



**CAROLINA RUIZ ZAMBON**

**OLIVEIRA (*Olea europaea* L.): ARMAZENAENTO DE PÓLEN,  
PROPEIRADES DO ESTIGMA E EFEITOS DE DEFENSIVOS  
AGRÍCOLAS NA MICROSPOROGÊNESE**

**LAVRAS - MG**

**2017**

**CAROLINA RUIZ ZAMBON**

**OLIVEIRA (*Olea europaea* L.): ARMAZENAENTO DE PÓLEN, PROPEIRADES DO ESTIGMA E FEITOS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NA MICROSPOROGÊNESE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Rafael Pio  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da  
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Zambon, Carolina Ruiz.

Oliveira (*Olea europaea* L.):armazenaento de pólen,  
propeirades do estigma e efeitos de defensivos agrícolas na  
microsporogênese / Carolina Ruiz Zambon. - 2017.

60 p. : il.

Orientador(a): Rafael Pio.

.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. Viabilidade Polínica. 2. Receptividade Estigmática. 3.  
Microsporogênese. I. Pio, Rafael. . II. Título.

**CAROLINA RUIZ ZAMBON**

**OLIVEIRA (*Olea europaea* L.): ARMAZENAENTO DE PÓLEN, PROPEIRADES DO ESTIGMA E FEITOS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NA MICROSPOROGÊNESE**

**OLIVEIRA (*Olea europaea* L.): STORAGE OF POLLEN, PROPERTIES OF STIGMA AND MADE OF AGRICULTURAL DEFENSIVES IN MICROSPOROGENESIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Biologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

Dr. Adelson Francisco de Oliveira	EPAMIG
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Pedro Maranhã Peche	UFLA
Dr. Vânia Helena Techio	UFLA

Prof. Dr. Rafael Pio  
Orientador

**LAVRAS - MG**  
**2017**

*Á minha família*  
*Ao meu esposo, Luiz Fernando*  
*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de realizar este trabalho;

A minha família, pelo apoio e torcida;

Ao meu marido, Luiz Fernando de Oliveira da Silva, pelo carinho, paciência e cumplicidade durante esses anos;

Aos meus grandes amigos: Adriana Tiemi Nakamura, Edson Simão e Jun.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Pio, por conduzir e apoiar meu trabalho ao longo desses anos;

A todos os meus colegas do programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pois conseguimos passar juntos por todas as disciplinas, provas trabalhos e experimentos sempre com muito bom humor e irreverência;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós- Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade;

A todos os integrantes do Campo Experimental da Epamig em Maria da Fé, em especial ao pesquisador Dr. Adelson Francisco de Oliveira, pelo suporte técnico durante a condução dos trabalhos;

Ao Laboratório de Citogenética da UFLA em especial a Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Helena Techio, pelo suporte técnico durante a condução dos trabalhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante a realização do curso e pelo suporte financeiro na condução da pesquisa;

Aos colegas do pomar, pela ajuda e prontidão durante esse tempo;

A todos os colegas que direta ou indiretamente, ajudaram-me a concluir mais essa etapa.

*“ Somos todos visitantes desse tempo, desse lugar. Estamos só de passagem... O nosso objetivo é observar, crescer e amar... Depois voltamos pra casa” (Provérbio Aborígine)*

## RESUMO

O Brasil é um grande importador de azeite de oliva, começando a despontar para a produção nacional, sendo uma atividade agrícola recente, em expansão, principalmente nas regiões subtropicais, desprovida de várias informações técnicas como: dados sobre polinização, viabilidade polínica e receptividade estigmática, assim como fatores que podem influenciar esses processos, nas específicas condições ambientais nacionais. Objetivou-se com esse trabalho testar metodologias que preservem a viabilidade polínica, ao longo do tempo, assim como estabelecer o melhor momento para se intervir com o pólen no estigma, durante uma hibridização, na cultivar Arbequina, além de investigar irregularidades que ocorrem durante a microsporogênese de duas cultivares: Arbequina e MGS GRAP 541, quando submetidas a aplicação de diferentes defensivos agrícolas, durante a florada, e avaliar se essas anormalidades interferem na viabilidade dos grãos de pólen. Durante o primeiro experimento foram realizadas a descrição dos eventos florais, teste de armazenamento de grãos de pólen em três condições diferentes: Temperatura ambiente (27 °C), geladeira (8 °C) e freezer (-10 °C) e a última fase verificou-se a receptividade estigmática floral pelo método de peróxido de hidrogênio a 3%, com flores em pré-antese, antese e pós-antese, ao longo do dia, da cultivar Arbequina. Como resultado, na descrição dos eventos florais, verificou-se que a oliveira apresenta antese diurna, com abertura floral entre 10 e 11 horas, as anteras armazenadas em freezer, tiveram melhor resultado, preservando a viabilidade por 60 dias e os estigmas apresentaram-se receptivos desde a pré-antese. No segundo experimento, inflorescências de duas cultivares de oliveira, Arbequina e MGS GRAP541, foram submetidas a aplicação de cinco defensivos agrícolas: óleo mineral, óleo de neem, dimetoato, deltametrina e tratamento controle (água), sendo as flores fixadas em Carnoy e posteriormente quantificado a porcentagem de anormalidades meióticas através do protocolo para estudo meiótico pela técnica de esmagamento e coloração por carmim propiônico a 0,5%. Durante esse experimento foram testados a viabilidade do pólen pelo método de coloração de Alexander e pelo método de germinação *in vitro*, em meio de cultura específico para pólen de oliveira, sendo os resultados, dos dois métodos de viabilidades analisados individualmente e em conjunto avaliando sua similaridade. Como resultado, as duas cultivares apresentaram aumento na porcentagem de anormalidades cromossômicas quando utilizado os defensivos agrícolas. Nos testes de viabilidade polínica, ambos os métodos, para as duas cultivares, apresentaram maior porcentagem de pólen viáveis no tratamento testemunha e menor porcentagem de viabilidade polínica na presença dos defensivos agrícolas. O método de viabilidade polínica por coloração apresentou as maiores médias de pólen viáveis, porém, ambos os métodos, quando comparados conjuntamente, apresentaram uma correlação linear positiva fortemente relacionada, indicando que ambos representam a viabilidade polínica dos tratamentos.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L.. Viabilidade polínica. Receptividade Estigmática

