiores vantagens competitivas, aumentando a oferta de emprego, gerando novas demandas por genótipos, rápida multiplicação clonal de mudas de qualidade, livres de doenças e independentes de fatores sazonais (CID et al., 2015).

## **2.5.1 Etapas da cultura de tecidos**

### *2.5.1.1 Estabelecimento*

#### *2.5.1.1.1 Desinfestação*

Trata-se de um processo de esterilização da superfície do explante, que busca eliminar microrganismos contaminantes como bactérias, fungos e leveduras, que podem competir por nutrientes ou até mesmo produzirem toxinas que influenciam na regeneração do explante (ANDRADE, 2002). Esta etapa geralmente é realizada utilizando-se soluções de hipoclorito de cálcio ou hipoclorito de sódio nas quais o material vegetal é mergulhado por intervalos de tempos que variam de 5 a 20 minutos. Além disso, realiza-se imersões em álcool 70% (v/v) e tríplex lavagem em água destilada e autoclavada, o processo de descontaminação e o tempo

de duração podem variar conforme o tipo e idade do tecido (ANDRADE, 2002; CANÇADO et al., 2010).

A contaminação na cultura de tecidos representa um dos maiores obstáculos enfrentados para o estabelecimento e propagação de clones, ainda mais considerando o fato de que mesmo tomando-se todas as providências de uma assepsia rotineira, muitas vezes não é possível contornar completamente a contaminação por esta ter origem endógena, necessitando, neste caso, de procedimentos alternativos como tratamentos com antibióticos e fungicidas (CID et al., 2015).

#### 2.5.1.1.2 Oxidação fenólica

As plantas lenhosas possuem certa dificuldade para se estabelecer *in vitro*, principalmente devido à contaminação e oxidação fenólica dos explantes, este último, desencadeada no processo de senescência ou injúria dos tecidos, podendo ser evitada ou atenuada através do uso de substâncias antioxidantes no meio nutritivo (CID et al., 2015). Segundo Erich & Schuch (2003), tal reação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado, causando acúmulo de produtos como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada modificando a composição do meio de cultura e comprometendo a absorção de metabólitos. Cordeiro et al. (2004) relatam que a oxidação em plantas lenhosas está associada a eventos como a intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e concentração de sais no meio, como o nitrogênio na forma de nitrato de amônio. Conforme Cordeiro et al. (2004) além desses fatores, a idade fisiológica do explante, o teor endógeno de fitorreguladores e agentes gelificantes podem influenciar consideravelmente na oxidação da espécie a ser cultivada. Sartor et al., (2013) não observaram diferenças significativas quando avaliaram diferentes antioxidantes no cultivo *in vitro* de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*), porém ao aumentar a concentração do fitorregulador BAP obteve maior ocorrência de oxidação.

Pré-tratamentos dos explantes com substâncias antioxidantes e a adição destas ao meio de cultura são procedimentos que são adotados no cultivo *in vitro* a fim de minimizar os efeitos ocasionados pela oxidação (LEDO et al., 2001). Carvão ativado, polivinilpirrolidone (PVP) e ácido ascórbico são algumas dessas substâncias. De acordo com Costa et al. (2007), o carvão ativado é capaz de evitar o acúmulo de inibidores fenólicos, já o PVP tem seu papel voltado para a inibição da oxidação causada pelas enzimas fenolases, adsorvendo os produtos

tóxicos ou quinonas presentes no meio nutritivo. O ácido ascórbico reage com os metais do meio de cultura impedindo que estes fiquem disponíveis para oxidarem (Melo et al., 2001).

#### 2.5.1.2 *Multiplicação in vitro*

Esta fase, indispensável para obtenção de novas plantas (PASA et al., 2012), compreende a multiplicação dos propágulos já estabelecidos por meio de constantes subcultivos em meio cuja composição foi otimizada para desencadear o crescimento e a proliferação de novas brotações (CANÇADO et al., 2010), para isso, é importante que se tenha domínio da tecnologia de propagação em laboratório, resultante de uma série de estudos realizados envolvendo os fatores que apresentam influência no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (DONINI et al., 2011). O genótipo, composição do meio de cultura, reservas e fontes de carbono, tipo e quantidade de regulador de crescimento, luz e temperatura (RIBEIRO, 2016) estão entre esses fatores.

##### 2.5.1.2.1 Fitorreguladores de crescimento

É muito comum, nesta fase, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, substâncias sintéticas capazes de suprir as deficiências nos teores endógenos hormonais da planta, podendo variar de acordo com a espécie e tipo de explante (VILLA et al., 2010). Dentre os grupos de reguladores de crescimento mais usados na propagação *in vitro* estão as giberelinas, as citocininas e as auxinas (GRIMALDI et al., 2008).

As giberelinas são um grupo vasto de compostos e estão relacionados principalmente com o crescimento caulinar das plantas e com a produção de  $\alpha$ -amilase em sementes de gramíneas. As citocininas, na cultura de tecidos, são empregadas geralmente na indução de brotações adventícias a partir de calos, gemas axilares ou apicais (CID et al., 2015). O tipo e a concentração desse componente no meio de cultura apresenta fundamental influência no sucesso da multiplicação *in vitro*, principalmente no que se refere à formação de estruturas aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (PASA et al., 2012). A utilização de citocininas como BAP e Zeatina, por exemplo, possuem papel fundamental na promoção do crescimento de gomos axilares dos explantes, no estímulo da divisão celular e crescimento, na inibição do desenvolvimento de raízes e na promoção da organogênese dos *callus* celulares (RIBEIRO, 2016).

As auxinas incluem o grupo dos fitorreguladores responsáveis pela indução de calos a partir de um explante e no enraizamento a partir de um broto, o tipo e a sua concentração vão



dependem da finalidade que pode ser a formação de calos ou estimular o enraizamento (CID et al., 2015).

#### 2.5.1.3 Enraizamento

A fase de enraizamento tem início após se obter uma taxa de multiplicação favorável, com boas características dos explantes como diâmetro de caule, alongamento e desenvolvimento foliar (RIBEIRO, 2016). A indução e formação de raízes adventícias é um processo importante, pois determina o estabelecimento da planta em condições *ex vitro* aumentando suas chances de sobrevivência durante a aclimatização (RADMANN et al., 2014). Para isso, realiza-se a aplicação de auxinas que, isoladamente ou em combinação no meio de enraizamento, irão favorecer o adequado balanço hormonal, equilibrando seu teor nos tecidos. Dentre as substâncias mais utilizadas estão o ácido indolilbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indol-3-acético (AIA), embora este último seja considerado o mais empregado neste processo, o AIB vem sendo o mais utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes em larga faixa de concentração (LIMA NETO et al., 2009; PASA et al., 2012). As auxinas exógenas são os reguladores de crescimento com maior participação no processo de rizogênese, principalmente em espécies lenhosas que possuem dificuldade de enraizamento, a qual tende a aumentar quando o material não for juvenil (LOPES et al., 2001).

#### 2.5.1.4 Aclimatização

Esta etapa é um passo fundamental na produção de plantas pela cultura de tecidos, uma vez que as condições oferecidas por esta técnica modificam as características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando assim seus processos fisiológicos normais (QUISEN et al., 2013).

O sucesso dessa fase requer que as plantas desenvolvidas heterotroficamente, em altíssima umidade, se adaptem a condições de baixa umidade, desenvolvendo-se autotroficamente (SILVA et al., 2008), este processo de adaptação representa para muitas espécies um fator limitante, indicando altos índices de mortalidade, baixa taxa de crescimento e desuniformidade das plantas micropropagadas (LIMA-BRITO et al., 2016).

Em consequência da elevada umidade relativa encontrada no interior dos frascos de cultura, os propágulos desenvolvem um mecanismo de abertura e fechamento estomático ineficiente e baixa produção de cutina do tecido foliar, camada que oferece proteção à

superfície da folha. Além disso, reduz o espessamento da parede das células epidérmicas, afeta o desenvolvimento do mesófilo deixando-o com muitos espaços intercelulares e ausência ou reduzido número de tricomas na superfície foliar, facilitando a perda excessiva de água por transpiração em condições *ex vitro* (CANÇADO et al., 2010; BRITO et al., 2016). Para contornar esses problemas é essencial que se estimule a síntese de cutina e a regulação do funcionamento estomático, de maneira gradativa, com os propágulos ainda *in vitro*, adotando medidas preventivas como a substituição das tampas dos frascos por vedações porosas, por exemplo, além de manter os propágulos recém transferidos para o substrato em locais sombreados e com frequente nebulização (CANÇADO et al., 2010)

## 2.6 CULTIVO *IN VITRO* DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

A oliveira por ser uma espécie de relevante potencial econômico, social e cultural, pode ser ainda mais beneficiada pela pesquisa biotecnológica obtendo aumentos de produção e melhoria na qualidade de seus produtos (CANÇADO et al., 2010).

No Brasil o cultivo comercial de oliveira enfrenta obstáculos relacionados à obtenção de mudas de qualidade, o que é um fator limitante para sua expansão nacional (CANÇADO et al., 2010), estes problemas estão associados principalmente à manejos inadequados e escassez de conhecimentos sobre técnicas e condução dos pomares, o que faz da cultura de tecidos uma prática viável para propagação da espécie (DONINI et al., 2008).

O cultivo *in vitro* de oliveira já vem sendo aplicado e amplamente utilizado nas pesquisas, apesar desta ser uma espécie lenhosa e apresentar recalcitrância *in vitro* dificultando a aplicação da técnica com finalidade comercial (CANÇADO et al., 2010). Segundo Pinheiro et al. (2013) as plantas lenhosas cultivadas *in vitro* têm sua propagação limitada por interferências de microorganismos contaminantes (fungos e bactérias) e oxidação dos explantes causada pela liberação de compostos fenólicos ao meio nutritivo. Trabalhos realizados com oliveira na cultura de tecidos já foram feitos a fim de criar protocolos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* da espécie (DONINI, et al., 2008; DONINI, et al., 2011; SOUZA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

Existem aspectos importantes que devem ser observados na implantação do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, onde se incluem a maioria das frutíferas, como o conhecimento e domínio das tecnologias de propagação em laboratório, que está alicerçado em resultados de estudos a fim de desvendar os fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas nessas condições (DONINI et al., 2008).

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N.; KHAN, N.; FAHAD A.; RAHMAN, K. U.; BAHADAR, S.; KHAN, M. I.; JAN, S. U.; BAHADAR, R.; REHMAN, Z.; ZARDAD, R.; HUBAB, M.; ZAHOOR, S.; HAYAT, A.; ANWAR, M. Comparison of different parameters for the *in vitro* propagation of various cultivars of olive (*Olea Europaea L.*). **International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy**, v. 6, n. 1, 2016.

ANDRADE, S. R. M. DE. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

AZEITES ROSSINI. **Oliveira Arbequina**. São Paulo, 2016. Disponível em: <<https://azeiterossini.com.br/2016/08/01/oliveira-variedade-arbequina/>>. Acesso em: 12 set. 2017.

BASKARAN, P.; KUMARI, A.; NAIDOO, D.; STADEN, J. V. *In vitro* propagation and biochemical changes in *Aloe pruinosa*. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 51-58, 2015.

