

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS FREDERICO WESTPHALEN
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Maitê Luana Weber

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESINFESTAÇÃO
SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE *Olea europaea* L.**

Frederico Westphalen, RS
2021

Maitê Luana Weber

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESINTESTAÇÃO SUPERFICIAL
DE SEGMENTOS NODAIS DE *Olea europaea* L.**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Curso de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) – *Campus* Frederico Westphalen, como requisito parcial para obtenção do título de **Engenheira Florestal**.

Orientador: Prof. Dr. Nilton César Mantovani

Frederico Westphalen, RS
2021

Maitê Luana Weber

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL
DE SEGMENTOS NODAIS DE *Olea europaea* L.**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Curso de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) – *Campus* Frederico Westphalen, como requisito parcial para obtenção do título de **Engenheira Florestal**.

Aprovado em (dia) de (mês) de 2021:

Eng. Florestal Dr. Nilton Mantovani (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Eng. Florestal Ma. Denise Gazzana
(Membro da banca)

Eng. Florestal Chakira Londero
(Membro da banca)

Frederico Westphalen, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por ter me iluminado e abençoado durante a minha jornada.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Áuria e meu pai Hilberto por todo o apoio, amor e carinho, pois nunca mediram esforços para me ajudar. Vocês são meu bem mais precioso.

As minhas irmãs Miriam e Marcí, obrigada por estarem comigo me incentivando, vocês são e sempre serão meus espelhos.

Aos meus amigos Ana Paula, Claiton e Emerson, por todos os momentos compartilhados nestes cinco anos e em especial a nossa amizade. Levarei vocês eternamente no meu coração.

Aos meus colegas de turma, curso e de universidade por todo apoio e ajuda a mim prestados.

A cada um de meus Professores, por todos os ensinamentos, carinho e dedicação. Vocês são pessoas e profissionais excelentes!

Em especial ao meu orientador Nilton Mantovani, pelas orientações, pela dedicação, ajuda, paciência e por toda compreensão no decorrer desta jornada.

RESUMO

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE *Olea europaea* L.

AUTOR: Maitê Luana Weber
ORIENTADOR: Nilton César Mantovani

Considerando a relevante importância econômica e farmacêutica da oliveira (*Olea europaea* L.), a espécie vem sendo amplamente cultivada em vários países do mundo. Desta forma, a busca por métodos de propagação que forneçam maior produtividade em menor espaço de tempo vem sendo objetivo de pesquisas nos dias atuais. A micropropagação apresenta-se como alternativa viável devido a características tais como aumento da qualidade genética e ganhos relativamente rápidos em produtividade. No entanto, existem muitas dificuldades nos processos de desinfestação superficial dos segmentos nodais, utilizados como explantes, que afetam significativamente a eficiência desta técnica de clonagem. Desta forma, o estabelecimento de protocolo para promoção da desinfestação de segmentos nodais de duas cultivares de oliveira (Arbequina e Picual) através de experimentos com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, lysoform e ciclozyme em diferentes tempos de imersão e submissão dos explantes a descargas elétricas foi o objetivo deste trabalho. Para isto, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com número de tratamentos e repetições diferenciado para cada experimento. Não foram encontrados resultados eficazes das descargas elétricas + tratamento de desinfestação padrão na descontaminação dos explantes, no entanto sugere-se que a voltagem utilizada ou o tempo de submissão as descargas não tenham sido suficientes para a promoção da desinfestação. Ao final das avaliações foi constatada a efetividade da aplicação dos desinfestantes, sendo a maior taxa de explantes axênicos (70%) foi obtida no tratamento NaOCl + lyzoform + ciclozyme em conjunto por 10 minutos e com explantes provenientes de jardim clonal. No entanto, este tratamento não foi responsável pela maior taxa de responsividade dos explantes, sendo o tratamento com NaOCl + lyzoform + ciclozyme com explantes de mesma procedência pelo período de 2 minutos responsável pela maior taxa de 23,3%.

Palavras-chave: Oliveira; Contaminação; Micropropagação.

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF PROTOCOL FOR SUPERFICIAL DESINFESTATION OF NODAL SEGMENTS OF *Olea europaea* L.

AUTHOR: Maitê Luana Weber
ADVISOR: Nilton César Mantovani.

Considering the relevant economic and pharmaceutical importance of the olive tree (*Olea europaea* L.), the species has been widely cultivated in several countries around the world. In this way, the search for propagation methods that provide greater productivity in a shorter time has been the objective of current research. Micropropagation presents itself as a viable alternative due to characteristics such as increased genetic quality and relatively fast gains in productivity. However, there are many difficulties in the process of superficial disinfection of nodal segments, used as explants, which significantly affect the efficiency of this cloning technique. In this way, the establishment of a protocol to promote the disinfection of nodal segments of two olive cultivars (Arbequina and Picual) through experiments with different concentrations of sodium hypochlorite, lysoform and cyclozyme at different immersion times and submission of the explants to electrical discharges was the objective of this work. For this, an entirely randomized design (DIC) was used with different numbers of treatments and repetitions for each experiment. No effective results were found for the electrical discharges + standard disinfection treatment in the decontamination of explants, however, it is suggested that the voltage used or the time of exposure to discharges were not sufficient to promote disinfection. At the end of the evaluations, the effectiveness of the application of disinfectants was verified, with the highest rate of axenic explants (70%) being obtained in the NaOCl + lysoform + cyclozyme treatment together for 10 minutes and with explants from the clonal garden. However, this treatment was not responsible for the highest rate of responsiveness of the explants, being the treatment with NaOCl + lysoform + cyclozyme with explants from the same source for the period of 2 minutes responsible for the highest rate of 23.3%.

Keywords: Oliveira; Contamination; Micropropagation;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	JUSTIFICATIVA E REFERENCIAL TEÓRICO	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	16
4.2	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	17
4.3	MEIO DE CULTURA	18
4.4	DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	19
4.4.1	EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESCARGAS ELÉTRICAS EM CUBA DE ELETROFORESE NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E BACTERIANA DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA	19
4.4.2	EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES DESINFESTANTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE ÁRVORES MATRIZES À CAMPO	20
4.4.3	EXPERIMENTO 3 – EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE JARDIM CLONAL	21
4.5	CONDIÇÕES DE CULTIVO	22
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, A VALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESCARGAS ELÉTRICAS EM CUBA DE ELETROFORESE NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA.....	25
5.2	EXPERIMENTO 2 - EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES DESINFESTANTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE ÁRVORES-MATRIZES À CAMPO.....	26

5.3	EXPERIMENTO 3 EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE JARDIM CLONAL	28
6	CONCLUSÃO	37

1 INTRODUÇÃO

A família botânica Oleaceae abrange diversas espécies que estão distribuídas por regiões tropicais e temperadas do mundo. Esta família é formada por um conjunto de árvores, arbustos e até em raros casos espécies de hábito trepador, e contempla cerca de 30 gêneros. No entanto, poucas são as espécies desta família de relevante interesse econômico e hortícola, sendo a *Olea europaea* L., conhecida popularmente como oliveira a única espécie a produzir fruto comestível (COUTINHO, et al. 2009).

A árvore apresenta porte mediano, de 7-11 m, de tronco liso nos primeiros anos, pardo acinzentado e posteriormente adquire tom pardo amarelado ligeiramente rugoso. Suas folhas, de formato lanceolado, apresentam coloração verde escura na superfície superior enquanto sua superfície inferior apresenta-se na coloração prateada, com aspecto brilhante e margem inteira, podendo seu comprimento e largura ser variável. Produz frutificação em uma drupa, com endocarpo duro (caroço) e mesocarpo carnudo e suculento, cuja cor varia dependente da maturação. (LOBO, 2009).

Originária da região geográfica que vai desde o Sul do Caucásio, estendendo-se por todos os países que margeiam o Mediterrâneo, o cultivo da oliveira remonta cerca de 6.000 anos atrás (COUTINHO, et al., 2009). Ainda de acordo com os autores, no Brasil, o cultivo da oliveira é relativamente recente, ocorrendo com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste do país, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Para o cultivo desta espécie, o prévio conhecimento da finalidade do olival é determinante na escolha das cultivares a serem produzidas (SANTOS, et al. 2019). Para a produção de azeite, as cultivares Arbequina, Picual, Koroneiki, Frantoio, Arbosana e Galega (Alto D'Ouro) são as mais indicadas, as cultivares Ascolana, Cordovil de Serpa e Manzanilla de Sevilla, são indicadas para a produção do fruto de mesa, enquanto a cultivar Hojiblanca é indicada para ambos (CAPPELLARO, et al, 2009).

Já a produção de mudas, no Brasil ocorre predominantemente, via seminal. No entanto, apesar do fornecimento de sementes viáveis, a reprodução sexual é considerada indesejada para plantios comerciais, visto a alta variabilidade genética além de apresentar longo período juvenil (RIBEIRO, et al. 2009).

Com isso, foram impulsionados estudos para o desenvolvimento de outros meios de propagação desta espécie.