## ABSTRACT

Brazil is a great importer of olive oil, beginning to emerge for the national production, being an expanding recent business, mainly in the subtropical regions lacking a great deal of technical information such as: data about pollination, pollen viability and stigma receptivity as well as factors which can affect those processes under the particular national environmental conditions. It was intended through this work to test the methodologies which preserve pollen viability along time as well as establish the best timing to intervene in pollen in the stigma during hybridization in cultivar Arbequina, in addition to investigating irregularities occurring during the microsporogenesis of two cultivars: Arbequina and MGS GRAP 541, when submitted to the application of different agricultural defensives during blooming and evaluating whether those abnormalities and viability of pollen grains. During the first experiment, the description of the floral features, storage test of pollen grains under three different conditions were conducted: Environmental temperature (27 °C), refrigerator (8 °C) and freezer (-10 °C) and the last phase, the floral stigma receptivity by the 3% hydrogen peroxide with flowers at pre-anthesis, anthesis and post-anthesis was verified along the day of cultivar Arbequina. As a result, in the description of the floral features, it was found that the olive tree presents diurnal anthesis, with floral opening between 10 and 11 hours, the freezer-stored anthers, had best result, preserving viability for 60 days e the stigmas have proved receptive since pre-anthesis. In the second experiment, inflorescences of two olive cultivars, Arbequina and MGS GRAP541, were submitted to the application of five agricultural defensives: mineral oil, neem oil, dimethoate, deltamethrine and control treatment (water), the flower being fixed in Carnoy and later the percentage of meiotic abnormalities quantified through the protocol for meiotic study by the squash technique and 0.5% propionic carmine staining. During this experiment, the pollen viability was tested by the Alexander staining method and by the *in vitro* germination method in culture medium specific for olive pollen, the results of the two viability methods being analyzed singly and in joint evaluating their similarity. As a result, the two cultivars presented increase in the percentage of chromosome abnormalities when the agricultural defensives were utilized. In the pollen viability tests, both the methods for the two cultivars presented increased percentage of viable pollen in the control treatment and decreased pollen viability percentage in the presence of the agricultural defensives. The pollen viability method by staining showed the highest means of viable pollens, but, both methods when compared jointly, presented a strongly related positive linear correlation, indicating that both stand for the pollen viability of the treatments.

**Keywords:** *Olea europaea* L.. Pollen viability. Stigmatic viability

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância econômica das oliveiras .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Região Sul.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Região Sudeste .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Botânica e descrição .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Inflorescências de oliveira.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Estigma .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>Grãos de pólen .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6</b>	<b>Aplicação de defensivos agrícolas na florada .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7</b>	<b>Tipos de defensivos agrícolas .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Óleo mineral .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Óleo de neem .....</b>	<b>18</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Dimetoato .....</b>	<b>19</b>
<b>2.7.4</b>	<b>Deltametrina.....</b>	<b>19</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
	<b>ARTIGO 1 - ARMAZENAMENTO DE PÓLEN E PROPRIEDADES DO ESTIGMA DE OLIVEIRA PARA FINS DE MELHORAMENTO GENÉTICO .....</b>	<b>25</b>
	<b>ARTIGO 2 - ANORMALIDADES INDUZIDAS POR DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NA MICROSPOROGÊNESE DE DUAS CULTIVARES DE OLIVEIRA (OLEA EUROPAEA L.) .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é considerada uma das plantas mais antigas cultivadas pela homem. Sua chegada ao Brasil data do século XIX, porém, foi somente nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas tecnologias, que se passou a existir a possibilidade de plantios comerciais, sendo que atualmente a cultivar Arbequina é uma das mais plantadas em todo território nacional (SILVA et al., 2014a).

O índice de fixação de azeitonas pós colheita é baixo, o que tem acarretado em produção de azeitonas ainda incipientes nas regiões subtropicais brasileiras. De modo geral, a viabilidade polínica e receptividade do estigma, assim como fatores externos que podem influenciar nessas estruturas, são informações fundamentais para se utilizar em trabalhos de melhoramento e manejo.

O estigma é uma estrutura fundamental, pois, a aptidão das flores no processo de fecundação esta diretamente relacionado com sua receptividade aos grãos de pólen. Essa receptividade pode durar apenas algumas horas, como no caso de algumas espécies da família Anacardiaceae, ou vários dias como ocorrem em vários membros da família Solanaceae (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Em algumas plantas a receptividade do ovário é indicada pela viscosidade do estigma, sendo que esta viscosidade possibilita a aderência do grão de pólen. Além disso, a superfície estigmática contem nutrientes que possibilitam a germinação do tubo polínico (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Além do estigma, para o sucesso em hibridizações é fundamental que o pólen a ser utilizado apresente alta taxa de viabilidade/germinação. Sendo assim, também fazem-se necessários maiores estudos sobre fatores externos que podem interferir nessa viabilidade, como a aplicação de produtos fitossanitários na época da florada, assim como maior comprometimento no desenvolvimento de técnicas que prolonguem o tempo de utilização dos grãos de pólen (HANSER et al., 1998; EINHARDT et al., 2006).