BEZERRA, R. M. DE. F.; ALOUFA, M. A. I.; FREIRE, F. A. DE. M.; SANTOS, D. D. DOS. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.

CANÇADO, G. M. A. DE.; BRAGA, F. T.; SOUZA DE, R. A. V.; NUNES, C. F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. Epamig, Lavras, 2010. 330 p.

CAPELLARO, T. H. **Produção de mudas de oliveira em sistemas de cultivo sem solo**. 2013. 106 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

CID, L. P. B.; BRASILEIRO, A. C. M.; DURZAN, D. J.; LEMOS, E. E. P. DE.; ARAGÃO, F. J. L.; COSTA, F. H. DA. S.; TEIXEIRA, J. B.; SCHERWINSK-PEREIRA, J. E.; SORIANO, L.; CORDEIRO, M. C. R.; ZIMMERMANN, M. J. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4 ed. Brasília: Embrapa, 2015. (E-book).

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Market Newsletter No. 121**. Madrid, 2017. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/697-year-2017-news/909-market-newsletter-november-2017>. Acesso em: 19 dez. 2017.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. DE.; COSTA, M. P. DE.; REIS, L. R. S. Efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio no controle da oxidação *in vitro* de segmento caulinar de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 41, p. 97-104, 2004.

COSTA, A. S. DA.; ARRIGONI-BLANK, M. DE. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B. DE.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. DA. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura brasileira**, v. 25, n. 1, p. 09-14, 2007.

COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O.; HAERTER, J. A.; COSTA, V. B. (Ed.). **Oliveira:** Aspectos técnicos e cultivo no Sul do Brasil. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2015.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPELLARO, T. H. (Ed.). **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa clima temperado, 2009. 125 p. (Embrapa clima temperado. Sistemas de produção, 16).

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação de oliveira ‘Arbequina’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, set., 2011.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. de F.; SOUZA, J. A. de.; SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 299-333, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Arbequina:** Cultivar de oliveira destinada a produção de azeite, na região Sul do Brasil. Pelotas: Embrapa clima temperado, 2012. (Embrapa clima temperado. Comunicado técnico, 400).

ERIG, M. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociências**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 221-227, set. 2003.

FERREIRA, G. M. DOS. R.; MELLONI, R.; SILVA, L. DE. F. O. DA.; MARTINS, F. B.; GONÇALVES, E. D. Fungos micorrizicos arbusculares no desenvolvimento de mudas de oliveira (*Olea europaea* L.) cultivadas no Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 361-366, 2015.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n. 2, p. 160-168, 2008.

LEDO, A. da. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C. de.; OLIVEIRA, M. do. S. P. de.; LEDO, C. A. da. S. Avaliação da oxidação de segmentos de ráquias de açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.) sob diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 35, p. 09-14, 2001.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; RESENDE, S. V.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016.

LIMA NETO, M. C.; RIBEIRO, J. de. S.; BEZERRA NETO, E. Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 175-179, 2009.

LOPES, S. da. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King.). **Cerne**, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. DE.; TORRES, Mario, A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 368 p.

MARTINS, F. B.; REIS, D. DA. F.; PINHEIRO, M. V. M. Temperatura base e filocrono em duas cultivares de oliveira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 11, 2012.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 537-548, 2012.

MELO, B. DE.; PINTO, J. E. B. P; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, J. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guabirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MENDES, D. DE. J.; SIBOV, S. T.; FARIA, M. T. Influência dos ácidos naftaleno acético e ácido indolbutírico (auxinas) no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. F. (orchidaceae). **Revista eletrônica de educação da faculdade Araguaia**, Goiânia, v. 7, p. 13-40, 2015.

MICHEL, T.; KHLIF, I.; KANAKIS, P.; TERMENTZI, A.; ALLOUCHE, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A. UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. **Phytochemistry Letters**, Greece, v. 11, p. 424-439.

MIYATA, L. Y.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meios de cultura utilizados nas micropropagação de híbridos de orquídeas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n.4, p. 1731-1738, 2014.

MOREIRA, R. M. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de oliveira**. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

OLIVEIRA, M. C. de. **Enraizamento de estacas de oliveira submetidas a aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2009.

OLIVEIRA de, A. F.; VIEIRA NETO, J.; VILLA, F.; SILVA, L. F. de. O. Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 317-322, 2010.

OLIVEIRA, M. C. de.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; CARDOSO, M. das. G. Características fenológicas e físicas e perfil de ácidos graxos em oliveiras no sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 30-35, 2012.

PASA, M. da. S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. de. M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. Qualidade da luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

- PENSO, G. A.; SACHET, M. R.; MARO, L. A. C.; PATTO, L. S.; CITADIN, I. Propagação de oliveira ‘Koroneiki’ pelo método de estaquia em diferentes épocas, concentrações de AIB e presença de folhas. **Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 3, p. 355-360, 2016.
- PELIZZA, T. R.; SILVEIRA, F. N.; MUNIZ, J.; GRIMALDI, F.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A. A. Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro cultivares: Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 9, n. 1-2, p. 24-29, 2013.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.
- PIO, R.; BASTOS, D. C.; BERTI, A. J.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; ENTELMANN, F. A.; ALVES, A. S. R.; BETTIOL NETO, J. E. Enraizamento de diferentes estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolburtírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 562-569, 2005.
- QUISEN, R. C.; RAIZEN, M. D. M.; IRIARTE-MARTEL, J. H. Acclimatization of micropropagated plantlets of Heliconia Sexy Pink. **Ciências Agrárias**, Manaus, v. 56, n. supl., p. 1-5, 2013.
- RADMANN, E. B.; GALLO, C. M.; WEISERRITTERBUSCH, C.; BIANCHI, V. J.; FERNANDO, J. A.; PETERS, J. A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização do porta-enxerto de ameixeira ‘MR. S. 2/5’. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 21-31, 2014.
- RIBEIRO, A. V. A. P. **Simplificação do processo de multiplicação *in vitro* de oliveira “*Olea europaea* L.”** 2016. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade de Évora. Évora, 2016.
- SANTOS, F. F. dos.; BANDEIRA, J. de. M.; MARIANI, P.; MARTINS, A. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES, D. M. de. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.
- SANTOS, E. de. O.; RODRIGUES, A. A. de. J.; SILVA, E. R. da.; CARVALHO, A. C. P. P. de. Multiplicação de bastão-do-imperador em resposta a concentrações de BAP e número de subcultivos. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 22, n.1, p. 88-93, 2016.
- SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E IRRIGAÇÃO-RS. **Programa estadual de olivicultura – PRÓ-OLIVA**. Porto Alegre, 2017.
- SILVA, A. A. F. **Necessidades hídricas e respostas da oliveira (*Olea europaea* L.) ao déficit hídrico na região da terra quente**. 2008. 225 f. Tese. (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro. Vila Real, 2008.

SILVA, K. J. D. e.; SOUZA, V. A. B. de.; GOMES, R. L. F. Efeito da altura de mudas na adaptação pós cultivo *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Ceres**, v. 55, n. 6, p. 551-555, 2008.

SILVA, L. de. F. da. Variação da qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012.

SOUZA, R. A. V. de.; BRAGA, F. T.; AZEVEDO, P. H. de.; FERREIRA, J. L.; CANÇADO, G. M. de. A. Efeitos da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, 2012.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; FREITAS, G. de F. Otimização de um protocolo para micropropagação da oliveira Ascolano 315. **Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, p. 530-534, 2010.

WREGGE, M. S. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa clima temperado, 2009. 125 p. (Embrapa clima temperado. Sistemas de produção, 16).

WREGGE, M. S.; COUTINHO, E. F.; PANTANO, A. P.; JORGE, R. O. Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 3, p. 656-666, 2015.

### **3 ARTIGO 1: ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE OLIVEIRA ‘ARBEQUINA’ E ‘KORONEIKI’**

#### **3.1 RESUMO**

Devido a relevante importância econômica, tanto para o setor alimentício quanto farmacêutico, a oliveira vem sendo cada vez mais cultivada em todo o mundo. Para isso, a obtenção de mudas de qualidade com uniformidade e idoneidade varietal surge como fator altamente relevante na implantação dos pomares de oliveiras. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais de duas cultivares de oliveira sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo (2x3x3), sendo duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki), três concentrações de BAP (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) e três concentrações de hipoclorito de sódio (0,6; 0,8 e 1,0% de cloro ativo) para a descontaminação dos explantes. Cada tratamento consistiu de três repetições e a unidade experimental de cinco tubos de ensaio com um explante cada. Após 28 dias, observou-se que os tratamentos testados não apresentaram eficiência no estabelecimento *in vitro* de *Olea europaea* cv. Arbequina. No entanto, a concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP adicionada ao meio WPM e a concentração de 1,0% de hipoclorito de sódio, utilizada para a desinfestação dos explantes, são ideais para o estabelecimento *in vitro* da cultivar Koroneiki.

Palavras-chave: *Olea europaea*; cultivares; assepsia; citocinina.

#### **3.2 ABSTRACT**

Due to relevant economic importance, both for the food and pharmaceutical sectors, the olive tree is being increasingly cultivated around the world. For this, obtaining quality seedlings with uniformity and varietal suitability emerges as highly relevant factor at implantation of olive orchards. Thus, the objective of this work was to develop *in vitro* establishment protocol from nodal segments of two olive cultivars under different concentrations of sodium hypochlorite and different concentrations of 6-benzilaminopurine (BAP). The experiment was



conducted on completely randomized design, in a triple factorial scheme (2x3x3), two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki), three BAP concentrations (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) and three concentrations of sodium hypochlorite (0,6; 0,8 and 1,0% active chlorine) for the decontamination of the explants. Each treatment consisted of three replicates and the experimental unit of five test tubes with one explant each. After 28 days, it was observed that the treatments tested not shown to be efficient in the in vitro establishment of *Olea europaea* cv. Arbequina. However, the concentration of 2,22  $\mu\text{M}$  of BAP added to the WPM and the 1,0% concentration of sodium hypochlorite to the disinfection of the explants are ideal for the in vitro establishment of cultivar Koroneiki.

Keywords: *Olea europaea*; cultivars; asepsis; cytokinin.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea*) apresenta relevante importância econômica, sendo cada vez mais apreciada e cultivada em todo o mundo. O amplo consumo de seus produtos, a azeitona de mesa e o azeite de oliva, têm demonstrado que a espécie possui elevado potencial, atraindo o interesse de produtores nacionais e internacionais (SOUZA et al, 2012).

O Brasil é um dos maiores importadores dos produtos da oliveira na América do Sul, comprando principalmente da Argentina, Espanha e Portugal (DONINI et al., 2011). De acordo com o boletim de mercado divulgado pelo Conselho Oleícola Internacional (COI, 2017) o comércio brasileiro de azeitona de mesa, até agosto de 2017 teve aumento de 15%.

O prévio conhecimento da finalidade do olival é determinante na escolha das cultivares a serem produzidas. Por exemplo, a cultivar espanhola Arbequina e a de origem grega Koroneiki estão sendo produzidas no Sul do Brasil com objetivo principal a produção de azeite, por apresentarem características ideais para este fim, como precocidade de produção, bom teor de ácido oleico, vigor e alta produtividade (JÚNIOR et al., 2009), para isso, a obtenção de mudas de qualidade com uniformidade e pureza varietal surge como fator altamente relevante na implantação do pomar de oliveiras (OLIVEIRA et al., 2010).