A estaquia é um dos métodos mais empregado para a propagação da oliveira, no entanto o sistema tradicional de propagação por estaquia requer muito material vegetativo (PIO, et al., 2005), além de apresentar baixo índice de enraizamento de estacas. Uma alternativa para esta técnica, é o método de mini estaquia utilizando-se jardins clonais, pois tem possibilitado o resgate de plantas matrizes superiores em plantios comerciais e consequentemente melhores resultados para a propagação desta espécie (PIAIA & MANTOVANI, 2011), associado ao uso de reguladores de crescimento, como o Ácido Indolbutírico (AIB), tem proporcionado a melhoria do enraizamento adventício (RIBEIRO et al, 2009).

A utilização de jardins clonais tem-se tornado uma prática vantajosa na clonagem em larga escala, pois consistem na formação de clones, que são originados da estaquia ou de outra técnica de propagação vegetativa em um local próximo ao local de estaqueamento, em espaçamentos variados conforme as necessidades da espécie, onde cepas são submetidas a constantes tratamentos, afim de permitir a coleta de ramos durante o ano todo para a produção de miniestacas com caráter juvenil e vigor vegetativo (PIAIA & MANTOVANI, 2011; OLIVEIRA et al. 2010). Os jardins clonais são instalados no interior de estufas ou casas de vegetação e sua área é considerada moderadamente pequena em relação aos jardins clonais tradicionais inicialmente instalados a céu aberto. Nos jardins clonais protegidos é possível a realização eficaz de tratos culturais, como fertirrigação por gotejamento, controle de doenças e pragas e uso de cobertura morta (ALFENAS et al., 2004 *apud* PIAIA & MANTOVANI, 2011).

Algumas espécies, mesmo com a utilização de brotos de jardins clonais com condições fisiológicas adequadas, ainda apresentam dificuldades de enraizamento. Para isso, o processo de rejuvenescimento ou, reversão à juvenilidade, pode ser obtido através do cultivo *in vitro* da espécie e posteriormente cultivo em jardins clonais.

A oliveira, por se tratar de uma espécie lenhosa e apresentar baixas taxas de sucesso por propagação vegetativa convencionais, ser limitada pela influência sazonal do clima e pela necessidade de grandes quantidades de material vegetativo, além de apresentar dificuldade de enraizamento das estacas, a micropropagação também assume uma posição de destaque na multiplicação da oliveira (CANÇADO et al, 2013).

Esta técnica, também conhecida como cultura *in vitro*, pode propiciar a produção de mudas adequadas, tendo como a principal vantagem a uniformidade das plantas e crescimento e maturação genericamente mais rápidos em comparação a outros métodos, além de altos valores de ganhos genéticos de populações clonais em menor espaço de tempo (GUERRA et

al., 1999). Por outro lado, esta técnica apresenta dificuldades como a oxidação e contaminação por fungos e bactérias do material vegetal introduzido *in vitro*, fato este característico do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (SATO, et al., 2001) e, portanto, um desafio para a propagação desta espécie por cultura de tecidos.

Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de um protocolo que promova a descontaminação sem comprometer a viabilidade dos segmentos nodais de oliveira para possibilitar o desenvolvimento das demais etapas da micropropagação da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção do protocolo para desinfestação superficial dos segmentos nodais de oliveira (*Olea europaea L*) das cultivares Arbequina e Picual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação de metodologia para desinfestação de explantes de oliveira através da eliminação de fungos e bactérias.
- Avaliar o efeito do choque elétrico na desinfestação de segmentos nodais de oliveira.
- Avaliar a eficácia do Hipoclorito de Sódio (NaOCl), Lysoform e Ciclozyme em diferentes concentrações e tempos de imersão, na desinfestação superficial de segmentos nodais.

3 JUSTIFICATIVA E REFERENCIAL TEÓRICO

A oliveira é considerada umas das espécies frutíferas mais antigas cultivadas pelo homem. Pertencente à família Oleaceae, é uma planta angiosperma eudicotiledônia de porte arbóreo (WREGE, et al., 2009) e que apresenta necessidades climáticas distintas para cada fase fenológica.

Sua origem se dá na região geográfica que vai desde o Sul do Caucásio, até as altiplanícies do Irã, Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se até povoar todos os países que margeiam o Mediterrâneo (COUTINHO, et al., 2009).

Sua maior importância econômica está associada aos seus frutos, as azeitonas, que originam o azeite de oliva e a azeitona em conserva. Os frutos tem ganhado destaque por apresentarem alto conteúdo em compostos bioativos e seu consumo tem sido associado com o baixo risco de incidência de várias doenças, além de contribuir na prevenção de doenças circulatórias, cardiovasculares, neurológicas e cancerígenas (PESTANA-BAUER et al., 2011).

Devido à grande demanda por seus produtos, o cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.) adquiriu especial importância em todo o mundo, despertando grande interesse no agronegócio e em setores organizados da agricultura, o que tem estimulado a introdução e a expansão de pomares da espécie em todo o mundo (CANÇADO et al., 2013). De acordo com Coutinho et al. (2009), os três países de maior produção de azeite de oliva são, em primeiro lugar a Espanha com 49% da produção mundial, em segundo lugar a Itália com 19% e em terceiro lugar a Grécia com 12%. Embora o Brasil venha aumentando as áreas de plantio e produção da espécie, as mesmas ainda são consideradas insignificantes para suprir a demanda de mercado interno (COUTINHO et al., 2009). Em virtude disso, o país é considerado um dos maiores importadores de produtos da oliveira da América do Sul sendo o terceiro maior importador mundial de azeitona e o quinto de azeite de oliva (OLIVEIRA et al., 2007).

Durante muito tempo, a produção de mudas de oliveira foi feita predominantemente via sementes. Entretanto, a utilização deste método implicou na variabilidade genética, longo período juvenil (PIO, et al., 2005) e diminuição da qualidade de plantas em termos de produção, fatores estes que impulsionaram o desenvolvimento e aprimoramento de outros métodos para a produção de mudas, como a enxertia, a estaquia e a propagação *in vitro* da oliveira.

No entanto, atualmente a utilização de jardins clonais tem-se tornado uma prática vantajosa na clonagem em larga escala, pois consistem na formação de clones, que são

originados da estaquia ou de outra técnica de propagação vegetativa em um local próximo ao local de estaqueamento, em espaçamentos variados conforme as necessidades da espécie, onde cepas são submetidas a constantes tratamentos, afim de permitir a coleta de ramos durante o ano todo para a produção de miniestacas com caráter juvenil e vigor vegetativo (PIAIA & MANTOVANI, 2011; OLIVEIRA et al. 2010). Os jardins clonais são instalados no interior de estufas ou casas de vegetação e sua área é considerada moderadamente pequena em relação aos jardins clonais tradicionais inicialmente instalados a céu aberto. Nos jardins clonais protegidos é possível a realização eficaz de tratos culturais, como fertirrigação por gotejamento, controle de doenças e pragas e uso de cobertura morta (ALFENAS et al., 2004 *apud* PIAIA & MANTOVANI, 2011).

Algumas espécies, mesmo com a utilização de brotos de jardins clonais com condições fisiológicas adequadas, ainda apresentam dificuldades de enraizamento. Para isso, o processo de rejuvenescimento ou, reversão à juvenilidade, pode ser obtido através do cultivo *in vitro* da espécie e posteriormente cultivo em jardins clonais.

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa baseada na capacidade de multiplicação e diferenciação que as células vegetais possuem quando são submetidas a condições nutritivas e ambientais adequadas e são estimuladas com determinados reguladores de crescimento (RIBEIRO et al., 2008). A propagação *in vitro* possibilita a propagação de espécies de difícil multiplicação pelos procedimentos clássicos além da obtenção de mudas sadias, livres de patógenos, resultando em um material de alta qualidade genética e sanitária (DONINI, 2009).

No entanto, a propagação *in vitro* de plantas lenhosas é dificultada e devido à interferência de contaminantes que ocasionam diversos problemas, inviabilizando o cultivo. Dentre estes, destaca-se que as bactérias e fungos retiram do meio de cultivo os nutrientes para o seu crescimento, concorrendo com a cultura pelos nutrientes, pelo oxigênio, água e espaço. A contaminação provoca a redução da multiplicação e crescimento das culturas inviabilizando muitas vezes esta técnica de cultivo para espécies com altas concentrações de contaminantes, especialmente os de origem endógena.

Segundo Sato, (2001), a contaminação é dependente do material vegetal utilizado e da sua localização, podendo estar em casa de vegetação ou em campo, sendo que as matrizes dispostas em campo possuem, de modo geral, maior presença de contaminantes.

De modo geral, a presença destes microrganismos pode ser identificada logo no início do cultivo, ou podendo em alguns casos permanecerem latentes *in vitro*, sem apresentar qualquer crescimento visível ou sintoma (PEREIRA, et al. 2003).

Estes contaminantes podem ocasionar a oxidação dos explantes, essencialmente por compostos fenólicos, que estão vulneráveis às trocas gasosas e ao acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo (RODRIGUES et al., 2003).