Objetivou-se, com esse trabalho, testar metodologias de armazenamento, que preservem a viabilidade polínica, ao longo do tempo, assim como se estabelecer qual o melhor momento para se intervir com o pólen no estigma, durante uma hibridização, na cultivar Arbequina. Além de

investigar a microsporogênese de duas cultivares: Arbequina e MGS GRAP 541, submetidas a aplicação de diferentes produtos fitossanitários, durante a florada, e avaliar se essas anormalidades interferem na viabilidade dos grãos de pólen.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância econômica das Oliveiras**

O volume de importações de azeite e azeitona no Brasil tem crescido nos últimos anos. Estudo conduzido por Silva et al. (2014a) apontam que nos últimos dez anos houve um aumento de 476% no volume de importações de azeite e 317% no volume importações de azeitonas de mesa pelo Brasil. Este aumento deve-se a fatores como:

- Divulgação dos benefícios de seu consumo a saúde;
- Preços mais acessíveis ao consumidor;
- Aumento de poder aquisitivo de algumas classes sociais.

Dentro desse contexto, atualmente o país configura-se como o oitavo maior importador de azeite e azeitona de mesa do mundo (COI, 2016). Segundo o Consejo Oleícola Internacional (COI), o Brasil importou no ano de 2014, 67 mil toneladas de azeite de oliva e 103 mil toneladas de azeitona de mesa, sendo que em 2015 esse montante de importações, sobre esses produtos, prevaleceu.

Isso demonstra a grandiosidade do mercado nacional para os produtos oriundos da oliveira, o que vem incentivando, nos últimos anos, pequenos e grandes produtores a implantar e expandir pomares comerciais, em regiões potencialmente produtoras pelo país.

Em 2008, a produção nacional, consistia em apenas uma tonelada de azeitonas situadas em 6 hectares, em 2011 foram 77 toneladas em uma área de 43 hectares, em 2013 esse valor aumentou para 265 toneladas, distribuídas em uma área de 146 hectares e 2014 foram 512 toneladas de azeitonas em 421 hectares (IBGE, 2015).

Atualmente de 241 hectares de olivais produtivos, 144 hectares estão situados na região Sul, especificamente Rio Grande do Sul, e os outros 97 hectares estão localizados na região Sudeste sendo oito hectares em São Paulo e 89 hectares em Minas Gerais (IBGE 2015).

### **2.1.1 Região Sul**

A olivicultura da região Sul do país abrange os estados do Rio Grande do Sul e do Paraná, onde o plantio se difunde por vários municípios. No estado de Santa Catarina, através da EPAGRI, existem experimentos com oliveiras, sendo que a olivicultura, nessa região, é incipiente (ARGOS, 2015).

### **2.1.2 Região Sudeste**

Segunda Silva et al. (2012b), o plantio de oliveira destas regiões se concentram em Minas Gerais e São Paulo, que juntos abrangem uma área de produção de aproximadamente 400 ha em 40 municípios

Os primeiros exemplares de oliveira foram introduzidos no município de Maria da Fé, em 1935, por agricultores descendentes de portugueses. O primeiro plantio em larga escala foi realizado com 200 pés, na Fazenda Pomária, neste mesmo município, em Minas Gerais, na década de 1940. A formação dos Bancos de Germoplasma da EPAMIG teve início na década de 50 a partir de sementes coletadas em oliveiras existentes em propriedades particulares e públicas da região. Hoje, em Minas Gerais, existem cerca de 80 mil plantas de oliveira em uma área de aproximadamente 150 hectares (ALVES, 2012).

A EPAMIG de Maria da Fé foi a primeira no Brasil a extrair o azeite utilizando o processo de prensagem e posterior decantação, separando o azeite por diferença de densidade. O produto obtido deste processo possui excelentes qualidades, podendo ser classificado como azeite de oliva extra virgem (SILVA, 2012a)

Hoje a Fazenda Experimental da EPAMIG, de Maria da Fé, conta com novos equipamentos para extração de azeite, e os disponibiliza para uso de produtores e parceiros interessados. Em 2011 foram extraídos nessas instalações um volume de 500 litros de azeite, em 2012 3,2 mil litros e em 2013 5 mil litros (SILVA, 2014b).

## 2.2 Botânica e descrição

A oliveira, *Olea europaea* L., pertencente a família Oleácea, é uma árvore de tamanho médio e formato arredondado. Exibe polimorfismo, com duas fases bem distintas de desenvolvimento: a juvenil e a adulta (RALLO, 1998).

Na fase juvenil a oliveira não emite flores nem frutos, apresentando folhas mais curtas e grossas e entrenós dos ramos menores. Na fase adulta a planta atinge seu potencial produtivo, sendo as folhas maiores e delgadas e os entrenós de maior comprimento, em relação a fase juvenil (RAPOPORT, 2008).

As folhas adultas são simples e de forma elíptica, elíptica-lanceolada ou lanceolada, com comprimento variando de 5,0 a 7,0 cm e largura de 1,0 a 1,5 cm. A face adacial geralmente apresenta uma cor verde escura brilhante, devido à existência de cutícula sem a presença de estômatos, enquanto que a região abaxial é de cor esbranquiçada devido, em parte, à presença de tricomas, (CRUZ, et al., 2012).

A inflorescência é em paniculada, apresentando ramificações desde o eixo central que, por sua vez, podem também estar ramificadas. Estas se situam nas axilas foliares de crescimento vegetativo do ano anterior (RALLO, 1998).