Atualmente, a oliveira vem sendo propagada vegetativamente através de métodos convencionais como a enxertia e a estaquia, apesar destas técnicas apresentarem diversas desvantagens como a baixa eficiência, por sofrer influência das variações sazonais do clima, das características genética das cultivares e de condições nutricionais e sanitárias do material

vegetal utilizado (CANÇADO et al. 2013). Outra maneira para propagação da espécie seria por via sexuada (sementes), porém este método gera elevada variabilidade genética, elevado período juvenil das plantas produzidas, além da baixa germinação a campo, o que inviabiliza a produção de mudas para fins comerciais (SANTOS et al., 2015). Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais apresenta inúmeras vantagens que, de maneira eficiente, contorna estas dificuldades, proporcionando a produção de mudas em curto tempo e espaço, garantindo homogeneidade e qualidade fitossanitária das plantas produzidas, além de ser oportunidade de aperfeiçoar os processos de melhoramento genético (SOUZA et al., 2012).

Dentre vários fatores, o sucesso da técnica depende da adoção de métodos eficientes de assepsia, sendo que a desinfestação tanto dos explantes como também do ambiente de trabalho e materiais utilizados, podem ser responsáveis pelo fracasso da técnica devido ao elevado grau de contaminação e a presença sistêmica de microrganismos. Para isso, várias substâncias com ação germicida têm sido utilizadas, como o etanol e compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio e de cálcio (COSTA et al., 2007).

As plantas lenhosas apresentam dificuldades no estabelecimento *in vitro* devido principalmente à contaminação e oxidação. A fim de mitigar ou evitar a ocorrência destes eventos, pré-tratamentos são aplicados à planta matriz (ERIG & SCHUH, 2003), como por exemplo fungicidas e bactericidas, aplicados dias antes da coleta do material vegetal para isolamento. A combinação dos compostos ativos destas substâncias deve ser estabelecida de acordo com a espécie e a sensibilidade do material a ser descontaminado (ERIG & SCHUH, 2003), para que não ocorra intoxicação dos tecidos. A superexposição do tecido aos agentes esterelizantes pode danificar o explante, levando a morte celular (CARVALHO, 2012).

A adição de diferentes concentrações de reguladores de crescimento ao meio de cultura utilizados durante o processo de isolamento é outro fator a ser considerado, pois este é fundamental ao desenvolvimento dos propágulos, e assim, capazes de estimular diferentes respostas nas plantas. Entre os principais reguladores de crescimento utilizados estão as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP), que têm como função estimular a brotação nos explantes, quebrando a dominância apical e induzindo a proliferação das gemas axilares (CANÇADO et al., 2013). A eficiência destas substâncias sintéticas adicionadas ao meio está diretamente relacionada ao conteúdo endógeno nos tecidos do explante, o qual pode variar dependendo do genótipo.

A geração de conhecimentos relacionados à propagação, para a expansão da olivicultura torna-se essencial, tendo em vista o aumento da demanda pelos produtos da oliveira. Para isso é de fundamental importância que se obtenha condições adequadas de

estabelecimento *in vitro* da espécie. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver protocolo de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais de cultivares de oliveira sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e BAP.

### 3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.4.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Extrativos Aromáticos da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, *Campus* de Frederico Westphalen-RS. Como fonte de explantes foram utilizados ramos e segmentos nodais jovens excisados de brotações apicais de plantas matrizes de duas cultivares de *Olea europaea* L., cultivadas a campo em plantio experimental, com nove anos de idade, localizado na cidade de Chapecó, região Oeste de Santa Catarina, com coordenadas geográficas: 27° 05' 47" de latitude sul, 52° 37' 06" de longitude oeste e altitude de 674 m. O material vegetal foi coletado com o auxílio de tesoura de poda esterilizada em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) de cloro ativo imediatamente após cada excisão. Em seguida os ramos foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% de cloro ativo, adicionada de 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 30 mg L<sup>-1</sup> de fungicida Cercobin<sup>®</sup> 700 WP.

Em condições de laboratório, foram retirados 1/3 das folhas dos segmentos nodais, em seguida e mantidos sob água corrente por aproximadamente uma hora. Passado este período, em câmara de fluxo laminar os explantes foram submetidos aos processos de desinfestação a com soluções de álcool 70% (durante 30 segundos) e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,6; 0,8 e 1,0% de cloro ativo), acrescido de duas gotas de Tween20<sup>®</sup> durante 15 minutos sob agitação constante. Em seguida os explantes foram submetidos a três lavagens em água destilada esterilizada por aproximadamente cinco minutos cada, para retirada do excesso de hipoclorito de sódio.

Após a desinfestação, os explantes foram excisados retirando-se o restante das folhas, em seguida reduziu-se seu tamanho a aproximadamente 1,0 cm, sendo posteriormente inoculados em tubos de ensaio de vidro 15 x 25 mm, contendo 10 mL dos sais e vitaminas do meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP (0,0; 2,22 e 4,44 µM), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, opH do meio foi ajustado para 5,7±0,1, seguido de

autoclavagem a 120°C, 108 kPa, por 20 minutos. As culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, mantidos no escuro por sete dias, em seguida transferidos para ambiente com irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proveniente de lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, Luz do dia), com fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nessas condições por 28 dias.

### 3.4.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3x3, sendo duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki), três concentrações de hipoclorito de sódio (0,6; 0,8 e 1,0% (v/v) de cloro ativo) e três concentrações de BAP (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) totalizando 18 tratamentos (Tabela 1), com três repetições cada, e a unidade experimental constituída por cinco tubos de ensaio com um explante cada.

Após 28 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de contaminação fúngica; porcentagem de contaminação bacteriana; porcentagem de oxidação; porcentagem de sobrevivência (determinada pela coloração verde dos explantes); e porcentagem de estabelecimento (determinada pelo desenvolvimento dos primórdios foliares – presença de folhas/brotos). As análises estatísticas foram realizadas no software SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011) aplicando-se teste de Tukey a 5% de significância. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.5, a partir de médias não transformadas.

Visando a melhor interpretação dos resultados, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis (Pimentel Gomes, 1985; Cargnelutti Filho et al., 2001) a 5% de probabilidade, a fim de comparar os tratamentos como um todo e determinar a melhor combinação dos fatores analisados. Neste caso, para as variáveis não paramétricas contaminação (fúngica e bacteriana), sobrevivência, estabelecimento e oxidação), foram aplicadas notas de 1 a 3 referentes ao score (nota) no qual para contaminação fúngica e bacteriana (1 - sem ocorrência de contaminação; 2 - contaminação fúngica e 3 – contaminação bacteriana), procedendo-se da mesma maneira para as variáveis sobrevivência e estabelecimento, aplicando-se notas de 1 a 3, (sendo 1 – não sobreviveu; 2 – sobrevivente e 3 – sobrevivente e estabelecida). Para a variável oxidação as notas foram atribuídas conforme o grau desta variável observado nos explantes (1 – sem oxidação; 2 – 50% do explante oxidado e 3 – 100% do explante oxidado) (Figura 4).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para desenvolver protocolo de estabelecimento *in vitro* de cultivares de *Olea europaea*.

Cultivares	Tratamentos	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Concentrações de hipoclorito de sódio (% cloro ativo)
Arbequina	T1	0,00	0,6
	T2	0,00	0,8
	T3	0,00	1,0
	T4	2,22	0,6
	T5	2,22	0,8
	T6	2,22	1,0
	T7	4,44	0,6
	T8	4,44	0,8
	T9	4,44	1,0
Koroneiki	T10	0,00	0,6
	T11	0,00	0,8
	T12	0,00	1,0
	T13	2,22	0,6
	T14	2,22	0,8
	T15	2,22	1,0
	T16	4,44	0,6
	T17	4,44	0,8
	T18	4,44	1,0

### 3.5 RESULTADOS

Pela análise de variância, foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, havendo para as variáveis porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de oxidação e porcentagem de sobrevivência, interação significativa apenas para o fator cultivares. Para a variável porcentagem de estabelecimento observou-se interação entre os fatores estudados (cultivares x concentrações de BAP x concentrações de hipoclorito).

Para a variável porcentagem de contaminação fúngica, a cultivar Koroneiki demonstrou maior suscetibilidade com média de 21,48%, quando comparado a cultivar Arbequina com média de 8,15% ( $p < 0,05$ ; Figura 1A). A porcentagem de contaminação bacteriana apresentou baixa ocorrência, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos estudados.

Para a variável porcentagem de oxidação ( $p < 0,05$ ), a cultivar Arbequina (89,63%) foi superior e diferiu significativamente à Koroneiki (68,14%), indicando influência do genótipo na resposta desta variável (Figura 1B). Este resultado refletiu diretamente nas respostas da

variável porcentagem de sobrevivência ( $p < 0,05$ ), no qual foram observadas médias superiores para a cultivar Koroneiki (6,67%) em comparação à Arbequina com média de 0,74%, indicando que a maioria dos propágulos de Arbequina que resistiram à contaminação, sofreram oxidação, implicando na baixa porcentagem de sobrevivência para esta cultivar (Figura 1C).