Uma boa execução de descontaminação pode ser indicativa de sucesso na multiplicação de explantes. O processo de desinfestação é um dos mais complexos, devido a necessidade de obtenção de tecidos descontaminados sem que ocorra injúrias sobre o explante que o induzam a morte (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Há diversos processos aplicados para promover descontaminação do material vegetal, no entanto, a técnica mais utilizada e com resultados mais expressivos pela praticidade e baixo custo consiste na lavagem do material vegetal com compostos a base de cloro, como o hipoclorito de cálcio ou de sódio, o etanol, o peróxido de hidrogênio, dentre outros produtos que apresentam baixa fitotoxicidade mesmo quando utilizados em diferentes combinações e concentrações (RIBEIRO, 2008). A definição do tempo de exposição dos explantes e das concentrações pode variar de acordo com a espécie, fazendo-se necessário a adequação de acordo com a sensibilidade do tecido (NASCIMENTO, 2007; MONTARROYOS, 2000).

Os compostos clorados, como o hipoclorito de sódio e lyzoforn, apresentam um amplo espectro de atividade biocida, atuando de forma efetiva na desinfestação da superfície de explantes e sementes, podendo ainda serem utilizados na esterilização química dos meios de cultura (EMBRAPA, 2008).

Segundo Londero, et al. (2018), o hipoclorito de sódio é amplamente utilizado em protocolos de desinfestação por apresentar características letais contra microrganismos, no entanto, outros aspectos como a limpeza do local de inoculação e execução dos tratamentos no explantes também devem ser levados em consideração.

De modo geral, são poucos os dados bibliográficos que propõem protocolos eficazes para a desinfestação dos segmentos nodais de oliveira, em especial para as cultivares Arbequina e Picual. Neste sentido, o estudo torna-se de extrema importância para a propagação da espécie.

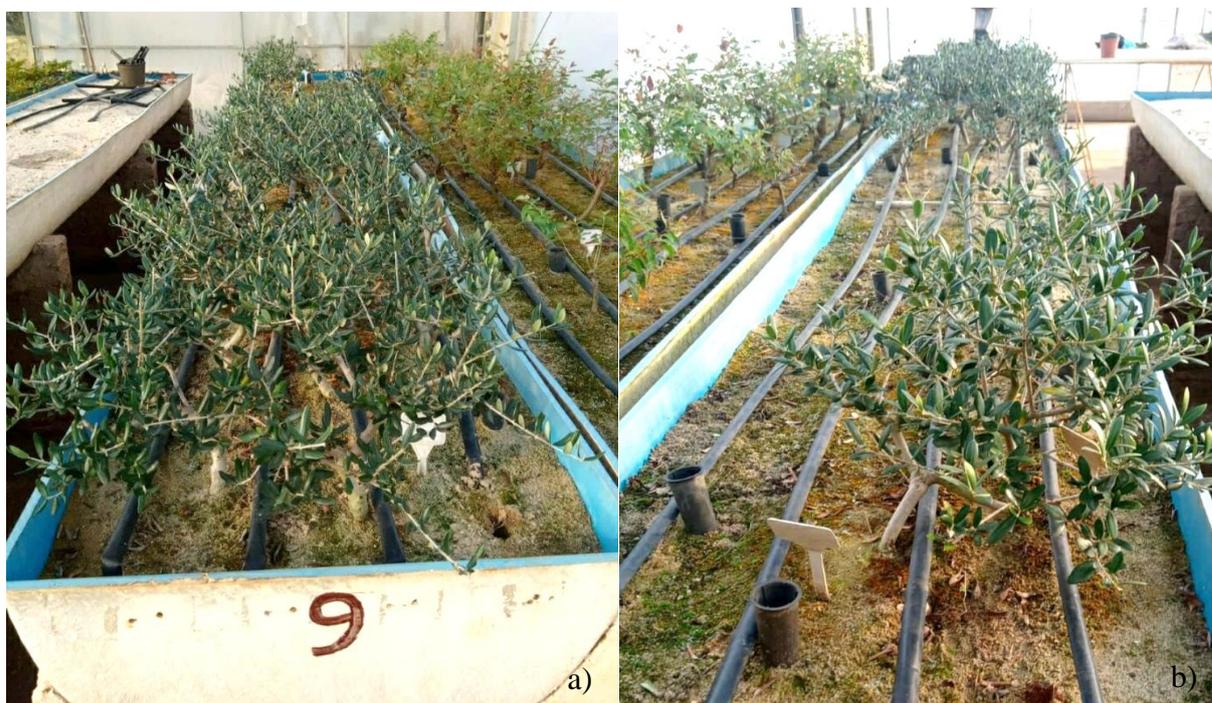
4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Melhoramento Genético e Biotecnologia Florestal e no Jardim Clonal do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria – *campus* Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil.

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado em alguns experimentos foi coletado em minijardim clonal de Oliveira (*Olea europaea* L.), cultivares Arbequina e Picual, localizados em casa de vegetação (Figura 1). As plantas fornecedoras de brotos para os experimentos (minicepas) são clones de árvores-matrizes pertencentes a um pomar experimental localizado em uma propriedade rural no município de Novo Barreiro – RS (PIAIA, 2011), selecionados pela sua superioridade e precocidade na produção de frutos.

Figura 1 – Minijardim clonal das cultivares a) Arbequina e b) Picual.



Fonte: O autor (2021).

O jardim clonal foi implementado em abril de 2011, no interior da casa de vegetação revestida de polipropileno transparente (150 micras), em canteiros suspensos de fibra de vidro, na forma de tanques com dimensionamento de 5m de comprimento x 0,7m de largura x 0,5m de profundidade. Os tanques foram preenchidos com seixos rolados e com uma camada

de 25 cm de areia na porção superior (PIAIA, 2011). Ainda de acordo com o autor, o sistema de irrigação foi realizado por gotejamento e consiste em 4 linhas de mangueiras que promoveram a irrigação diretamente na base das minicepas.

A fertilização das plantas no jardim clonal foi realizada a cada 30 dias, com nitrato de cálcio (1,0 g L⁻¹); cloreto de potássio (0,4 g L⁻¹); monoamônio fosfato (42 mg L⁻¹); sulfato de amônio (15 mg L⁻¹); sulfato de cobre (0,25 mg L⁻¹); sulfato de manganês (2,7 mg L⁻¹); molibdato de sódio (0,18 mg L⁻¹); sulfato de zinco (0,1 mg L⁻¹) hidroferro em pó (83,4 mg L⁻¹); ureia (20 mg L⁻¹); sulfato de magnésio (450 mg L⁻¹) e ácido bórico (2,88 mg L⁻¹) por meio do sistema de irrigação, enquanto a fitossanidade foi mantida pela aplicação de fungicidas sistêmicos, de contato e inseticidas sempre que necessário.

Também foi utilizado material vegetal proveniente de indivíduos adultos localizados no estacionamento dos blocos da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* Frederico Westphalen, em espaço aberto não submetidos a tratos silviculturais, nutricionais ou fitossanitários estando sujeitos às condições ambientais locais.

4.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Os brotos, material vegetal utilizado, foram coletados das minicepas do jardim clonal e das matrizes situadas no campo, conduzidos ao Laboratório de Biotecnologia Florestal, mantidos em água corrente para evitar a desidratação, e posteriormente os explantes foram excisados com aproximadamente 2 cm de comprimento, com no mínimo 2 gemas axilares (Figura 2).

Figura 2 – Preparo dos explantes de *Olea europae* L. anteriormente a aplicação dos tratamentos. a) Brotos; b) Explantes excisados; c) Material pronto para aplicação dos tratamentos e posterior inoculação.



Fonte: O autor (2021).

4.3 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o WPM (Wood Plant Medium, de Lloyd e McCown, 1981) acrescido de sacarose (30g L^{-1}) e ágar (6g L^{-1}).

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH (Hidróxido de Sódio) ou HCl (Ácido Clorídrico) a 1N, anteriormente a adição do ágar. O ágar foi fundido no meio com o auxílio de um micro-ondas.

O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, sendo aproximadamente 15 ml por tubo de ensaio, tampados com tampas plásticas

transparentes e posteriormente submetidos a autoclavagem a 121 °C (1atm) pelo período de 15 minutos.

Em cada experimento foi utilizado um explante para cada tubo de ensaio.

4.4 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

4.4.1 EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESCARGAS ELÉTRICAS EM CUBA DE ELETROFORESE NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E BACTERIANA DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA

No primeiro experimento, foi utilizado uma cuba de eletroforese onde os explantes foram imersos em solução de Cloreto de Potássio (KCl) 1M e submetidos a descargas elétricas de voltagem 80 V por diferentes períodos de tempo. Foram testados 4 tratamentos com 4 repetições cada e 5 explantes por repetição. O material vegetal foi proveniente dos brotos de minicepas cultivares Arbequina e Picual cultivadas em minijardim clonal, lavados em água corrente por 20 minutos e então submetidos aos tratamentos conforme a tabela a seguir:

Tabela 1 – Tempos de exposição dos segmentos nodais de oliveira cultivares Arbequina e Picual á descargas elétricas.

Tratamentos	Tempo (minutos)
T1	Controle, sem descargas elétricas
T2	Descargas elétricas por 5 min
T3	Descargas elétricas por 10 min
T4	Descargas elétricas por 20 min

Fonte: O autor (2021).