A flor é constituída por quatro sépalas verdes soldadas, formando o cálice e por quatro pétalas brancas, também soldadas pela base, que formam a corola. Trata-se de uma flor actinomorfa com simetria regular. Apresenta dois estames que se inserem pela base da corola com disposição oposta. Esses estão constituídos por filamento e antera de cor amarela, dividida em dois lóbulos onde estão localizados os grãos de pólen. No centro da flor encontra-se o pistilo, composto de um ovário supero, estilo curto e grosso e estigma bilocado e papiloso. A maturação dos órgãos sexuais ocorre vinte dias antes da floração, com o desenvolvimento do saco embrionário e a maturação dos gametas (RAPOPORT, 2008).

Quanto à carpometria, o fruto, denominado azeitona, é uma drupa de tamanho pequeno e forma elipsoidal, cujas dimensões variam em função do cultivar (RAPOPORT, 2008; SILVA et al., 2012b).

### **2.3 Inflorescências de oliveira**

As inflorescências das oliveiras são compostas por flores perfeitas, ou seja, quando os estames e o pistilo são completamente desenvolvidos e imperfeitas também conhecidas como estaminadas, são flores que apresentam um ovário rudimentar ou ausente, porém com estames completamente desenvolvidos (RALLO, 1998; SILVA et al., 2016).

Segundo Argenson et al. (1999), o número de flores perfeitas e imperfeitas numa inflorescência vai estar relacionada com a temperatura do ambiente, no momento da diferenciação floral, sendo que temperaturas muito elevadas, no momento dessa diferenciação, acarretariam numa maior quantidade de abortos do pistilo aumentando a quantidade de flores imperfeitas.

Os grãos de pólen são bicelulares, encontrando-se maduros no momento da abertura floral e deiscência das anteras, essas ficam liberando os grãos por aproximadamente cinco dias, (FERNÁNDEZ; RODRIGUEZ-GARCÍA, 1988).

O pistilo fica no centro da flor e é composto por: ovário súpero com duas cavidades, estilete curto e estigma biloculado. Dentro de cada cavidade do ovário contém dois óvulos, a partir deles desenvolve-se o saco embrionário que fica maduro e receptivo para ser fecundado no momento da antese. Somente um dos 4 óvulos é fecundado e se desenvolve para formar a semente (RAPOPORT, 2008).

### **2.4 Estigma**

O estigma se trata de uma superfície floral receptora que propicia a adesão do grão de pólen durante o evento da polinização, posteriormente é o estigma que reconhece e proporciona o ambiente apto para a germinação dos grãos de pólen, nos processos de adesão, reidratação, e germinação (ZANANDREA et al., 2011).

O estigma da oliveira é caracterizado como bilobado, úmido, com um estilete sólido, sendo papiloso em quase toda a sua superfície com exceção da região interna central onde ocorre a secreção celular (SERRANO et al., 2008).

Seus exsudatos são observados na superfície das papilas no momento da abertura floral, sendo que suas anteras, nesse estágio, ainda não se encontram deiscentes (SERRANO et al., 2008; ZHU et al., 2013).

## 2.5 Grãos de pólen

Existem vários estudos sobre o processo de formação dos grãos de pólen de oliveira, (FERNÁNDEZ; RODRIGUEZ-GARCÍA, 1988; MORENO-ALÍAS et al., 2009; ZHU et al., 2013). Sendo que a oliveira é tipicamente conhecida pela grande quantidade de pólen liberada durante a florada (ZHU et al., 2013). Sua polinização ocorre principalmente pelo vento, podendo o pólen ser transportado por vários quilômetros, porém estima-se que cerca de 95% da deposição do pólen ocorre a uma distância inferior a 40 metros do local de sua liberação (RALLO et al., 1998).

Após o processo de polinização, ocorre a mobilização de lipídios e proteínas para a formação de um ‘base’ na superfície do grão de pólen, que tem como função aumentar a superfície de contato do pólen com o estigma (EDLUND et al., 2004).

No processo de hidratação polínica, em estigmas úmidos, como no caso da oliveira, ocorrerá imediatamente após adesão do pólen ao estigma (RALLO et al., 1998).

A germinação do pólen promove uma nova organização do citoplasma e do citoesqueleto, tendo como finalidade suportar a extensão do tubo polínico, após atravessar a barreira de exina, especificamente na região do ‘base’, esse tubo ultrapassa a barreira do estigma e penetra no estilete (EDLUND et al., 2004).

Durante o desenvolvimento do tubo polínico da oliveira, estudos demonstraram a presença de corpos lipídicos próximos a região de emissão do tubo polínico, após três horas de incubação do pólen, indicando realocação dos corpos lipídicos do pólen para o tubo polínico. Após sete horas da germinação, do pólen, as quantidades de corpos lipídicos, dentro do tubo polínico, não são substanciais. Esses resultados evidenciam que os corpos lipídicos provavelmente podem estar envolvidos na germinação do pólen e na penetração do estigma de oliveira (RODRÍGUEZ-GARCIA et al., 2003).

## **2.6 Aplicação de defensivos agrícolas na florada**

A receptividade do estigma, a porcentagem de germinação dos grãos de pólen, assim como a integridade do óvulo e do ovário pode variar devido a fatores, ambientais, genéticos e sanitários. Sendo que, para alguns autores, a receptividade do estigma, a viabilidade polínica e a aptidão das demais estruturas parece estar mais relacionada com o tipo de planta ou cultivar trabalhada do que com os fatores ambientais e sanitários (LEITÃO et al., 1982).