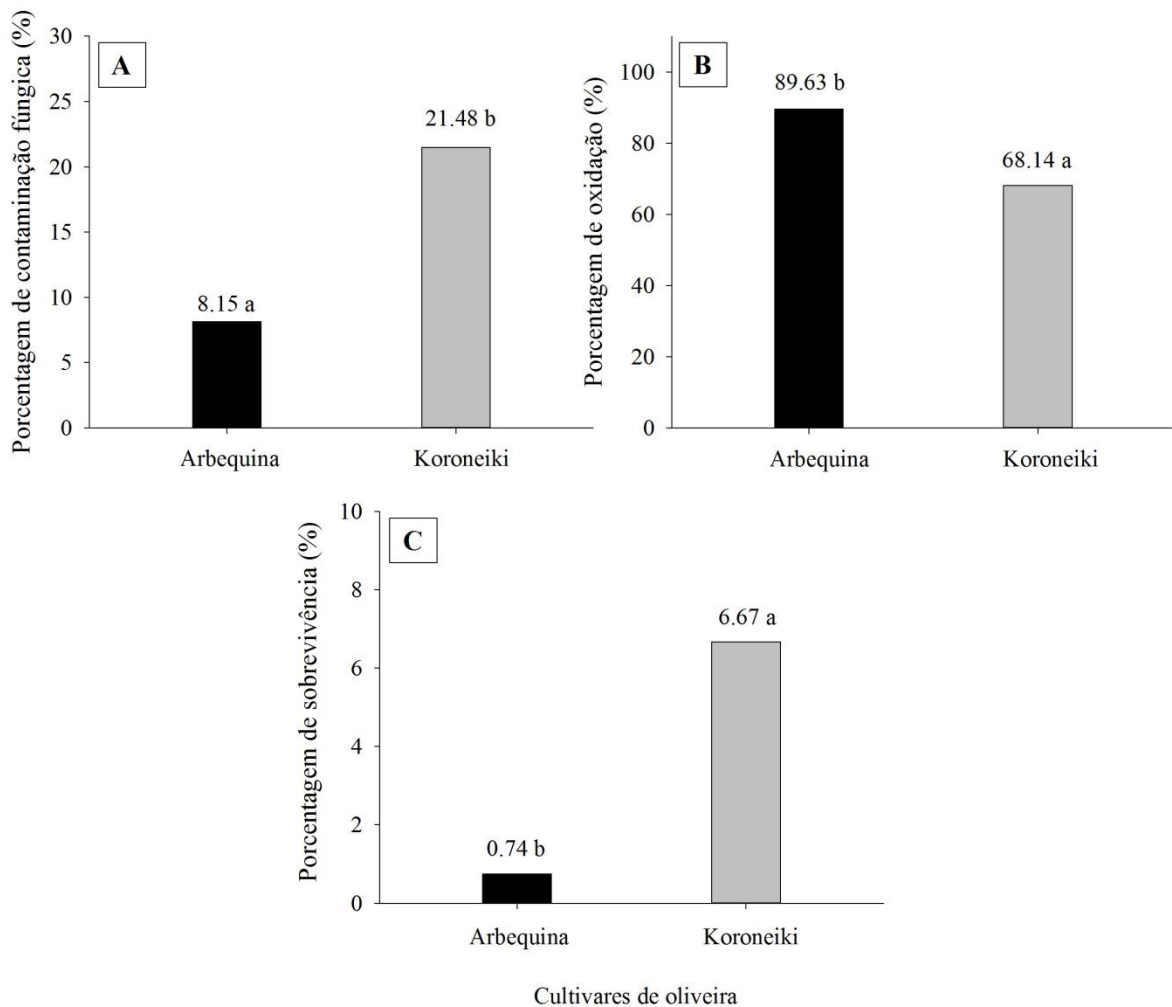


Figura 1 - Porcentagem de contaminação fúngica (A), porcentagem de oxidação (B) e porcentagem de sobrevivência (C) de cultivares de *Olea europaea* durante o estabelecimento *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores de dados não transformados.

Os resultados obtidos para a variável porcentagem de estabelecimento, no desdobramento das concentrações de BAP dentro de cada cultivar estudada, demonstraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as cultivares e concentrações testadas, no qual a cultivar Koroneiki na concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, apresentou a maior média com

20,0% de estabelecimento, seguido do tratamento sem adição de BAP (0  $\mu\text{M}$ ) com média de 6,67% para esta mesma cultivar, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP no qual não houve estabelecimento. A cultivar Arbequina não apresentou estabelecimento independente da concentração de BAP aplicada (Figura 2A).

O desempenho da variável no desdobramento das concentrações de hipoclorito de sódio dentro de cada cultivar também demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, no qual a cultivar Koroneiki foi superior em comparação a Arbequina, quando submetida ao tratamento com hipoclorito de sódio a 1,0% de cloro ativo com média de 20,0% de estabelecimento, seguido do tratamento com hipoclorito de sódio 0,6% de cloro ativo que apresentou média de 6,67%, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) da concentração de hipoclorito de sódio 0,8% de cloro ativo, no qual não houve estabelecimento. A cultivar Arbequina não apresentou propágulos estabelecidos para nenhuma das concentrações de hipoclorito de sódio testadas (Figura 2B).

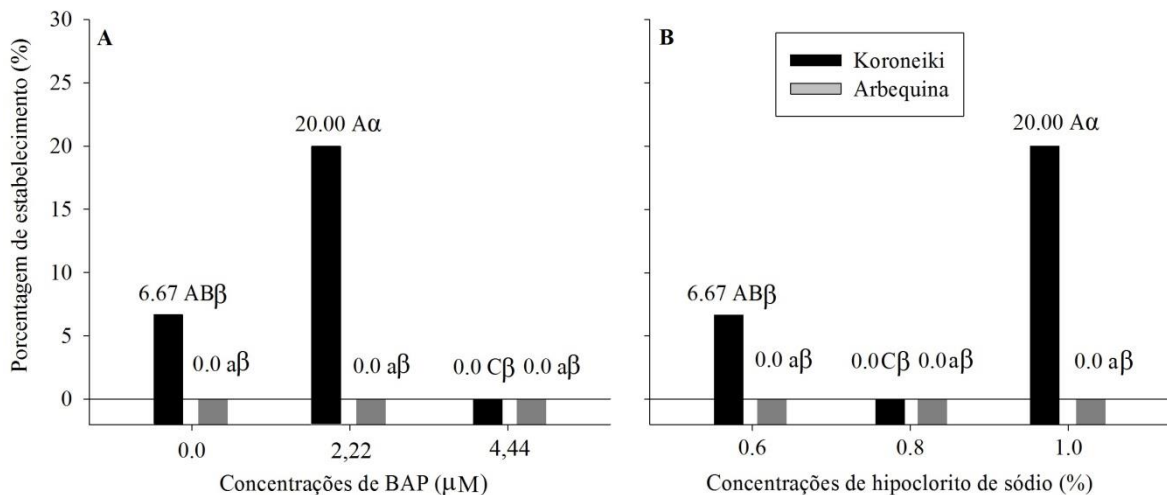


Figura 2 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de cultivares de *Olea europaea* L. submetidas a diferentes concentrações de BAP (A) e hipoclorito de sódio (B). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, médias seguidas da mesma letra minúscula e médias seguidas de mesma letra grega não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Valores de dados não transformados.

De acordo com o teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ) o T15 (Koroneiki + 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 1,0% de cloro ativo de hipoclorito de sódio) foi superior aos demais tratamentos, com somatório total igual a 21. Em contrapartida, o tratamento que proporcionou a menor ocorrência de contaminação foi o T4 (Arbequina + 2,22  $\mu\text{M}$  BAP + 0,6% hipoclorito de

sódio), com somatório total igual a 15 (Figura 3A). No entanto, em relação a variável ocorrência de oxidação, o T4 (Arbequina + 2,22  $\mu\text{M}$  + 0,6% hipoclorito de sódio) apresentou a maior média de oxidação em relação aos demais tratamentos, totalizando somatório de 44. O tratamento que apresentou menor somatório foi o T15 com total de 22 (Figura 3B). Este resultado refletiu diretamente na quantidade de plantas sobreviventes e estabelecidas (Figura 3C), obtendo-se destaque mais uma vez para o T15 (Koroneiki + 2,22  $\mu\text{M}$  BAP + 1,0 % de hipoclorito de sódio) com somatório de 21. O menor somatório de oxidação observado foi para o T15, apresentado por grande parte dos tratamentos estudados (T2; T3; T4; T5; T6; T7; T8; T9; T12 e T16). Foi possível observar que, dos tratamentos citados, apenas o T12 e o T16 são com a cultivar Koroneiki, o que demonstra expressiva influência do genótipo na oxidação.

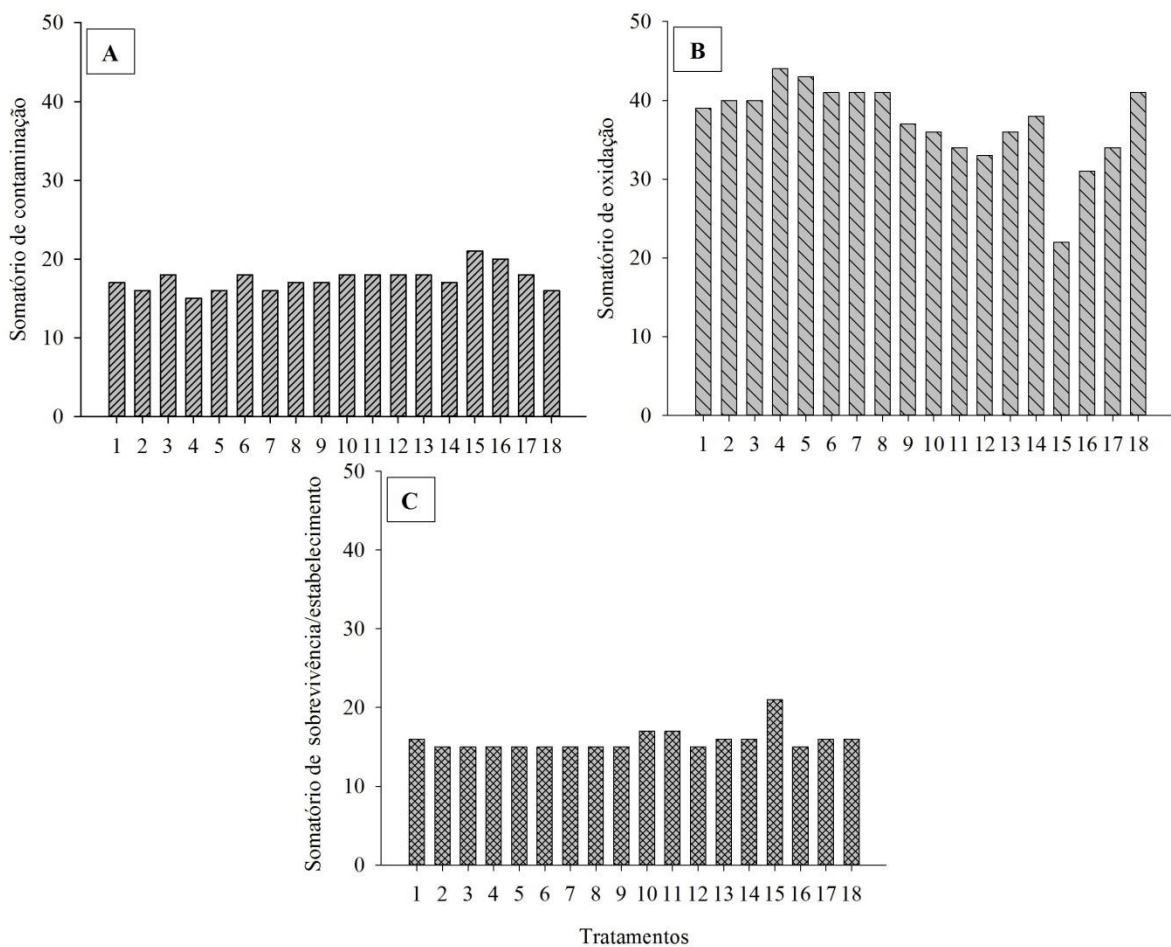


Figura 3 - Teste de Kruskal Wallis para os dados de somatório de contaminação fúngica (A), somatório de oxidação (B) e somatório de sobrevivência/estabelecimento (C) de segmentos nodais de cultivares de *Olea europaea* L. *in vitro*.





Figura 4 – Explantes de *Olea europaea in vitro* cv. Koroneiki: estabelecido (A), sobrevivente (B), 50 % oxidado (C) e (D) 100 % oxidado. Barra (5 mm).