Após a aplicação das descargas elétricas, os explantes foram submetidos ao processo de desinfestação padrão: imersão em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 25% por 20 minutos e em seguida realizadas 3 lavagens sucessivas em água destilada, deionizada e autoclavada e posteriormente inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura.

Foram utilizadas neste experimento 20 explantes por tratamento perfazendo um total de 80 explantes.

4.4.2 EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES DESINFESTANTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE ÁRVORES MATRIZES À CAMPO

No segundo experimento foram testados 6 tratamentos, diferenciados pelo tempo de imersão dos explantes em diferentes soluções contendo hipoclorito de sódio e/ou lysoform e/ou ciclozyme ambos a 20%, isoladamente ou em combinação. O material vegetal utilizado neste experimento foi proveniente de árvores matrizes de área externa. Após a coleta dos brotos, os segmentos nodais foram excisados e mantidos em água corrente por 20 minutos e condições assépticas em câmara de fluxo laminar, imersos por 30 segundos em álcool 70% e então submetidos aos seguintes tratamentos:

Tabela 2 – Tempos de imersão e concentrações de diferentes desinfestantes utilizados na desinfestação superficial de segmentos nodais de oliveira.

Tratamentos	Tempos de imersão
T1	Controle, sem aplicação de agentes desinfestantes
T2	NaOCl (20%) por 10 min
T3	Lyzoform (20%) por 10 min
T3	Ciclozyme (20%) por 10 min
T5	NaOCl (por 10 min) + Lyzoform (por 10 min) + Ciclozyme (por 10 min), ambos à 20%
T6	NaOCl (por 2 min) + Lyzoform (por 2 min) + Ciclozyme (por 2 min), ambos à 20%

Fonte: O autor (2021).

Cada tratamento foi composto por 6 repetições, perfazendo 30 explantes por tratamento e 180 explantes totais no experimento.

Após a aplicação dos tratamentos, os explantes foram submetidos a lavagens com água destilada, deionizada e autoclavada por três vezes e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM.

4.4.3 EXPERIMENTO 3 – EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE JARDIM CLONAL

No terceiro experimento foram testados 6 tratamentos, considerando diferentes tempos de imersão dos explantes em solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) e/ou lysoform e/ou ciclozyme, ambos a 20%, isoladamente ou em combinação. O material vegetal utilizado foi proveniente de minijardim clonal. Após a coleta dos brotos os segmentos nodais foram excisados e mantidos em água corrente por 20 minutos e, em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, imersos por 30 segundos em álcool 70% e então submetidos aos tratamentos descritos abaixo:

Tabela 3 – Tempos de imersão e concentrações de diferentes desinfestantes utilizados na desinfestação superficial de segmentos nodais de oliveira.

Tratamentos	Tempos de imersão
T1	Controle, sem aplicação de agentes desinfestantes
T2	NaOCl (20%) por 10 min
T3	Lyzoform (20%) por 10 min
T3	Ciclozyme (20%) por 10 min
T5	NaOCl (por 10 min) + Lyzoform (por 10 min) + Ciclozyme (por 10 min), ambos à 20%
T6	NaOCl (por 2 min) + Lyzoform (por 2 min) + Ciclozyme (por 2 min), ambos à 20%

Fonte: O autor (2021).

Cada tratamento foi composto por 6 repetições, totalizando 30 explantes por tratamento e 180 explantes no experimento.

Após a aplicação dos tratamentos, os explantes foram lavados três vezes com água destilada, deionizada e autoclavada e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura.

4.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Após o processo de inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas com intensidade luminosa de aproximadamente $36 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, em temperatura de aproximadamente $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. No entanto, nos primeiros sete dias, os explantes foram mantidos no escuro, sob mesma condição de temperatura.

Figura 3 – Laboratório para preparo do meio e explantes (a) câmara de fluxo laminar (b) e sala de crescimento (c) onde foram mantidas as culturas com condições de luz e temperatura controladas.



Fonte: O autor (2021).

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÕES

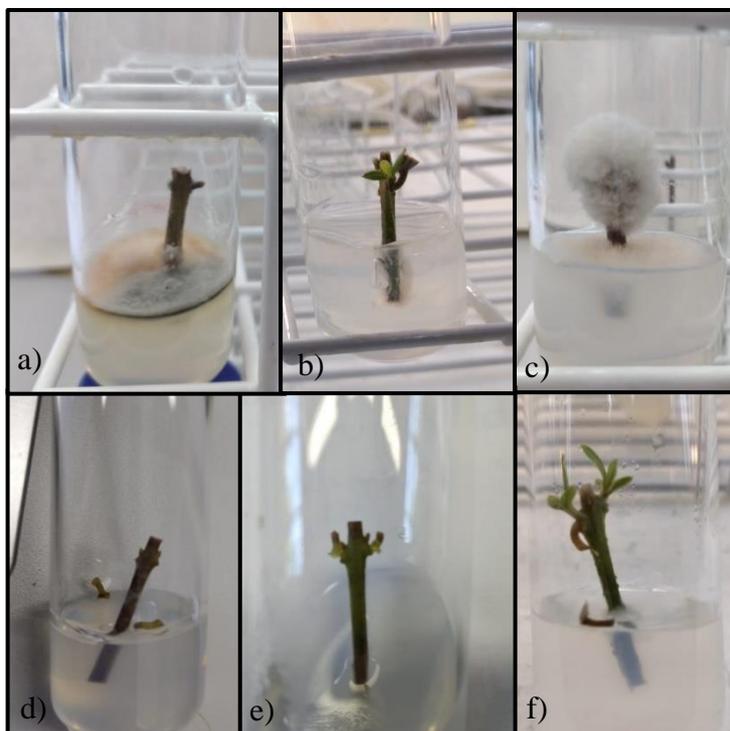
O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado – DIC, com número de tratamentos e repetições diferentes para cada experimento. Também foram realizadas avaliações em diferentes períodos de tempo para cada experimento.

Para análise dos experimentos, foram levadas em consideração as seguintes variáveis:

- Explantes com presença somente de fungos;
- Explantes com presença somente de bactéria;
- Explantes com presença de fungos e bactérias;
- Explantes que apresentavam necrose (leve e forte);
- Explantes axênicos (sem a presença de contaminantes, independente da responsividade)
- Explantes responsivos (que apresentaram brotações).

A oxidação será avaliada em dois parâmetros (leve e forte), considerando que as causas para tal reação são distintas e ainda possibilita a avaliação da evolução da oxidação, que inicialmente pode apresentar-se de forma leve e posteriormente evoluir e caracterizar a necrose forte. Para isto, considera-se que a necrose leve ou oxidação é consiste no escurecimento dos tecidos do explante que ocorre devido ao corte, onde que os compostos celulares em contato com o oxigênio oxidam e o tecido escurece, sendo uma reação normal dada as condições de coleta e preparo do material. Enquanto a presença de altas taxas de oxidação caracterizam a necrose forte, que ocorre devido a morte dos tecidos, podendo vir resultar na morte do explante.

Figura 4 – Imagem demonstrativa das variáveis consideradas para avaliação: Explante com presença de a) fungo; b) bactéria; c) fungo e bactéria; d) Necrose; e) Axênico; f) Explante responsivo.



Fonte: O autor (2021).

Ao final de cada avaliação, os explantes contaminados e com necrose forte foram retirados e não eram contabilizados nas avaliações seguintes.

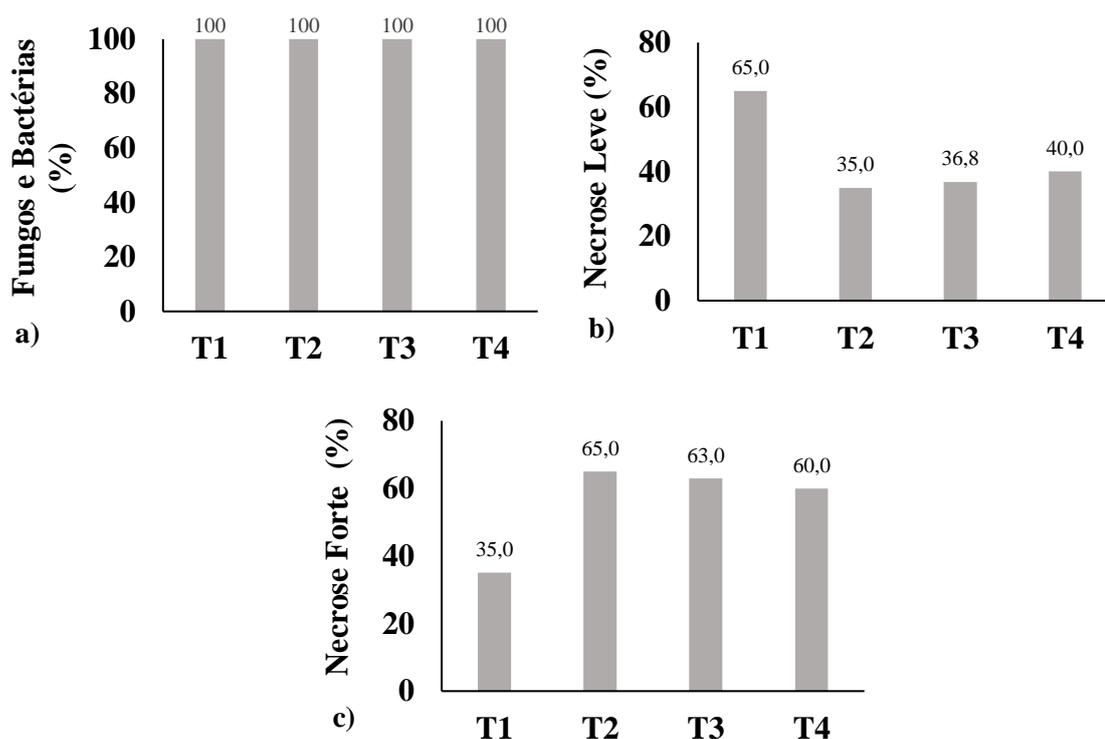
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE DESCARGAS ELÉTRICAS EM CUBA DE ELETROFORESE NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA

A avaliação realizada aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos mostra que a contaminação dos segmentos nodais somente por fungos ou somente por bactérias não ocorreu, portanto, não foi constatada a incidência isolada destes patógenos. No entanto, a ocorrência concomitante dos dois patógenos se manifestou em 100% dos explantes (Fig. 5a) e em todos os tratamentos.

Para a variável necrose, observou-se que as maiores taxas de necrose leve foram obtidas no tratamento testemunha (Fig. 5b) e conseqüentemente menores taxas para a variável necrose forte (Fig. 5c).

Figura 5 – a) Contaminação por fungos e bactérias, b) necrose leve e c) necrose forte dos segmentos nodais de oliveira (*Olea europaea* L.) após 7 dias da aplicação de tratamentos desinfestação.



Fonte: O autor (2021).

***T1**: Testemunha, sem aplicação de descargas elétricas; **T2**: descargas elétricas por 5 min; **T3** descargas elétricas por 10 min; **T4**: descargas elétricas por 20 min.

A presença de necrose nos explantes que não receberam a aplicação das descargas (testemunha) sugere a possibilidade de associação desta reação ao tratamento padrão de desinfestação dos explantes ou devido a voltagem e ao tempo de exposição do material vegetal ao etanol e ao hipoclorito de sódio.

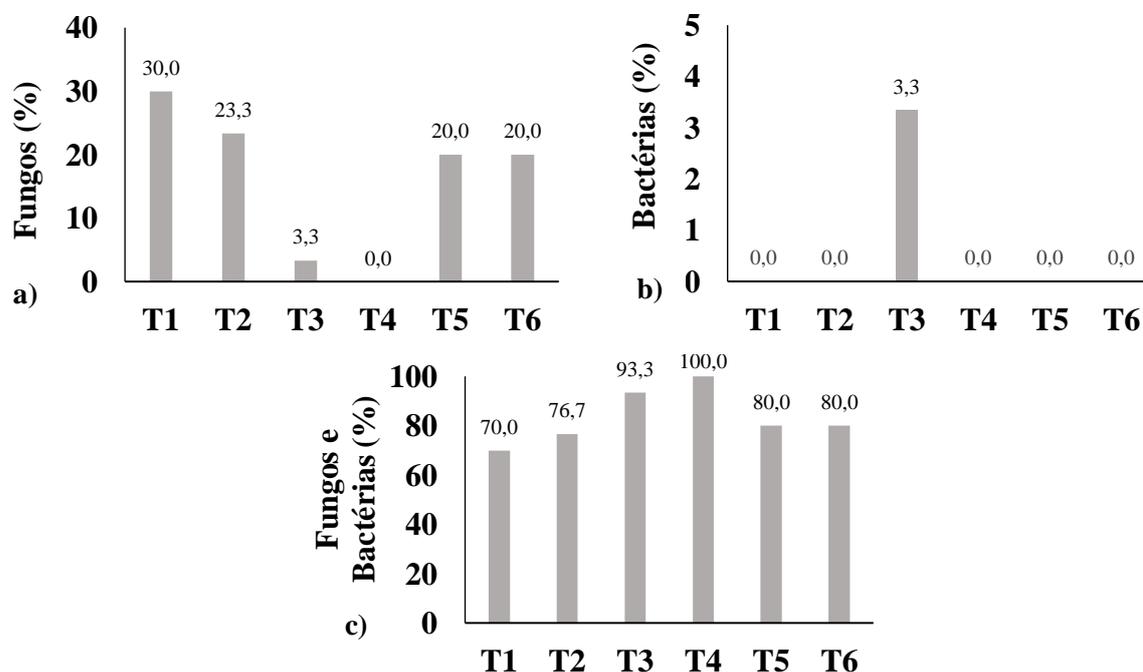
A técnica da eletroforese é amplamente utilizada na microbiologia, pois possibilita obter informações de material genético ou proteico de microrganismos como fungos, bactérias e vírus.

A hipótese deste experimento consiste em que as descargas elétricas provocadas na cuba de eletroforese pudessem, de alguma forma, aumentar a permeabilidade das membranas dos fungos ou das bactérias permitindo a entrada do álcool e do hipoclorito de sódio, fazendo com que a desinfestação ocorresse de forma mais eficiente. No entanto, considerando os resultados supõe-se que voltagem (80 V) ou o tempo de submissão dos explantes as descargas elétricas não foram eficientes para promover a eliminação dos fungos e bactérias e ainda, ser responsável pelo dano nos tecidos dos explantes.

5.2 EXPERIMENTO 2 - EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES DESINFESTANTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE ÁRVORES-MATRIZES À CAMPO

Após 7 dias da aplicação dos tratamentos, foi constatado presença de contaminação em todos os explantes de todos os tratamentos. Conforme demonstrado na Fig. 6a, a contaminação somente por fungos não foi superior a 30%, enquanto a contaminação por bactérias manifestou-se apenas no tratamento T3 que contém apenas lysoform no processo de desinfestação (Fig. 6b). Os maiores valores de contaminação foram expressos através da variável fungos e bactérias simultaneamente em um mesmo explante, que contabilizaram valores de contaminação de até 100% (Figura 6c).

Figura 6 – Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) contaminados aos 7 dias após aplicação de tratamentos de desinfestação.



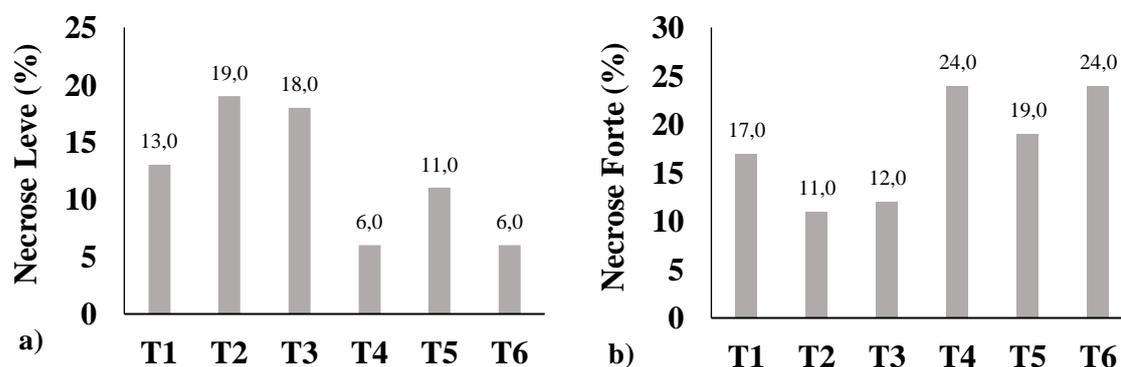
Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Segundo Dutra, et al (2009) a definição do processo de desinfestação está diretamente relacionada a aspectos como o tipo e origem do material vegetal, época do ano e ambiente de coleta, o que torna o processo de descontaminação mais difícil para materiais provenientes do campo, por apresentarem altas taxas de contaminantes.

Para a variável necrose, não foram constatados valores acima de 24%, tanto para necrose leve, onde os maiores valores foram constatados pelo tratamento T2 (19%) contendo apenas NaOCl por 10 min (Fig. 7a), quanto para necrose forte, sendo os tratamentos T4 contendo apenas Ciclozyme por 10 min e T6 contendo NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min), ambos com 24% (Fig. 7b).

Figura 7 – Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram necrose a) leve e b) forte, sete dias após aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor (2021).