Porém, diversos trabalhos vêm demonstrando o impacto que determinados fatores, como os produtos fitossanitários, podem causar danos as estruturas reprodutivas. Bristow e Shawa (1981), trabalhando com a influência de fungicidas na germinação do pólen e na produção de cranberry, constataram que a aplicação do fungicida acarretou em danos da superfície estigmática das flores. Wetzstein (1989), obteve resultado semelhante trabalhando com pecan, sendo que também observou a degeneração superficial do estigma e do tubo polínico. Williams et al. (1987), trabalhando com aplicação de fungicida em maçã não observou diferença no desenvolvimento do tubo polínico, porem constatou que as flores, submetidas ao produto químico, apresentaram diminuição da longevidade do ovário, e diminuição do seu tamanho, o que pode acarretar em uma possível redução no tamanho final do fruto.

Com relação ao pólen, diversos trabalhos, realizado ao longo dos anos, vem demonstrando, que determinadas classes de inseticidas , aplicados durante a florada, acarretam, como consequência, diminuição da porcentagem de germinação e/ou redução do comprimento do tubo polínico de diferentes culturas (GENTILE et al., 1971; SILVA et al., 1999; MOREIRA et al., 2005).

## **2.7 Tipos de defensivos agrícolas**

### **2.7.1 Óleo mineral**

O óleo é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos, de ciclo parafínicos e aromáticos saturados e insaturados originários da destilação do petróleo. A classe é inseticida e acaricida de

contato, adjuvante, do grupo químico hidrocarbonetos alifáticos, com classificação toxicológica IV - pouco tóxico (AGROFIT, 2017).

Pode ser utilizado como inseticida ou como adjuvante, quando utilizado como inseticida recomenda-se aplicação na parte aérea da planta (AGROFIT, 2017).

Segundo Tan et al. (2005), o óleo mineral pode causar sintomas de fitotoxicidade, que se apresentam na forma de necrose, lesões, amarelamento e queda das folhas. Tais efeitos podem ocorrer devido a acidificação natural de moléculas insaturadas presentes na composição do produto. Além disso esses compostos ácidos presentes no óleo mineral, são influenciados pela qualidade, dose do produto e condições ambientais no momento da aplicação.

### **2.7.2 Óleo de neem**

*Azadirachta indica* A. Juss é o nome científico da planta popularmente conhecida por neem. O ingrediente ativo responsável por suas propriedades inseticidas é a azadiractina, pertence ao grupo químico dos Tetranortriterpenóide, com classificação toxicológica III - Medianamente tóxico, e classificação ambiental IV - Produto pouco perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2017).

A azadiractina presente no óleo de neem é muito eficiente para inibir a alimentação e a postura de ovos dos insetos, também interferindo diretamente no crescimento e tamanho populacional dos mesmos e na regulação da ecdise (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Devido à alta eficiência no combate dos insetos e ao baixo risco ambiental e toxicológico o óleo de neem é um produto altamente usado na agricultura natural.

Segundo alguns estudos, Rickli et al. (2011) e Mossini e Kemmelmeier (2005), produtos oriundos do neem, apesar de seus benefícios, podem causar fitotoxicidade em plantas, quando aplicados em altas concentrações, porém, essa fitotoxicidade se manifesta dependendo da espécie de planta, idade, fase de desenvolvimento, assim como condições ambientais.

### 2.7.3 Dimetoato

O dimetoato é um inseticida de formulação concentrado emulsionável, sistêmico com ação de contato e ingestão, do grupo químico dos organofosforados. Dentre as classes de toxicidade dos inseticidas, o dimetoato encontra-se na classe I, ou seja, extremamente tóxico e com potencial de periculosidade ambiental II, ou seja, produto muito perigoso ao meio ambiente. É inflamável e nocivo em contato com a pele e por ingestão (AGROFIT, 2017).

Alguns trabalhos vêm demonstrando o impacto dos organofosforados nas plantas. Salamandane (2015) trabalhando com toxicidade de dimetoato e mancozed em *Brassica rapa* L. observou menor tamanho nas plantas e menor germinação de sementes nos tratamentos onde foi utilizado maior concentração do produto, sendo interpretado pelo autor como um sintoma de fitotoxicidade.

Silva et al. (2003) avaliando o efeito fitotóxico do Paration metílico, um organofosforado, na cultura do sorgo, observou um aumento da quantidade e tamanho das necroses foliares, conforme se aumentou a concentração do inseticida.

A nível molecular, estudos básicos com microtubulos em cromossomos metafísicos mitóticos de plantas, verifica-se que mesmo, em baixas concentrações, certos inseticidas organofosforados, inibem a formação de fusos cromáticos induzindo a separação dos cromossomos, sendo que estes ficam dispersos no citoplasma (MOREJOHN et al., 1987).

Binsfeld et al. (2000), trabalhando com o efeito de dois herbicidas, Oryzalin (ORY) do grupo das Dinitroanilinas e Amiprofós-metil (APM) do grupo dos organofosforados, sobre a polimerização de microtubulos, em células do mesófilo de Girassol silvestre (*Helianthus maximiliani* L.), observaram modificações mitóticas causadas pela ausência de microtúbulos, seguido do aparecimento de células com cromossomos espalhados pelo citoplasma, com posterior condensação destes, formando micronúcleos.

### 2.7.4 Deltametrina

Deltametrina é um inseticida de formulação concentrado emulsionável, sendo seu mecanismo de ação por contato e ingestão, pertencendo ao grupo químico dos piretróides. Dentre

as classes de toxicidade dos inseticidas, a deltametrina encontra-se na classe I, extremamente tóxico, com potencial de periculosidade ambiental II, ou seja, muito perigoso ao meio ambiente. É nocivo em contato com a pele e por ingestão (AGROFIT, 2017).