### 3.6 DISCUSSÃO

A baixa porcentagem de contaminação obtida reflete a eficiência do método de desinfestação adotado neste estudo. O fato desta variável demonstrar resposta diferenciada entre as cultivares estudadas pode estar associado à suscetibilidade de alguns genótipos e à rusticidade de outros. Por exemplo, a cultivar Arbequina apresenta, entre outras características, boa adaptabilidade a diferentes condições ambientais e resistência ao ataque de pragas e doenças (DONINI et al., 2008a; COUTINHO et al., 2015). Segundo Andrezza et al. (2016) a sensibilidade ou resistência de um genótipo em relação a outro pode estar diretamente relacionado às características físico-químicas, o que lhe garante maior rusticidade, conferindo aumento na capacidade de resistir ao ataque de determinadas pragas e doenças. Moreira (2014) encontrou maior taxa de contaminação fúngica para a cultivar Maria da Fé quando comparado as demais (Ascolano, Leccino, Coratina, Arbequina e Frantoio). Entretanto, em desacordo com o que foi observado no presente trabalho, Donini et al. (2008b) observaram menores porcentagens de contaminação fúngica para a cultivar Koroneiki quando comparado as demais cultivares avaliadas (Picual e Frantoio). Estes resultados também podem ser justificados pelo fato de que ainda não exista um protocolo de desinfestação eficiente para esta cultivar.

Para a variável porcentagem de oxidação Donini et al. (2008b) observaram maior média para a cultivar Frantoio em relação às demais cultivares (Picual e Koroneiki). Os autores atribuíram este resultado às elevadas concentrações de compostos fenólicos totais e aos diferentes tipos de fenóis existentes nos tecidos do genótipo, que ao entrarem em contato

com o oxigênio, desencadeiam reações de oxidação resultando em produtos tóxicos ocasionando o escurecimento e necrose do tecido vegetal. Os resultados obtidos no presente trabalho condizem com os encontrados por Moreira (2014), no qual observou maior porcentagem de oxidação para a cultivar Arbequina em comparação às demais (Ascolano, Leccino, Coratina, Maria da Fé e Frantoio). A oxidação fenólica é um fenômeno relacionado ao metabolismo enzimático e é responsável por atribuir coloração marrom aos explantes. Segundo Bezerra et al. (2014), a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro* devido a células danificadas durante a excisão dos explantes, esses compostos são oxidados pelas enzimas polifenases e produzem substâncias tóxicas capazes de inibir o desenvolvimento dos explantes, o que também pode explicar a menor porcentagem de sobrevivência da cultivar que apresentou maior índice de oxidação observada neste trabalho. Tal reação é desencadeada pelo processo de senescência e injúria dos tecidos, porém a fisiologia da enzima responsável por estes efeitos ainda é um enigma no ponto de vista genético (COUTINHO et al., 2015).

A baixa taxa de sobrevivência observada no presente trabalho pode ser atribuída à grande ocorrência de oxidação dos explantes, principalmente da cultivar Arbequina. Além disso, conforme Navroski et al. (2015), essas variações de respostas entre genótipos de plantas lenhosas podem estar relacionadas às diferenças genéticas entre as matrizes ou ao balanço hormonal específico de cada indivíduo, sendo assim estas diferenças podem ter origem do controle genético ou dos diferentes ritmos endógenos da planta associados a fatores fisiológicos e morfológicos, pois estas flutuações podem ocorrer mesmo entre indivíduos intimamente aparentados de acordo com o funcionamento endógeno, considerando que ambas as cultivares estão acondicionadas no mesmo ambiente.

Mendes (2013) observou diferenças nas taxas de sobrevivência entre diferentes genótipos de citros (limoeiro ‘Cravo’ clone comum, citrange ‘Carrizo’ e LCREEL (TR X LCR) 001), o que também foi observado no presente estudo. O autor associou este desempenho desigual ao fato de que as condições para o desenvolvimento *in vitro* de uma espécie podem variar entre os genótipos, considerando que cada indivíduo apresenta características únicas determinadas por fatores genéticos e por isso suas exigências *in vitro* também tendem a serem únicas. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Donini et al. (2008b), no qual observaram maiores médias de sobrevivência para a cultivar Koroneiki em comparação às demais cultivares testadas (Picual e Frantoio).

Com base nos resultados, foi possível observar que a sobrevivência nem sempre indica bom estabelecimento, pois nem todos os propágulos sobreviventes se estabeleceram;

independente das concentrações de BAP e hipoclorito de sódio aplicadas, a baixa porcentagem de sobrevivência e o não estabelecimento dos propágulos da cultivar Arbequina podem estar associados à elevada porcentagem de oxidação observada para esta cultivar, salientando que grande parte dos explantes que não oxidaram apresentaram contaminação. Diferentemente do que foi observado para a cultivar Koroneiki, que apesar de expressar maior contaminação, demonstrou maior porcentagem de sobrevivência e estabelecimento dos propágulos. Moreira (2014) encontrou maior porcentagem de estabelecimento para a cultivar Arbequina em relação às demais, diferente do observado no presente trabalho.

Testes não paramétricos são muito utilizados principalmente em situações em que os dados de um experimento não seguem a normalidade ou homogeneidade de variâncias ou mesmo quando não é possível a aplicação de testes paramétricos, pela falta de informações a respeito da distribuição da população devido à dificuldade de se obter estimativas confiáveis dos parâmetros populacionais (PONTES & CORRENTE, 2001). A base dos testes não paramétricos está na ordenação (*ranks*) dos dados e não no seu valor intrínseco e na aleatorização, considerando todos os rearranjos possíveis dos dados. Perde-se em precisão, porém ganha-se em eficiência e facilidade na compreensão e interpretação dos resultados (PONTES & CORRENTE, 2001).

Foi possível observar pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ) que a cultivar Koroneiki apresentou melhores médias em relação à oxidação e sobrevivência/estabelecimento, o que depende substancialmente ao metabolismo do genótipo, rusticidade e capacidade de adaptação às diferentes condições de ambiente, entretanto a mesma cultivar demonstrou maior sensibilidade à contaminação, em comparação a Arbequina, como visto no teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Melhores médias relacionadas à assepsia e sobrevivência foram encontrados por Malyzs et al. (2011) para *Eucalyptus dunnii* quando utilizaram a concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio em comparação a concentração de 1,0% que refletiu em alto índice de mortalidade, em desacordo com o que foi observado neste trabalho para a cultivar Arbequina, porém estes resultados condizem com o que foi observado para a cultivar Koroneiki. Estas diferenças podem estar associadas à ocorrência de possível intoxicação dos explantes de Arbequina submetidos às concentrações de hipoclorito de sódio estudadas, fato que desencadeou maior ocorrência de oxidação fenólica e por consequência menor porcentagem de sobrevivência e estabelecimento dos propágulos desta cultivar.

O estabelecimento *in vitro* de oliveira apresentou resultados distintos entre as cultivares, considerando a combinação dos três fatores que constituíram o T15 (Koroneiki +

2,22  $\mu$ M BAP + 1,0% hipoclorito de sódio) pode-se identificar a concentração de BAP (2,22  $\mu$ M) e a concentração de hipoclorito de sódio (1,0% de cloro ativo) como adequadas para a cultivar Koroneiki, devido ao melhor desempenho desta, em relação às condições as quais foi submetida. No entanto, o mesmo desempenho não ocorreu quando esta mesma combinação de BAP e hipoclorito de sódio foi aplicada a cultivar Arbequina, resultando em elevada porcentagem de oxidação, o que indica a necessidade de se estabelecer um protocolo de estabelecimento *in vitro* para esta cultivar.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREAZZA, F.; BARONIO, C. A.; BOTTON, M; VALGAS, R. A.; RITSCHER, P. S.; MAIA, J. D. G.; NAVA, D. E. Suscetibilidade de bagas de genótipos de videira pela infestação por *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 599-606, 2016.

BEZERRA, R. M. de F.; ALOUFA, M. A. I.; FREIRE, F. A. M. de. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.

CANÇADO, G. M. A. de.; BRAGA, F. T.; SOUZA de, R. A. V.; NUNES, C. F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. Epamig, Lavras, 2010. 330 p. CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L.; LÚCIO, A. D.; LOPES, S. J. **Testes não paramétricos para pesquisas agrícolas**. Santa Maria: UFSM/CCR/Departamento de Fitotecnia, 2001. 87 p.

CARVALHO, S. M. S. da. **Cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa* H.B.K.** 2012. 53 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)- Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. Market Newsletter No. 121. Madrid, 2017. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/697-year-2017-news/909-market-newsletter-november-2017>. Acesso em: 19 dez. 2017.

COSTA, F. A. DA.; ARRIGONI-BLANK, M. DE. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B. DE.; AMANCIO, A. F.; LEDO, A. DA. S. . Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Aracaju, v. 25, n. 1, p. 068-072, 2007.

COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O.; HAERTER, J. A.; COSTA, V. B. (Org.). **Oliveira Aspectos Técnicos e Cultivo no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2015. 196 p.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F. DE.; SOUZA, J. A. DE.; SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 229-233, 2008. (b)

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F. de.; SOUZA de, J. A.; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequina” para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 38, n. 6, p. 1769-1772, set. 2008 (a).

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira “Arbequina”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, set., 2011.

ERIG, M. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociências**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 221-227, set. 2003.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011. Lavras, 2011.

REISSER JÚNIOR, C.; COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; ARÚJO de, F. A.; ALMEIDA de, I. R. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). **Embrapa Sistemas de Produção**, Pelotas, 2009.

LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MALYSZ, M.; CADORE, M.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Perspectiva**, Erechim, v. 35, n. 131, p. 69-77, 2011.

MENDES, M. I. DE. S. **Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de citros visando a obtenção de plantas livres de doenças**. 2013. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

MOREIRA, R. M. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de oliveira**. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015.

OLIVEIRA de, A. F.; VIEIRA NETO, J.; VILLA, F.; SILVA da, L. F. O de. Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 317-322, 2010.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11 ed. Piracicaba: ESALQ. 1985. 467 p.

PONTES, A. C. F.; CORRENTE, J. E. Comparações múltiplas não-paramétricas para o delineamento com um fator de classificação simples. **Revista Matemática e Estatística**, São Paulo, p. 179-197, 2001.

SANTOS dos, F. F.; BANDEIRA, J. M. de; MARINI, P.; MARTINS, A. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES de, D. M. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.

SOUZA de, R. A. V.; BRAGA, F. T.; AZEVEDO de; P. H.; FERREIRA, J. L.; CANÇADO, G. M. A. de. Efeito da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, 2012.

## 4 ARTIGO 2: REDUÇÃO DA OXIDAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA “ARBEQUINA” E “KORONEIKI”

### 4.1 RESUMO

A cultura de tecidos vegetais apresenta-se como um importante método para acelerar a multiplicação da espécie, propagando genótipos com elevada qualidade fitossanitária. Porém é sabido que plantas lenhosas, como a oliveira, apresentam certas restrições com relação ao estabelecimento *in vitro* principalmente pela ocorrência de oxidação fenólica, responsável por causar a necrose dos tecidos impedindo o desenvolvimento destas espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de duas cultivares de oliveira. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo (2x3), sendo duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki) e três agentes antioxidantes [PVP (2 e 20 g L<sup>-1</sup>); carvão ativado (2 e 20 g L<sup>-1</sup>) e ácido ascórbico (1 e 10 g L<sup>-1</sup>)] totalizando seis tratamentos, com cinco repetições. A unidade experimental consistiu de cinco tubos de ensaio com um explante cada. Os resultados permitiram concluir que a cultivar Arbequina é menos susceptível à oxidação, quando comparada a Koroneiki. O antioxidante ácido ascórbico na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> demonstrou ser mais eficiente na redução da oxidação de segmentos nodais jovens de oliveira ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’.