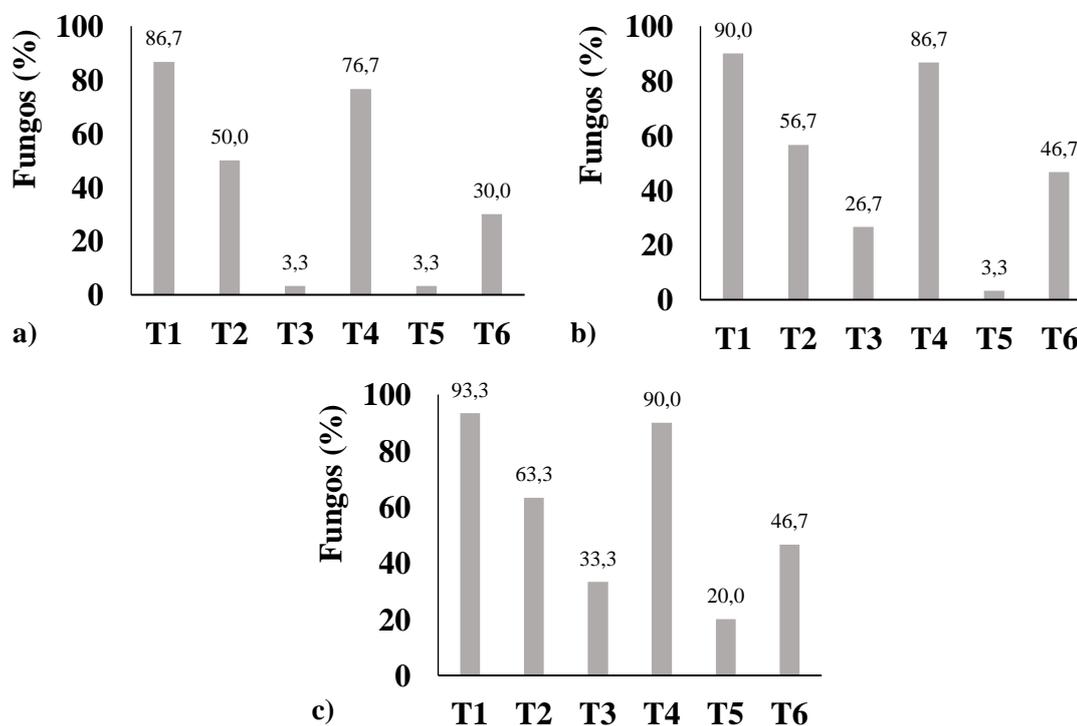
***T1**: Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2**: NaOCl por 10 min; **T3**: Lysoform por 10 min; **T4**: Ciclozyme por 10 min; **T5**: NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6**: NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

No entanto, os resultados obtidos neste experimento são expressivamente inferiores aos encontrados por Santos, et al. (2019), onde foram constatadas porcentagens de oxidação de 89,63% e 68,14%, para as cultivares Arbequina e Koroneiki, respectivamente.

5.3 EXPERIMENTO 3 - EFICIÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO PARA A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE JARDIM CLONAL

No terceiro experimento as avaliações aos 5, 10 e 15 após a aplicação dos tratamentos demonstraram que houve contaminação dos segmentos nodais de oliveira por fungos em todos os tratamentos. A contaminação foi maior no tratamento T1 (86,7%), sem a aplicação de agentes desinfestantes e, menor, após a aplicação de Lysoform (20%) por 10 min (T3) e a combinação entre NaOCl po 10 min + Lysoform por 10 min + Cyclozyme por 10 min, ambos a 20%, (T5) com apenas 3,3% de contaminação (Fig. 8).

Figura 8 – Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram somente contaminação por fungos aos a) 5 dias; b) 10 dias; e c) 15 dias após aplicação de tratamentos de desinfestação.

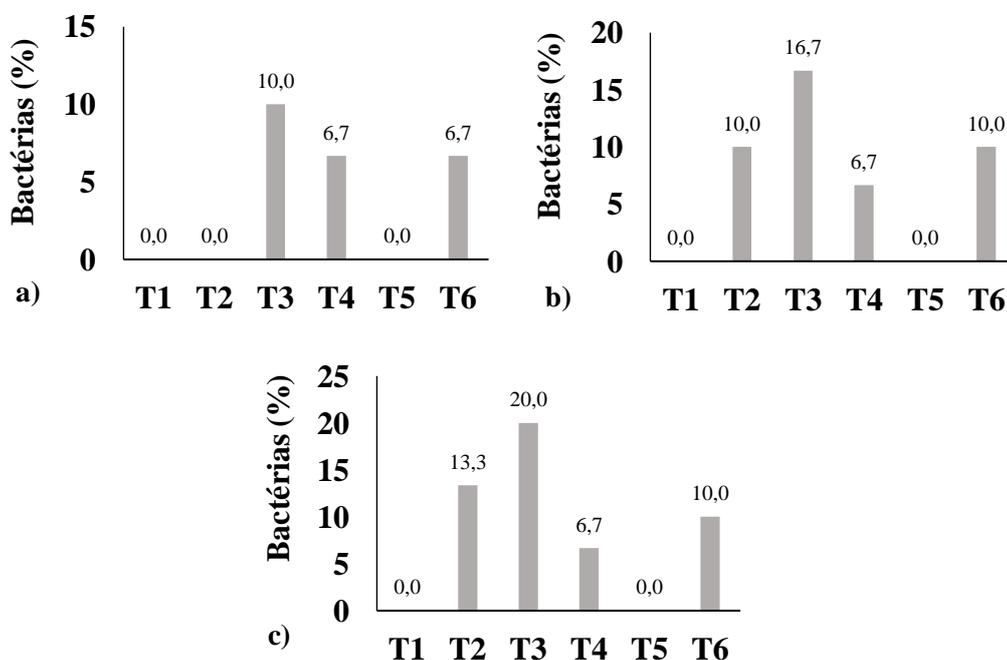


Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Ademais, após 5 dias da aplicação dos tratamentos, verificou-se que os tratamentos T3, T4 e T6 expressaram, respectivamente (10 %), (6,7%) e (6,7%) de contaminações por bactéria, sendo que este contaminante esteve ausente nos demais tratamentos na primeira avaliação (Fig. 9a).

Figura 9 - Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram somente contaminação por bactérias aos a) 5 dias; b) 10 dias; e c) 15 dias após aplicação de tratamentos de desinfestação.



Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

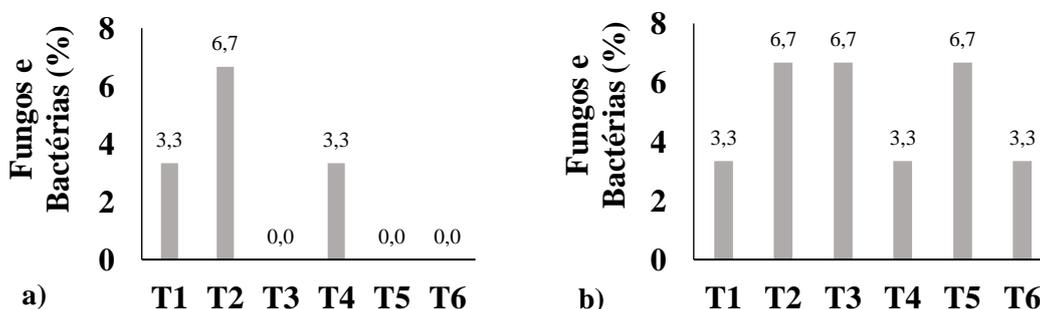
Na segunda avaliação, observou-se o surgimento deste patógeno no tratamento T2 (10%) enquanto que os tratamentos T3 e T6 apresentaram um aumento de 6,7%, 3,3% de contaminação, respectivamente e o tratamento T4 se manteve estável (6,7%) (Fig. 9b). Após 15 dias da aplicação dos ainda foi observada a ausência deste patógeno nos tratamentos T1 e T5, sendo que as taxas de contaminação não foram maiores que 20% (Fig. 9c).

A ausência de contaminação por bactérias em alguns tratamentos na primeira avaliação pode estar relacionada ao período de desenvolvimento deste patógeno, sendo que este tende a manifestar-se visualmente em alguns casos de forma mais vagarosa quando comparado a outros patógenos, como no caso os fungos.

Alguns explantes apresentaram contaminação por fungos e bactérias simultaneamente (Fig. 10). Esta ocorrência, no entanto, só foi verificada na segunda avaliação (10 dias), no entanto, as porcentagens de contaminação não foram superiores a 7%, sendo que os tratamentos com as maiores contaminações foram encontradas no T2 (6,7%), seguido pelo T1

(3,3%) e T4 (3,3%). Na avaliação aos 15 dias, observou-se que as porcentagens nos tratamentos T3, T5 e T6 (tratamentos que não apresentaram contaminação simultânea na segunda avaliação), apresentaram taxas de incremento de contaminação maiores aos tratamentos contaminados da primeira avaliação, com valores de 6,7%, 6,7% e 3,3%, respectivamente, enquanto não houve aumento das taxas para os outros três tratamentos, permanecendo estes com os mesmos valores encontrados na segunda avaliação, conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 10 - Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram contaminação simultânea por bactérias e fungos aos a) 10 dias e b) 15 dias após aplicação de tratamentos de desinfestação



Fonte: O autor (2021).