Alguns trabalhos, ao longo do anos, vem demonstrando uma serie de alterações nas plantas, a nível celular, quando utilizado produtos pertencentes a classe dos piretroides. Chauhan e Gupta, (2005), observaram que a deltametrina, em células de raízes de cebola, aumentaram o número de próplastídios e mitocôndrias, sendo que os próplastídios se apresentaram elétrodensos e altamente constrictos na região central. Também observaram alterações morfológicas no retículo endoplasmático, complexo de Golgi, na estrutura da membrana plasmática e parede celular, além de distúrbios nos arranjos de microtúbulos. Além disso, Çavuşoğlu et al. (2010), observou, na planta, redução significativa de clorofila A, B e carotenoides, além de aumento de determinadas enzimas antioxidantes, indicando estresse oxidativo após a utilização do produto.

Chauhan et al. (1986), trabalhando com efeitos da deltametrina em meristemas de raízes de cebola, verificaram aumento de anomalias mitóticas para todas as concentrações do produto utilizadas. Chauhan e Gupta (2005), estudando efeito combinados de herbicidas com piretróides, em meristemas de raízes de cebola, observaram que altas concentrações de deltamitrina acarretaram em aumento de frequência de anormalidades e que seu uso combinado, com determinados herbicidas, culminou em maiores efeitos fitotóxicos a planta do que sua utilização isolada. Çavuşoğlu et al. (2010) trabalhando com efeitos da Cipermetrina em meristemas radiculares de cebola, concluiu que a utilização desse piretróide, em qualquer dosagem, acarreta em diminuição da atividade mitótica e aumento da incidência de anormalidades durante esse processo.

## REFERÊNCIAS

ALVES, M. J. et al. Oliveira em Minas Gerais: história e agentes de desenvolvimento. In: OLIVEIRA, A. F. **Oliveira no Brasil: tecnologia de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. Cap. 2, p. 41-69.

ANGENSON, C.; RÉGIS, S., JOURDAIN, J.M.; VAYSSE, P. (1999). L' Olivier. Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris. 204p.

ASSOCIAÇÃO RIO-GRANDENSE DE OLIVICULTORES – ARGOS. **Oliveiras**. Disponível em: < [http://www.argos.org.br/new\\_argos/?page\\_id=409](http://www.argos.org.br/new_argos/?page_id=409) > Acesso em: 26 out. 2016.

BINSFELD, P.C. et al., Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulo em protoplasto de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia**. v.12, n.3, p.263-272. 2000.

BRISTOW, P. R.; SHAWA, A. Y. The influence of fungicides on pollen germination and yield of cranberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 106, n. 3, p. 290-292. 1981.

ÇAVUŞOĞLU, K. et al., Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. **Environmental Toxicology**. v.27, n.10, p.583-589, 2010.

CHAUHAN L.K.S; GUPTA, S.K. Combined and ultrastructural effects of substituted érea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristema cells of *Allium cepa*. **Pesticide biochemistry and physiology**. v.82, n.1, p.27-35, 2005.

CHAUHAN, L.K.S. et al., Effect of deltamethrin on plant cells – I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. **Mutation Research**. v.171, n.1, p.25-30, 1986.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL – COI. **Cifras Aceites de oliva en aceitunas de mesa**. Disponível em : <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> >. Acessado em: 19 out. 2016.

CRUZ, M. C. M. et al. Botânica, anatomia e ecofisiologia. In: OLIVEIRA, A. F. **Oliveira no Brasil: tecnologia de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. Cap. 2, p. 41-69.

EDLUND, A.F.et al. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The plant cell**. v.16, p.84-97, 2004.

EINHARDT, P. M. et al. Comparação entre métodos para testar a viabilidade do pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5- 7, 2006.

FERNÁNDEZ, M. C.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I. Pollen wall development in *Olea europaea* L. **New phytologist**, v. 108, n.1, p.91-99, Jan.1988.

GENTILE, A.G. et al., Effect of some formulated insecticides on pollen germination in tomato and petúnia. **Journal of Economic Entomology**, v. 64, n.4, p.916-919, 1971.

HANSEN, A. L. et al. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, v. 101, n. 2, p. 231- 237, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal: oliveira.** Disponível em: <  
[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2015\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf) >. Acesso em: 26 out. 2016.

LEITAO, F. A. et al. A viabilidade do polen de vinte cultivares de *Olea Europaea* L. **Agronomia Lusitana**, v. 41, n.4, p 259-267, 1982.

MOREIRA, M.D. et al., Interferência *in vitro* de pesticidas e condições ideais para a germinação e crescimento do tubo polínico do mamoeiro (*Caricapapaya* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.1, p.171-176, 2005.

MOREJOHN, L.C. et al., Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. **Planta**. v.172, n.2, p.252-264. 1987.

MORENO-ALÍAS, I. et al., Morphological and anatomical evaluation of adult and juvenile leaves of olive plants. **Trees**. v.23, n.1, p. 181-187, 2009.

MOSSINI, S.A.; KEMMELMEIER, C.; A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Multiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. V.24, n.1, p.139-148, 2005.

RALLO, L. Fructificación y producción. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Ed.). **El cultivo del olivo**. 2. ed. Servilha: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía; Madrid: Mundi, 1998. p. 115-144.

RAPOPORT, H. F. Botânica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Ed.). **El cultivo del olivo**. 6.ed. rev. amp. Madrid: Mundi-Prensa, 2008. p. 34-62.

RICKLI, H.C. et al, Efeito alopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, feijão e picão-preto. **Ciências Agrárias**. v.32, n.2, p.473-484, 2011.

RODRÍGUEZ-GARCIA, M.I. et al., Behavior of storage lipids development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma**. v.221, n3, p.237-244, 2003.