Palavras-chave: *Olea europaea*; cultivares; estabelecimento; antioxidantes.

### 4.2 ABSTRACT

Plant tissue culture is an important method to accelerate the multiplication of the species, propagating genotypes with high phytosanitary quality. However it is known that woody plants, as olive tree, have certain restrictions regarding *in vitro* establishment mainly due to the occurrence of phenolic oxidation, responsible for causing tissue necrosis preclude the development of these species. The objective of this work was to evaluate the effects of antioxidant agents in the *in vitro* establishment of two olive cultivars. The experiment was conducted on completely randomized design (CRD), in a double factorial scheme (2x3), being two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki) and three antioxidant agents PVP (2 and 20 g

L<sup>-1</sup>); activated charcoal (2 and 20 g L<sup>-1</sup>) and ascorbic acid (1 and 10 g L<sup>-1</sup>) totalizing six treatments, with five replicates. The experimental unit consisted of five test tubes with one explant each. Submitted to analysis of variance and Tukey's test at 5% probability. The results allowed to conclude that cultivar Arbequina is less susceptible to oxidation compared to cv. Koroneiki. The antioxidant ascorbic acid at the concentration of 1 g L<sup>-1</sup> was shown to be more efficient in controlling oxidation reduction of young nodal segments of olive trees 'Arbequina' and 'Koroneiki'.

Keywords: *Olea europaea*; cultivars; establishment; antioxidants.

### 4.3 INTRODUÇÃO

A oliveira é uma espécie perene, pertencente à família Oleaceae, cultivada e apreciada mundialmente principalmente pela sua grande importância no mercado alimentício, por seus produtos, o azeite e o fruto para consumo de mesa (SOUZA et al., 2012). Além disso, sua relevância também é atribuída às propriedades benéficas do azeite de oliva, no tratamento de doenças cardiovasculares, diminuição de riscos de cânceres (como os de mama e ovário) e de doenças degenerativas (hipertensão, reumatismo, osteoporose), maior controle da hiperglicemia nos diabéticos, melhorias na digestão, memória e longevidade, além de elevada capacidade antioxidante (DONINI et al., 2008; SILVA, 2008; WREGGE et al., 2009; OLIVEIRA, 2009).

A produção mundial de azeitonas é liderada atualmente pela União Europeia, responsável por 75% da produção onde a Espanha e a Itália se destacam por serem os países produtores mais importantes (AHMAD et al., 2016). O Brasil é um dos maiores importadores dos produtos da oliveira da América do Sul, sendo a Argentina um dos maiores fornecedores, além da Espanha e Portugal (DONINI et al., 2011). Atualmente no Rio Grande do Sul a Embrapa Clima Temperado vem desenvolvendo programas de adequação de tecnologias para a cultura da oliveira, com o intuito de dar suporte técnico aos olivais já implantados e de futuros empreendimentos, buscando obter melhorias na qualidade de produção (SANTOS et al., 2015). Em 2015 a Secretaria da Agricultura e Pecuária - RS lançou o programa Pró-Oliva com o objetivo de fomentar, apoiar e consolidar a olivicultura no Estado, que até o final de 2016, contava com aproximadamente 2.000 ha plantados envolvendo cerca de 160 produtores, especialmente dos municípios da metade sul como Caçapava do Sul, Pinheiro Machado, Cachoeira do Sul e Santana do Livramento (Secretaria da Agricultura e Pecuária Governo do



Estado do Rio Grande do Sul, 2017). Porém, apesar deste avanço, a área plantada e a produção representam muito pouco perto da demanda existente no mercado nacional.

Entre as cultivares que mais se destacam na região Sul encontram-se a cultivar de origem grega Koroneiki e a cultivar espanhola Arbequina por serem consideradas promissoras para a produção de azeite. Este destaque se deve a características como considerável vigor vegetativo, precocidade de produção, elevado rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças, além de possuir resistência à seca e produtividade elevada e constante (SANTOS et al., 2015).

Geralmente a propagação da oliveira baseia-se em métodos convencionais como estaquia ou enxertia, porém as inúmeras variações no potencial de enraizamento ocasionadas pelas oscilações sazonais e a dificuldade de se encontrar material em condições fitossanitárias adequadas faz surgir a necessidade de um método eficiente de propagação em massa (MANGAL et al., 2014). Para isso, a cultura de tecidos vegetais apresenta-se como um método para acelerar a multiplicação da espécie ou até mesmo para a produção de novos genótipos (SOUZA et al., 2013) com elevada qualidade fitossanitária. O rejuvenescimento e/ou revigoração do material vegetal pode ser obtido através dos inúmeros e sucessivos subcultivos *in vitro*, por meio da proliferação de gemas axilares, promovendo a homogeneização fisiológica dos tecidos em relação ao potencial de enraizamento e à qualidade do sistema radicular (OLIVEIRA, 2011). É o método considerado mais adaptado para espécies de difícil propagação através de técnicas convencionais, o que limita a multiplicação em grande escala (SOUZA et al., 2006).

Para que se alcance os resultados esperados nesta técnica, torna-se necessário um bom protocolo de estabelecimento *in vitro* da espécie que se deseja estudar, para isso há de se testar experimentalmente as condições de cultivo às quais os propágulos serão submetidos. De acordo com Costa et al. (2007) plantas lenhosas apresentam certas restrições com relação a esta fase do cultivo *in vitro* principalmente pela ocorrência de oxidação devido à liberação de compostos fenólicos, os quais podem modificar a composição do meio além de dificultar a absorção dos metabólitos. Substâncias antioxidantes, como ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado, são comumente utilizadas para minimizar estes efeitos indesejados, inibindo a ação dos exsudatos liberados pelo explante, dos metais presentes no meio e demais compostos oxidantes (MELO et al. 2001).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* das cultivares de oliveira ‘Koroneiki’ e ‘Arbequina’.

## 4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.4.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo

Como fonte de explantes para este experimento foram utilizadas segmentos nodais de brotações jovens de *Olea europaea* cvs. Koroneiki e Arbequina localizadas a campo nas dependências da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* de Frederico Westphalen – RS, com coordenadas geográficas: 27° 23' 48'' de latitude sul, 53° 25' 45'' de longitude oeste e altitude de 490 m. Antes da coleta do material, semanalmente, estas matrizes foram pulverizadas com fungicida Cercobin<sup>®</sup> 700WP na concentração de 0,7 g L<sup>-1</sup> com o intuito de reduzir a ocorrência de contaminação em condições de isolamento.

Após corte, os segmentos nodais foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio (0,2% de cloro ativo) e ácido ascórbico (1 g L<sup>-1</sup>). Em seguida foram retiradas 1/3 das folhas e então deixado sob água corrente por aproximadamente uma hora. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução de álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (1,0% de cloro ativo) e duas gotas de Tween 20 por 15 minutos, mantidos sob agitação constante. Em seguida o material foi lavado três vezes em água destilada esterilizada por cerca de cinco minutos cada. Os segmentos nodais foram reduzidos para aproximadamente 1,0 cm, contendo de um a dois entrenós cada, sendo inoculados em tubos de ensaio de vidro (15 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio inositol e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de agar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de autoclavado a 120 °C, 108 kPa, por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, mantidos no escuro por sete dias, com seguida transferência para ambiente com irradiância luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provenientes de lâmpadas fluorescentes (OSRAM<sup>®</sup>, Luz do dia), com fotoperíodo de 16 horas de luz, permanecendo nessas condições por 30 dias. Após este período foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de oxidação aos sete dias após isolamento (7 DAI), aos 14 dias após isolamento (14 DAI) e aos 21 dias após isolamento (21 DAI).

### 4.4.2 Análise Estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x3, sendo duas cultivares (Arbequina e Koroneiki) e três agentes antioxidantes (PVP, carvão ativado e ácido ascórbico), constituindo 6 tratamentos (Tabela 1), compostos de cinco repetições cada, assim a unidade experimental foi representada por cinco tubos de ensaio com um explante cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR (FERREIRA, 2011) e as variáveis comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 1 – Diferentes agentes antioxidantes adicionados ao meio de cultura WPM no controle da oxidação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cultivares Arbequina e Koroneiki.

Tratamentos	Cultivares	Agentes Antioxidantes (A.A)
T1	Arbequina/Koroneiki	2 g L <sup>-1</sup> PVP (A.A 1)
T2	Arbequina/Koroneiki	20 g L <sup>-1</sup> PVP (A.A 2)
T3	Arbequina/Koroneiki	2 g L <sup>-1</sup> C. Ativ. (A.A 3)
T4	Arbequina/Koroneiki	20 g L <sup>-1</sup> C. Ativ. (A.A 4)
T5	Arbequina/Koroneiki	1 g L <sup>-1</sup> Ác. Asc. (A.A 5)
T6	Arbequina/Koroneiki	10 g L <sup>-1</sup> Ác. Asc. (A.A 6)

#### 4.5 RESULTADOS

De acordo com análise de variância foi possível observar que houve diferença significativa apenas para os fatores isolados, para o fator cultivares (Arbequina e Koroneiki) e para o fator agentes antioxidantes (PVP; carvão ativado e ácido ascórbico) em todas as variáveis analisadas.

Quando comparado o fator cultivares, foi possível observar que a Arbequina apresentou as menores médias de oxidação para 7 DAI, 14 DAI e 21 DAI (40,0, 42,7 e 50,7%, respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (Figuras 1A; 1C e 1E).