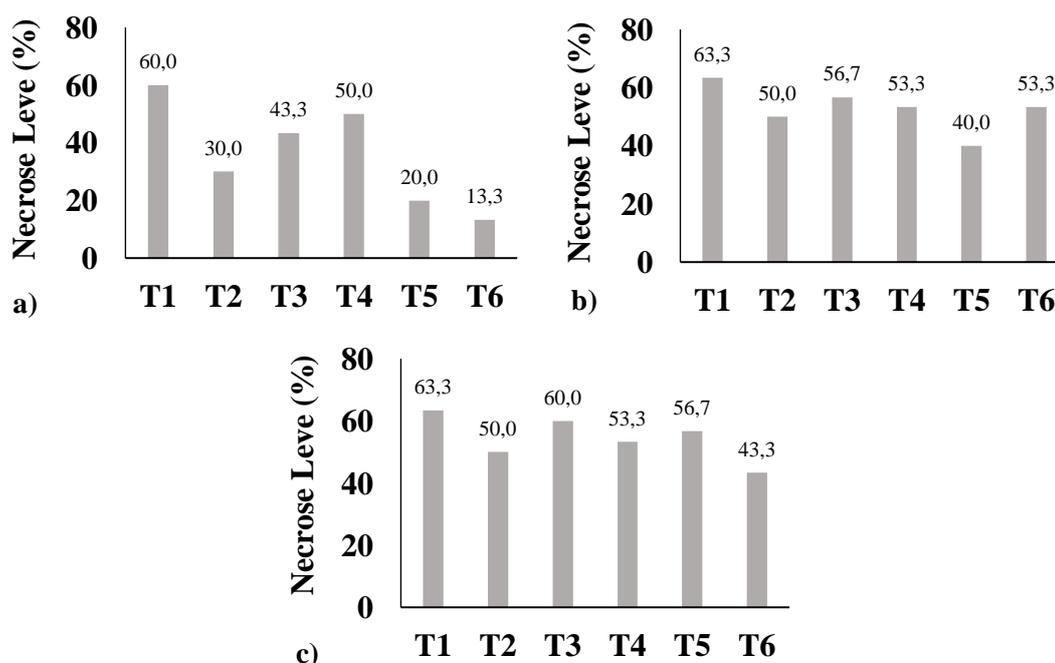
***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Londero, et al. (2018), constataram após 7 dias da aplicação de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos de exposição, para as mesmas cultivares, o valor máximo de contaminação de 70% e mínimo de 28,3% para fungos e máximo de 65% e um tratamento sem contaminação para bactérias. Os maiores valores de contaminação encontrados pelos autores foram para o tratamento testemunha e para o tratamento com menor concentração da solução desinfetante (20% de NaOCl), junto ao menor tempo de imersão (10 min).

Desinfestantes superficiais como álcool e hipoclorito de sódio são amplamente utilizados na etapa de desinfestação de material vegetal na micropropagação. No entanto, para Pereira et. al (2014), muitas vezes estes são eficientes no controle da contaminação por fungos, mas não garantem níveis aceitáveis de controle de bactérias.

Quando avaliado o grau de necrose, observou-se aos cinco dias que as taxas de necrose leve dos segmentos nodais foram inferiores a 60% (Fig. 11a). Aos 15 dias, observou-se um aumento de apenas 3,3% do valor máximo encontrado na primeira avaliação. (Fig. 11c). Ainda, houve um decréscimo na taxa de necrose da segunda avaliação para a terceira avaliação, caracterizando a evolução da necrose leve para a necrose forte.

Figura 11 - Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram necrose leve aos a) 5 dias; b) 10 dias; e c) 15 dias após aplicação dos tratamentos.

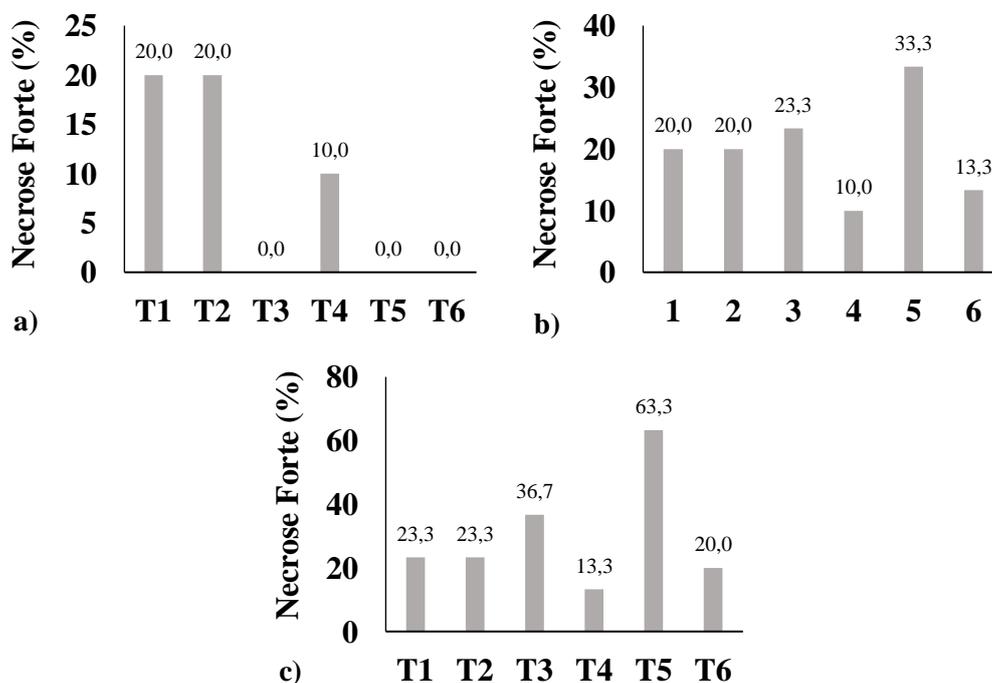


Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Após 5 dias, as taxas de necrose forte foram constatadas em três tratamentos (T1, T2 e T4), sendo que os valores encontrados não foram superiores a 20% (Fig 12a). Aos 10 dias, estes tratamentos se mantiveram estáveis, enquanto os demais começaram a expressar valores para esta variável, chegando a 33,3% para o tratamento T5 (Fig 12b). Aos 15 dias, este tratamento representou a maior taxa de mortalidade encontrada, com valor de 63,3% (Fig. 12c), podendo este ser associado ao tempo de exposição dos explantes utilizado neste tratamento. Apesar das taxas de necrose, o tempo de exposição dos explantes aos desinfestantes não ocasionou descontaminação efetiva do material.

Figura 12 - Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) que apresentaram necrose forte aos a) 5 dias; b) 10 dias; e c) 15 dias após aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lysoform por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lysoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lysoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

A necrose pode ser considerada como uma reação normal no cultivo *in vitro* em função da oxidação de compostos fenólicos exsudados pelo próprio explante (Cançado, et al. 2013). No entanto, a oliveira é considerada um antioxidante natural e por isso a oxidação que ocorre devido a presença de oxigênio e da luz nem sempre é responsável pela morte dos explantes. Sendo assim, sugere-se que as taxas de necrose forte encontradas estão muito mais associadas a ação dos agentes desinfestantes do que devido a oxidação dos tecidos. Todavia, os tratamentos provocaram a necrose nos explantes, mas não impediram a proliferação dos agentes contaminantes, logo, não foram eficientes no processo de desinfestação.

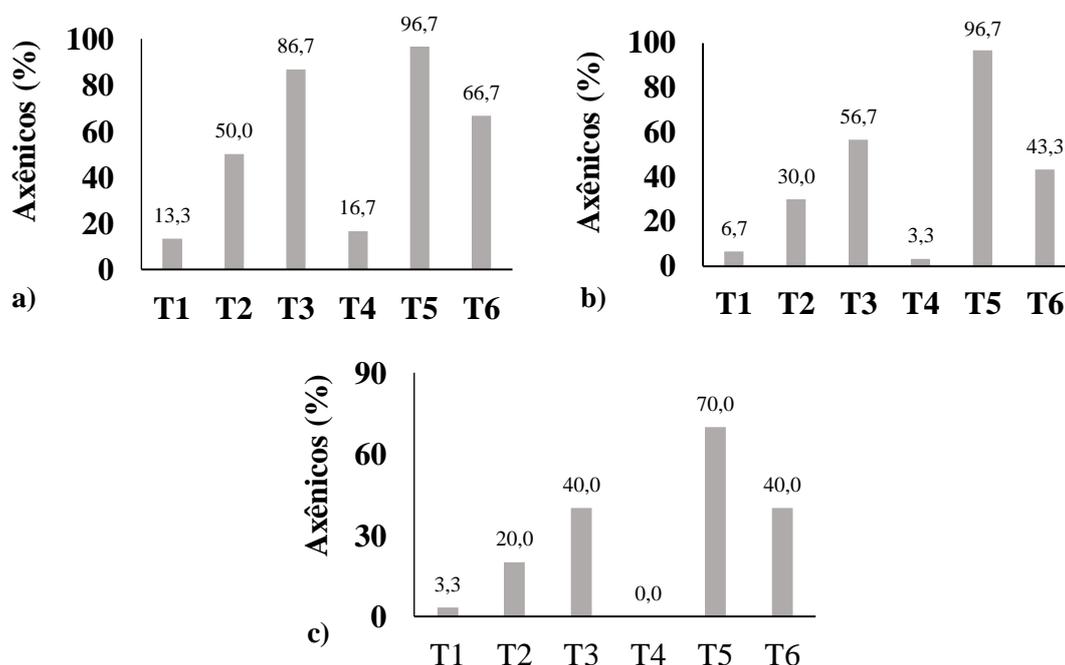
Paiva, et al. (2001) expõem que nem todas as substâncias liberadas pelo explantes causam a inibição no desenvolvimento, visto que o efeito inibitório está associado a presença de taninos e fenóis e a autotoxicidade é variável com as cultivares, espécies e gêneros. No entanto, espécies que possuam maiores teores de tanino ou hidroxifenóis podem ocasionar a

morte dos segmentos nodais, inviabilizando assim as demais etapas subsequentes na micropropagação.