SALAMANDANE, A. Toxicidade de dimetoato e macozeb a *Brassica rapa* L. **Ambiência**. v.11, n.3, p.603-610, 2015.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL' AGNOL, M. Auto Incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1083- 1090, 2002.

SERRANO, I. et al., Strutral organization and cytochchemical features of the pistil in olive (*Olea europaea* L.) cv. Piculal at anthesis. **Sex Plant Reproduction**. v.21, n.2, p.99-111. 2008.

SILVA, D.A. et al., Toxicidade de paration metílico em sorgo granífero. **Ceres**. v.50, n. 291, p.675-679, 2003.

SILVA, L. F. et al. Índice de qualidade em amostras de azeite de oliva extraídas de cultivares de oliveirado Sul de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v. 35, n. 282, p. 34- 49, 2014a.

SILVA, L. F. O. et al. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012a.

SILVA, L. F. O. **Meio de cultura para germinação de grãos de pólen e paclobutrazol em cultivares de oliveira**. 2014. 85 p. Tese (Doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014b.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ZAMBON, C. R. Caracterização agronômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012.

SILVA, L. F. O.; ZAMBON, C. R.; PIO, R.; OLIVEIRA, A. F.; GONÇALVES, E. D. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 26-32, 2016.

SILVA, M. et al., Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: Meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.3, p.347-352, 1999.

Sistema de Agrotóxicos e Fitossanitários – AGROFIT, (2017). Consulta de ingrediente ativo. 02 de janeiro de 2017. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) . Acessado em: 02 de janeiro de 2017.

TAN, B.L. et al., Localization and movement of mineral oil mineral oil in plants by fluorescence and confocal microscopy. **Journal of Experimental Botany**. v.56, n.420, p. 2755-2763, 2005.

WETZSTEIN, H.Y.; SPARKS, D. Stigma-pollen interaction in peca, *Carya illinoensis* **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.114, n.2, p.335-359. 1989.

WILLIAMS, R.R. et al., The mechanism of yield suppression by a triadimefon fungicide programme on the apple cv. Cox1s Orange pippin. **Journal Horticultural Science**, v. 62, n.3, p. 291-294, 1987.

ZANANDREA, I. et al., Receptividade do estigma e desenvolvimento do tubo polínico em flores de pessegueiro submetidas em temperatura elevada. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2066-2072, 2011.

ZHU, W. et al ., Advances in the pollination biology of olive (*Olea europaea* L.). **Acta Ecologica Sinica**. v.33, n2, p. 64-71, 2013.

Artigo 1 - Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência Agronômica

## **Armazenamento de pólen e propriedades do estigma de oliveira para fins de melhoramento genético<sup>1</sup>**

### **Pollen storage and properties of the oil olive tree stigma for breeding purposes**

Carolina Ruiz Zambon<sup>2</sup>, Luiz Fernando de Oliveira<sup>3</sup>, Rafael Pio<sup>4</sup>, Flávio Gabriel Bianchini<sup>5</sup>, Adelson Francisco de Oliveira<sup>6</sup>

**RESUMO:** Para assegurar o sucesso em hibridizações controladas, com oliveiras, é fundamental informações sobre a viabilidade polínica, assim como a receptividade do estigma. O objetivo desse trabalho foi estabelecer metodologias que aumentem a preservação da viabilidade polínica e estabelecer o momento para se realizar cruzamentos em trabalhos de hibridização com oliveiras. Foram realizados três experimentos com plantas de ‘Arbequina’, em Maria da Fé, MG. No primeiro experimento realizou-se a descrição dos eventos florais. No segundo experimento, anteras foram dessecadas em eppendorfs, sendo armazenados em três condições diferentes, para teste de viabilidade do grão de pólen: temperatura ambiente (28°C), geladeira (8 °C) e freezer (-10 °C). Para avaliação da germinação *in vitro* utilizou-se meio de cultura para grãos de pólen de oliveira. Para isso, grãos de pólen foram transferidos em placa de Petri, contendo meio de cultura e colocadas em BOD a 28 °C por 60 horas, sendo avaliados. A primeira avaliação foi realizada antes da montagem do experimento, testando a viabilidade inicial, a segunda 24 horas após armazenamento, posteriormente, foram realizadas sete avaliações quinzenais. No terceiro experimento verificou-se a receptividade estigmática floral pelo método de peróxido de hidrogênio a 3%, com flores em pré-antese, antese e pós-antese, avaliados a cada uma hora, no período de 7 as 18 horas por três dias. As anteras armazenadas em freezer preservam viabilidade por 60 dias. Na descrição dos eventos florais verificou-se que a oliveira apresenta antese diurna,

---

<sup>1</sup> Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada da Universidade Federal de Lavras - UFLA

<sup>2</sup> Bióloga, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Dep. de Biologia, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG. carol-rzambon@hotmail.com

<sup>3</sup> Eng. Agron., D. Sc., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG, 37517-000, Maria da Fé-MG. luizfernando.agronomia@gmail.com

<sup>4</sup> Engº Agron., D. Sc., Professor Adjunto, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Dep. de Agricultura, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG. rafaelpio@dag.ufla.br

<sup>5</sup> Eng. Agron., D. Sc., Universidade Federal de Lavras - UFLA, Dep. de Agricultura, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG. fgbianchini@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Eng. Agron., D. Sc., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Caixa Postal 176, 37200-000, Lavras-MG. adelson@epamig.ufla.br

com abertura floral entre 10 e 11 horas. Os estigmas apresentaram-se receptivos desde a pré-anthese.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L.. Viabilidade polínica. Grãos de pólen. Híbridação.