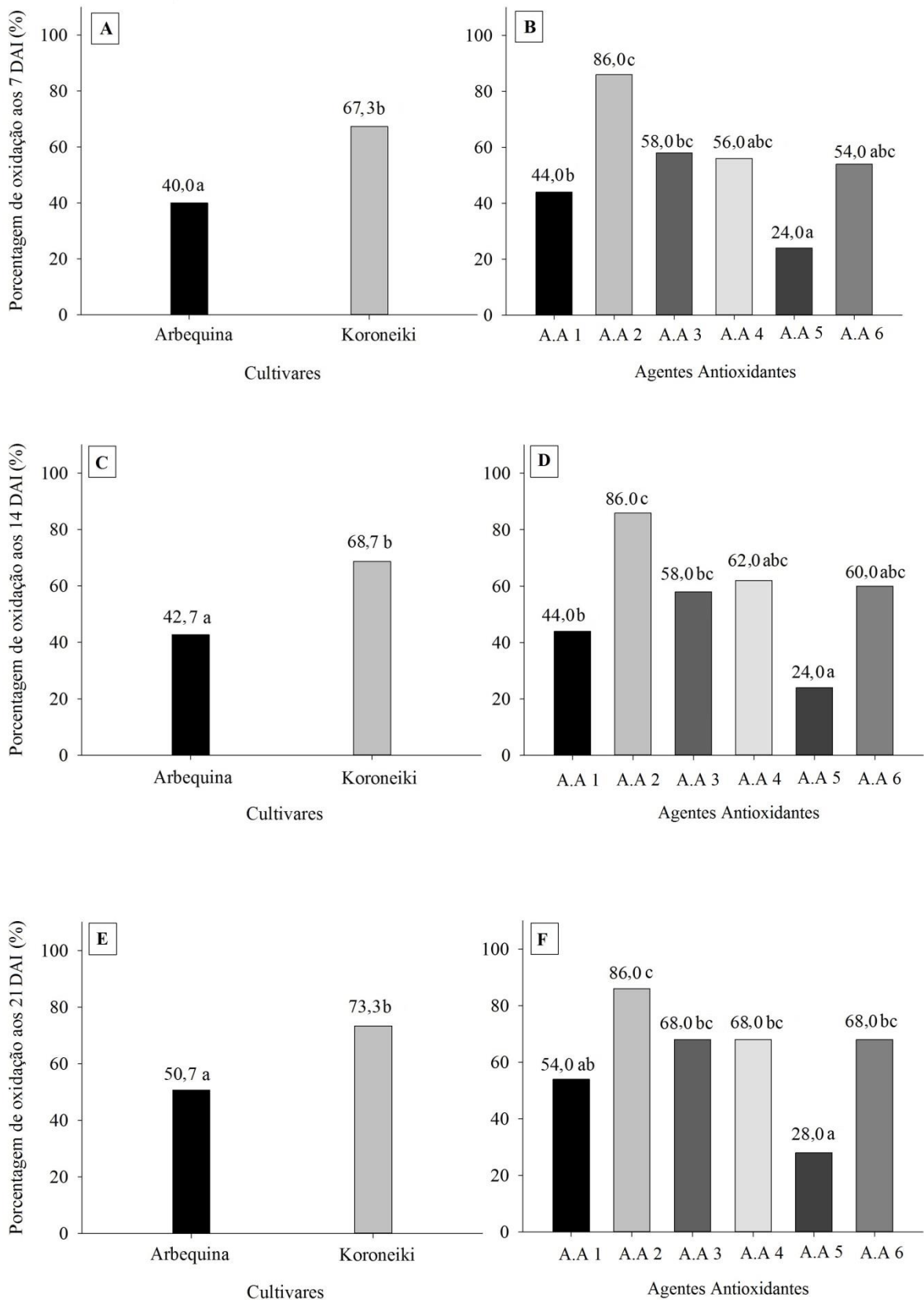


Figura 1 – Porcentagem de oxidação em explantes de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea*), cultivados *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes agentes

antioxidantes (A.A), aos 7 DAI (A e B), 14 DAI (C e D) e 21 DAI (E e F). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação ao fator agentes antioxidantes, foi possível observar que o A.A 5 (1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico) foi superior significativamente apenas ao A.A 1, A.A 2 e A.A 3, para as variáveis 7 DAI e 14 DAI, alcançando médias de 24,0 e 28,0% de oxidação, respectivamente, não diferindo significativamente apenas do A.A 4 (20 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado) e do A.A 6 (10 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico). Já aos 21 DAI, o A.A 5 não diferiu apenas do A.A 1 (2 g L<sup>-1</sup> de PVP), sendo superior significativamente quando comparado aos demais tratamentos, no qual manteve média de 28,0% de oxidação (Figuras 1B, 1D e 1F). A maior porcentagem de oxidação foi observada no A.A 2 (20 g L<sup>-1</sup> de PVP) que manteve a média de 86,0% em todos os períodos de avaliação. Na Figura 2, pode-se visualizar a aparência dos explantes aos 21 DAI, para ambas as cultivares, quando submetidos ao A.A 5 (Figuras 2A e 2C) e ao A.A 2 (Figuras 2B e 2D).

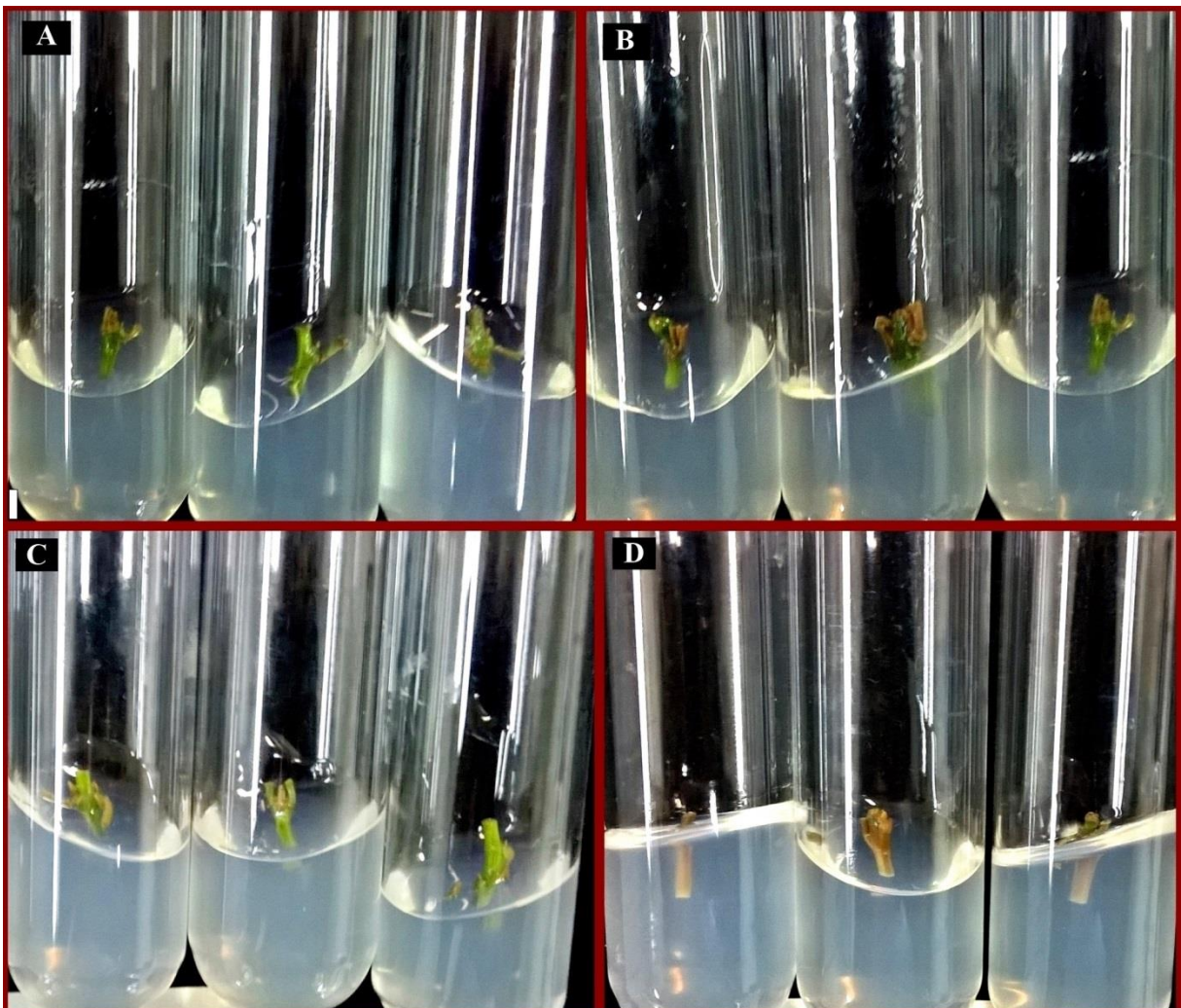


Figura 2 – Explantes de oliveira (*Olea europaea*) cvs. Arbequina (A e B) e Koroneiki (C e D) cultivadas *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (A.A 5) (A e C) e com 20 g L<sup>-1</sup> de PVP (A.A 2) (B e D) aos 21 DAI. Barra (5 mm).

#### 4.6 DISCUSSÃO

A oxidação fenólica é uma das limitações mais comuns encontradas na propagação *in vitro*, principalmente quando envolve espécies lenhosas, devido à liberação de compostos fenólicos levando a morte do material vegetal (SARTOR et al., 2013). De acordo com Bassan et al. (2006), nestas espécies ocorre um acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada que alteram a composição do meio de cultura comprometendo a absorção de metabólitos. Os mesmos autores relatam ainda que cada genótipo pode reagir de maneira específica, liberando maior ou menor quantidade destes compostos, dependendo das características intrínsecas da planta (genótipo, idade e condições fisiológicas).

A maior porcentagem de oxidação observada neste trabalho para a cultivar Koroneiki indica a maior suscetibilidade desta quando comparada a Arbequina, o que pode estar intimamente relacionado a característica de cada genótipo, como mencionado anteriormente. Segundo Freitas et al. (2009) cada genótipo pode responder de maneira diferente, sendo alguns mais sensíveis a oxidação do que outros. A variabilidade dos resultados entre as cultivares observada neste trabalho, também pode ser justificada por questões relacionadas a maior concentração de compostos fenólicos presentes em explantes da cultivar Koroneiki, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, como as citocininas, por exemplo, que dependendo da sua concentração endógena na planta pode induzir a síntese destes compostos; que ao entrarem em contato com o oxigênio oxidam causando o escurecimento e necrose do tecido vegetal (BASSAN et al., 2006; DONINI et al., 2008).

Avaliando o estabelecimento *in vitro* de *Diospyros kaki*, Biasi et al. (1999) não observaram efeitos antioxidantes de PVP na concentração de 10 e 20 g L<sup>-1</sup>, tais resultados corroboram com o que foi encontrado no presente trabalho, onde também não se observou efeito antioxidante de PVP (20 g L<sup>-1</sup>) independente do período de avaliação. Em contrapartida, Costa et al. (2007) obtiveram resultados satisfatórios com *Lippia sidoides* utilizando PVP (0,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultura, reduzindo até 50% da oxidação fenólica dos explantes. Comprovando que a eficiência do antioxidante utilizado pode variar de acordo com a concentração e genótipo em estudo. A elevada porcentagem de oxidação observada para o antioxidante PVP neste trabalho indica a baixa eficiência deste componente, nas

concentrações testadas, para as cultivares em questão. Melo et al. (2001), assim como neste trabalho, obtiveram baixa eficiência antioxidante de PVP em comparação ao carvão ativado e ácido ascórbico no desenvolvimento *in vitro* de *Syagrus oleracea*.

O aumento da porcentagem de oxidação observado para os tratamentos com PVP e ácido ascórbico, quando se elevou a concentração destes em 10 vezes, deixou evidente, neste trabalho, que ambos em elevadas concentrações, tiveram seu potencial antioxidante comprometido, provavelmente pela ocorrência de uma possível toxidez aos propágulos. Entretanto, esta diferença não pode ser observada nos tratamentos com carvão ativado, que mesmo aumentando a concentração para 20 g L<sup>-1</sup> manteve praticamente a mesma porcentagem de oxidação comparada à concentração de 2 g L<sup>-1</sup>, independente do período de avaliação. Costa et al. (2007), no cultivo *in vitro* de *Lippia sidoides*, ao elevarem a concentração de carvão ativado de 3,0 para 12 g L<sup>-1</sup> obtiveram 100% de controle da oxidação. Sartor et al. (2013) afirmam que algumas plantas lenhosas podem exigir maiores concentrações do antioxidante para que este seja efetivo no combate ou diminuição de fenóis; estes mesmos autores não observaram diferenças significativas quando compararam os antioxidantes carvão ativado e PVP, apesar dos tratamentos com este último apresentarem maior ocorrência de oxidação dos explantes de *Dalbergia nigra*. Paiva et al. (2007) encontraram maiores reduções da oxidação de *Strelitzia reginae in vitro* quando submetida a 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado adicionados ao meio de cultivo.