Outro fator que pode estar associado a oxidação no cultivo *in vitro* é a utilização do ágar na formulação do meio de cultura. Sua constituição apresenta grande quantidade de sulfatos (composto reativo), sendo que um dos compostos identificados é o cobre, o qual é capaz de acelerar o processo de oxidação (PAIVA, et al 2001), podendo também estar associada as taxas de oxidação encontradas.

Quanto a frequência de explantes axênicos, observou-se que o tratamento T5 constituído de NaOCl + Lyzoform + Ciclozyme sequencialmente a 10 minutos de exposição e todos a 20% proporcionou a desinfestação dos segmentos nodais em 70%, de acordo com a avaliação aos 15 dias (Fig. 13c).

Figura 13 – Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) axênicos aos a) 5 dias; b) 10 dias; e c) 15 dias após aplicação dos tratamentos.

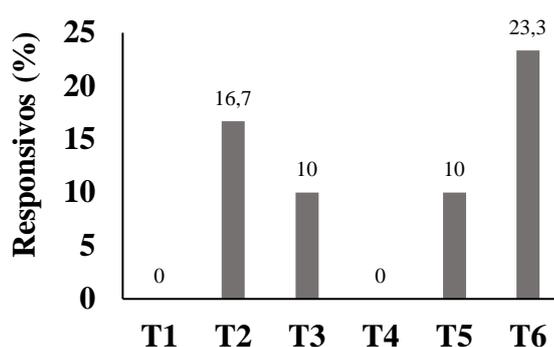


Fonte: O autor (2021).

***T1**: Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2**: NaOCl por 10 min; **T3**: Lyzoform por 10 min; **T4**: Ciclozyme por 10 min; **T5**: NaOCl (10 min) + Lyzoform (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6**: NaOCl (2 min) + Lyzoform (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Após 15 dias da aplicação dos tratamentos, a maior responsividade foi observada no tratamento T6 (23,3%), seguida pelos tratamentos T2 (16,7%), T3 e T5 (10%). Os tratamentos T1 e T4 não apresentaram valor para esta variável, ou seja, mesmo não apresentando contaminação e tenham sobrevivido, não apresentaram resposta ao crescimento e emissão de brotos axilares (Fig. 14).

Figura 14 – Porcentagem de explantes (*Olea europaea* L.) responsivos 15 dias após aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor (2021).

***T1:** Testemunha, sem aplicação de agentes desinfestantes; **T2:** NaOCl por 10 min; **T3:** Lyzofom por 10 min; **T4:** Ciclozyme por 10 min; **T5:** NaOCl (10 min) + Lyzofom (10 min) + Ciclozyme (10 min) e **T6:** NaOCl (2 min) + Lyzofom (2 min) + Ciclozyme (2 min).

Este resultado relata a não correlação entre responsividade e a ausência de agentes contaminantes, uma vez que, foram constatadas as maiores taxas de explantes axênicos no tratamento T5, NaOCl, Lyzofom, Ciclozyme sequencialmente a 20% por 10 minutos de exposição, enquanto as maiores taxas de responsividade foram obtidas após aplicação do tratamento T6 NaOCl + Lyzofom + Ciclozyme, a 20% por 2 minutos. A ação dos desinfestantes na descontaminação do explante pode ter sido um dos fatores responsável pela inibição da resposta ao crescimento e desenvolvimento dos explantes.

No entanto, alguns explantes descontaminados apresentaram características de responsividade como emissão de brotações (Fig. 15) e que possuem capacidade de dar continuidade as demais etapas do processo de micropropagação.

Figura 15 – Explante axênico e responsivo.



Fonte: O autor (2021).

6 CONCLUSÃO

- Os agentes desinfestantes não foram totalmente eficazes na desinfestação dos segmentos nodais, tanto para o material proveniente de jardim clonal quanto material proveniente de campo, no entanto, foi constatada a presença de explantes axênicos e responsivos.
- As maiores taxas de explantes axênicos podem ser obtidas com a aplicação de NaOCl + Lyzoform + Ciclozyme, combinados a 20% por exposição a 10 minutos, enquanto as maiores taxas de responsividade podem ser obtidas com a aplicação de NaOCl + Lyzoform + Ciclozyme combinados a 20% por 2 minutos cada.
- Não foi constatada eficiência das descargas elétricas na desinfestação de segmentos nodais de oliveira.
- Segmentos nodais de oliveira, obtidas de plantas cultivadas em jardim clonal e a campo, apresentam altas taxas de contaminação por fungos e bactérias.

REFERÊNCIAS

- CANÇADO, G. M. de A. et al. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. Informe Agropecuário. **Biotecnologia**. Belo Horizonte, v.30, n.253, p.64-74, nov./ dez. 2013.
- CAPPELLARO, T. H. et al. Sistemas de Produção. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). Cap. Introdução e Importância Econômica. Embrapa. Pelotas, 2009.
- COUTINHO, E. F. et al. Sistemas de Produção. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). Cap. Introdução e Importância Econômica. Embrapa. Pelotas, 2009.
- DONINI, Lorena. Pastorini. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de oliveira para início da micropropagação. Tese (Doutorado) – Programa de Pos-Graduação em Agronomia, Area de Conentracao em Fruticultura de Clima Temperado. Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, 2009.
- DUTRA, L. F. et al. A micropropagação de Eucalipto. Pesquisa Florestal Brasileira. Colombo, n.58, p. 49-59, 2009.
- EMBRAPA – RIBEIRO, J. M.; CANUTO. K. M.; VESCHI, J. L. A. Compostos clorados: Aspectos gerais e sua utilização como agente sanitificantes na agricultura, micropropagação e pecuária. Petrolina – PE/ Embrapa semi-Árido, 2008.
- EMBRAPA – RIBEIRO, Fabrício Carlotto, et al. Sistemas de Produção. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.
- EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 2006. Azeitona e Azeite de oliva: tecnologias de produção. **Informe Agropecuário**, 27(231): 7-12
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. p.183-260.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles end practices**. Upper Saddle Rwir: Prentice Hall, 1997.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combi-ned Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LONDERO, C.; MANTOVANI, N. C. Desinfestação Superficial de Segmentos nodais de *Olea europaea* L. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Maria. 2018.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. ABCPTP Notícias, Brasília, n. 36/37, p. 5-10, 2000.

NASCIMENTO, P. K. V. do, et al. Desinfestação e Germinação in vitro de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.

OLIVEIRA, D. L. de., Multiplicação da oliveira através da enxertia, estaquia e ácido indolbutírico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, 2007.

OLIVEIRA, A. F. de. Desempenho de jardins clonais de oliveira obtidos por estaquia e enxertia em cortes sucessivos. *Scientia Agraria*. Curitiba, v. 11, n. 4, p. 299-305, 2010.

PAIVA, R.; Paiva, P. D. de O.; Problemas no cultivo in vitro. **Cultura de tecidos**. Universidade Federal de Alagoas. FAEPE – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. Lavras – MG, 2001. Cap. 9, P. 73-79.

PIAIA, C. P. et al. Resgate vegetativo de oliveira (*Olea europaea* L.) por estaquia e estabelecimento em jardim clonal. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2011.

PIO, R. et al. Enraizamento de diferentes tipos de estacas (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 29, n. 3, p. 562-567, 2005.

PERREIRA, G. A. et al. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘Thap maeo’. *Rev. Ceres*, Viçosa. v. 61, n.3, p. 299-305, 2014.

PEREIRA, J. E. S. et al. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, julho, 2003.

PESTANA-BAUER, V. R. et al. Caracterização do fruto da oliveira (Variedade Carolea) cultivada na região sul do Brasil. Universidade Federal de Pelotas. *Alimento e Nutrição Araraquara*. v. 22, n. 1, p. 79-87, 2011.

RIBEIRO, F. C. et al. Sistemas de Produção. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). Cap. Introdução e Importância Econômica. Embrapa. Pelotas, 2009.

RODRIGUES, A.C.; SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R.L.; FACHINELLO, J.C.; SILVA, J.B. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Prunus* sp. Em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.25, n.1, p. 131-133, 2003.

SANTOS, J. dos. Estabelecimento in vitro de oliveira ‘Arbequina’ e Koroneiki’. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 508-518, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509831305>.

SATO, A.Y et al. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. Lavras. **Cerne**. v.7, n.2, p.117-123, 2001.

WREGE, M. S. et. al. **Zoneamento Agroclimático para Oliveira no Estado do Rio Grande do Sul**. Embrapa: Pelotas, 2009.

XAVIER, A.; et al. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.