Resultados positivos, com carvão ativado, foram obtidos por Freitas et al. (2009) com a espécie *Aloysia virgata*. Os mesmos autores relatam que a utilização de carvão ativado no controle da oxidação fenólica *in vitro* é bastante comum na cultura de tecidos, pois pode evitar o acúmulo de inibidores fenólicos. Segundo Cid et al. (2015) o carvão ativado adicionado ao meio nutritivo é considerada uma ferramenta eficiente no controle da oxidação, por possuir propriedades adsorventes, no caso de exsudatos fenólicos, e pela capacidade de fixar o cobre tornando inativa a enzima polifenoloxidase (PPO) responsável pela reação de oxidação.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Gonçalves et al. (2013), quando utilizaram ácido ascórbico, sendo possível observar menor ocorrência de oxidação fenólica ao utilizar este antioxidante na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> adicionado ao meio de cultura quando comparado ao uso de carvão ativado, no estabelecimento *in vitro* de *Olea europaea*. Elevada eficiência do ácido ascórbico (1 g L<sup>-1</sup>) no controle da oxidação também foi observada por Cordeiro et al. (2003) no cultivo *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* quando comparado ao PVP (1 g L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (1 g L<sup>-1</sup>). No entanto, Erig e Schuch (2003) não

observaram efeitos significativos no controle da oxidação de *Malus domestica* utilizando quando utilizaram ácido ascórbico nas concentrações de 0, 50; 100; 150 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que as cultivares de oliveira, Arbequina e Koroneiki, são sensíveis à oxidação fenólica. O antioxidante ácido ascórbico, na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>, demonstrou ser eficiente no controle da oxidação de explantes destas cultivares. No entanto, os antioxidantes testados neste trabalho apenas reduziram a ocorrência de oxidação em oliveira, porém não a impediram de ocorrer. Isso implica na hipótese de que haja possível influência de outros fatores como intensidade luminosa, concentração de sais no meio de cultura e idade fisiológica do explante, sendo assim, torna-se necessária a realização de estudos mais aprofundados considerando tais fatores.

#### 4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; KHAN, N.; FAHAD A.; RAHMAN, K. U.; BAHADAR, S.; KHAN, M. I.; JAN, S. U.; BAHADAR, R.; REHMAN, Z.; ZARDAD, R.; HUBAB, M.; ZAHOOR, S.; HAYAT, A.; ANWAR, M. Comparison of different parameters for the *in vitro* propagation of various cultivars of olive (*Olea Europaea L.*). **International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy**, v. 6, n. 1, 2016.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, 2006.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; ANDRADE, A.; ZANETTE, F. Estabelecimento *in vitro* do caqui 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 3, p. 279-283, 1999.
- CID, L. P. B.; BRASILEIRO, A. C. M.; DURZAN, D. J.; LEMOS, E. E. P. DE.; ARAGÃO, F. J. L.; COSTA, F. H. DA. S.; TEIXEIRA, J. B.; SCHERWINSK-PEREIRA, J. E.; SORIANO, L.; CORDEIRO, M. C. R.; ZIMMERMANN, M. J. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4 ed. Brasília: Embrapa, 2015. (E-book).
- CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. DA. C.; REIS, L. R. S.; REIS, I. N. R. DE. S. Ação de diferentes antioxidantes no controle da oxidação de segmento caulinar de paricá (*Shizolobium amazonicum* Huber Ex. Ducke). In: Congresso brasileiro de melhoramento de plantas, 2., 2003, Porto Seguro/BA. **Anais...Porto Seguro/BA: Melhoramento da qualidade de vida**, 2003.
- COSTA, A. S. DA.; ARRIGONI-BLANK, M. DE. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B. DE.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. DA. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, jan./mar., 2007.



- DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação de oliveira 'Arbequina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.
- DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. DE. F.; SOUZA, J. A. DE.; SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 299-233, 2008.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2007.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011. Lavras, 2011.
- FREITAS, R. M. O. DE.; OLIVEIRA, M. K. T. DE.; DOMBROSKI, J. L. D.; CÂMARA, F. A. A.; SILVA NETO, R. V. DA. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, 2009.
- GONÇALVES, T. S.; BARBOSA, W. M.; NANNETTI, N. C.; SANTOS, L. G. M. DOS; CAPRONI, D. T. R.; MELO, F. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. In: 5º Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS, 2013, Inconfidentes/MG. **Anais... Inconfidentes/MG: Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais**, 2013. Disponível em:<<https://jornada.ifsuldeminas.edu.br/index.php/jcinc/jcinc/paper/viewFile/266/119>>. Acesso em: 22 dez. 2017.
- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**. v. 30, p. 421-427, 1980.
- MANGAL, M.; SHARMA, D.; SHARMA, M.; KUMAR, S. *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, 'Frontio' from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, p. 912-916, 2014.
- MELO, B. DE.; PINTO, J. E. B. P; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, J. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guabirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.
- OLIVEIRA, M. C. DE. **Enraizamento de estacas de oliveira submetidas a aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2009.
- OLIVEIRA, L. S. DE. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011.

PAIVA, P. D. DE. O; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Controle de oxidação no cultivo *in vitro* de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n. 2, p. 107-112, 2007.

SANTOS, F. F. DOS.; BANDEIRA, J. DE. M.; MARIANI, P.; MARTINS, A. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES, D. M. DE. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E IRRIGAÇÃO-RS. **Programa estadual de olivicultura – PRÓ-OLIVA**. Porto Alegre, 2017.

SILVA, A. A. F. **Necessidades hídricas e respostas da oliveira (*Olea europaea* L.) ao déficit hídrico na região da terra quente**. 2008. 252 p. Tese. (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro. Vila Real, 2008.

SOUZA, R. A. V. DE.; BRAGA, F. T.; AZEVEDO, P. H. DE.; FERREIRA, J. L.; CANÇADO, G. M. DE. A. Efeitos da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, 2012.

SOUZA, R. A. V. DE.; BRAGA, F. T.; SETOTAW, T. A.; VIEIRA NETO, J.; AZEVEDO, P. H. DE.; CANÇADO, G. M. DE. A. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 290-296, 2013.

SOUZA, J. A. DE.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. DE. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz de araçazeiro cv. “Irapuã”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, 2006.

WREGGE, M. S. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa clima temperado, 2009. 125 p. (Embrapa clima temperado. Sistemas de produção, 16).

## 5 DISCUSSÃO GERAL

As baixas porcentagens de contaminação fúngica observadas neste trabalho para ambas as cultivares, demonstraram que substâncias a base de hipoclorito de sódio são eficazes no processo de assepsia dos explantes de oliveira. Porém, dependendo da concentração utilizada, fez com que as duas cultivares respondessem de maneira diferenciada aos tratamentos. A cultivar Arbequina apresentou menor porcentagem de contaminação, possivelmente por possuir características como maior rusticidade e adaptabilidade a diferentes ambientes. Já a cultivar Koroneiki demonstrou-se mais sensível, havendo a necessidade de se testar outras concentrações de hipoclorito de sódio no processo de desinfestação, a fim de se desenvolver um protocolo eficiente de estabelecimento *in vitro* para esta cultivar.

Apesar da cultivar Koroneiki apresentar-se superior quando comparada a Arbequina, com uma pequena porcentagem de estabelecimento, ainda assim foi possível avaliar que o regulador de crescimento BAP, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não estimularam o desenvolvimento adequado da parte aérea dos propágulos como se esperava, possivelmente por não haver equilíbrio entre as concentrações aplicadas e os níveis endógenos de citocinina presentes na planta que são ideais para emissão da parte aérea. Isso implica na necessidade da realização de novos experimentos com outras concentrações deste regulador, bem como, com outras citocininas buscando obter melhores respostas para esta variável e garantir a micropropagação destas cultivares.

As espécies lenhosas também apresentam dificuldades de estabelecimento *in vitro* pela alta ocorrência de oxidação quando submetidas àquelas condições. Alguns genótipos respondem mais sensivelmente do que outros, devido a características intrínsecas ao genótipo, maior ou menor concentração de compostos fenólicos presente nos tecidos, dentre outros. Foi o que possivelmente ocorreu no artigo 1, no qual a cultivar Arbequina apresentou maior tendência à oxidação do que a Koroneiki, o que certamente comprometeu a sobrevivência em condições de cultivo *in vitro*.

A eficiência dos agentes antioxidantes na redução ou no combate a oxidação também é diferenciada conforme o genótipo, sendo que uns necessitam de concentrações mais elevadas destes agentes do que outros, para tornarem-se efetivos. De maneira geral, os antioxidantes PVP, carvão ativado e ácido ascórbico demonstraram efeitos positivos na redução da oxidação tanto em Arbequina quanto em Koroneiki. Entretanto, a Arbequina demonstrou-se menos sensível a oxidação, provavelmente por características genótípicas intrínsecas a esta cultivar, como por exemplo, maior rusticidade e menor concentração de compostos oxidantes presentes

em seus tecidos. Além disso, foi possível observar no segundo trabalho que dos antioxidantes testados o ácido ascórbico foi mais eficiente para ambas as cultivares, principalmente na menor concentração utilizada, o que se deve a capacidade deste componente de reagir com os produtos da oxidação reduzindo seus efeitos.

O fato das cultivares estudadas neste trabalho apresentarem respostas diferenciadas quanto à susceptibilidade aos efeitos da oxidação fenólica, onde no primeiro trabalho a cv. Koroneiki demonstrou-se mais resistente do que a Arbequina, demonstrando comportamento inverso no segundo trabalho, sugere a realização de novos experimentos para verificar a influência de outros fatores como, por exemplo, a procedência do material vegetal, idade e época de coleta.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

As cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki possuem dificuldades para se estabelecer nas condições *in vitro*, devido principalmente à contaminação fúngica e oxidação fenólica dos explantes.

A utilização de soluções a base de hipoclorito de sódio na concentração de 1% de cloro ativo é eficiente na redução da contaminação *in vitro* de oliveira, cultivares Arbequina e Koroneiki.

A concentração de BAP 2,22  $\mu\text{M}$  foi eficiente para o início da emissão dos primórdios foliares de oliveira cultivar Koroneiki.

As concentrações de BAP testadas neste trabalho não foram eficientes no estabelecimento *in vitro* de oliveira cultivar Arbequina.

A cultivar Arbequina é menos sensível aos efeitos da oxidação fenólica.

O agente antioxidante ácido ascórbico 1 g L<sup>-1</sup> foi eficiente no controle da oxidação fenólica de oliveira, cultivares Arbequina e Koroneiki.

Há necessidade da realização de novos testes objetivando desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro* de oliveira para as cultivares Arbequina e Koroneiki, para fins de micropropagação.