**ABSTRACT:** To ensure success in controlled hybridization, in olive growing, is fundamental information about the pollen viability, as well as stigma receptivity. The objective of this work was to establish methodologies which increase the preservation of pollen viability and establish the timing to carry out crosses in hybridization works with oil trees. Three experiments were conducted with plants of 'Arbequina' at Maria da Fé, MG. In the first experiment, the account of the floral events was determined. In the second experiment, anthers were dissected and placed into eppendorfs, being stored in three different conditions for test for pollen grain viability: room temperature (27 °C), refrigerator (8 °C) and freezer (-10 °C). For evaluation of *in vitro* germination, a culture medium specific to oil tree pollen grains was employed. For this purpose, pollen grains were transferred onto Petri dish, containing culture medium and placed in BOD at 28 °C for 60 hours, being afterwards entered. The first evaluation was carried out before the distribution of the pollen grains to evaluate the initial viability, the second one 24 hours after storage; later seven fortnightly evaluations were performed. In the third experiment, floral stigma receptivity was found by the 3% hydrogen peroxide method at pre-anthesis, anthesis and post-anthesis, evaluated every one hour, in the period of 7 to 18 hours for three days. The freezer-stored anthers preserve viability for 60 days. In the account of floral event, it was found that the oil tree present diurnal asynchronous anthesis, floral opening between 10 and 11 hours. Stigmas have shown themselves receptive since pre-anthesis, with receptivity frequency along day.

**Key-works:** *Olea europaea* L.. Pollen viability. Pollen grains. Hybridization.

## INTRODUÇÃO

O Brasil configura-se, no cenário mundial, como grande importador de azeitonas e azeite. Pesquisas com a oliveira (*Olea europaea* L.) vem sendo realizadas, em olivais já instalados em algumas regiões dos Estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais (SILVA *et al.* 2012a).

A carpometria dos frutos e caroços de oliveira é determinante para o processo de definição do potencial de exploração da cultivar, destacando sua finalidade de uso, seja para extração de azeite ou elaboração de conservas e, no caso do cultivo em regiões subtropicais brasileiras, algumas cultivares e seleções se destacam, como Negraoa, MGS ASC322, MSG MISS293, MGS JB1, MGS GRAP556, MGS GRAP541 e Arbequina (SILVA *et al.* 2012b).

De todas as cultivares com potencial produtivo, avaliadas em nossas regiões, a cultivar Arbequina é a mais utilizada pelos produtores e conseqüentemente é a cultivar mais representativa nos olivais brasileiros. Se trata de uma cultivar originária da Espanha, utilizada principalmente para produção de azeite que se adaptou muito bem as condições ambientais das regiões onde está se estabelecendo a olivicultura no país (SILVA *et al.* 2012a).

Baseado nessas informações, atualmente tem-se conhecimento do desempenho produtivo de diferentes cultivares, introduzidas nos últimos anos no país. O Brasil, hoje em dia, também possui variedades próprias, desenvolvidas a partir de trabalhos utilizando hibridizações espontâneas, com posterior avaliação do desempenho dos genótipos oriundos desses cruzamentos.

Porem a nova premissa desses trabalhos de melhoramento seria a utilização de hibridizações controladas onde teríamos informações de ambos os progenitores, aumentando assim a possibilidade de se obter uma cultivar com as características desejadas dentro de um trabalho de seleção.

Basicamente para se assegurar o sucesso em hibridizações é fundamental que o grão de pólen a ser utilizado apresente alta taxa de viabilidade e germinação. Teoricamente a coleta de grão de pólen, no estágio floral adequado e corretamente preparado não necessita de teste de viabilidade (BRITO *et al.* 2010).

Porém, muitas vezes não existe a possibilidade de coleta e utilização imediata, como em casos de falta de sincronidade floral entre as cultivares, ou quando os grãos de pólen são coletados em uma região distante de onde irá se realizar a hibridização. Nessas situações é

necessário, inclusive, avaliar a viabilidade antes da utilização do material, assim como testar e desenvolver técnicas que prolongue sua viabilidade (EINHARDT *et al.* 2006).

O estigma é outro fator fundamental, pois, a aptidão das flores no processo de fecundação está diretamente relacionado com a receptividade do mesmo, ao grão de pólen. Essa receptividade pode durar apenas algumas horas, como no caso de algumas espécies da família Anacardiaceae, ou vários dias como ocorrem em várias espécies da família Solanaceae (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002). Além disso, em algumas plantas, a receptividade do ovário é indicada pela umidade do estigma, que possibilita a aderência do grão de pólen. Além disso, a superfície estigmática contém nutrientes que possibilitam a germinação do tubo polínico. (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer metodologias que aumentem a preservação da viabilidade polínica e estabelecer o momento ótimo para se realizar cruzamentos em trabalhos de hibridização com oliveiras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Esse estudo foi realizado entre os meses de agosto e setembro 2015, com a cultivar Arbequina, com oito anos de idade, em Maria da Fé, MG (22° 18' 51 "S, 45° 23' 24" W, com uma altitude média de 1.276 m) (SILVA *et al.* 2016).

### 1° Experimento: Descrição e eventos florais

Para a determinação da antese, foram feitas observações qualitativas, diárias de abertura de 50 botões florais de 10 indivíduos, aleatoriamente, escolhidos e marcados no período das 7 as 18

horas durante 20 dias (BRITO *et al.* 2010). Onde observou-se: Principal horário de abertura floral, Sincronicidade floral (dentro de uma inflorescência e entre diferentes inflorescências), Início da antese e longevidade floral.

## 2° Experimento: Conservação dos grãos de pólen

Para a realização desse experimento, foram selecionadas 15 plantas da cultivar Arbequina. Os botões florais foram colhidos em estágio “balão”, em pré-antese, aleatoriamente, entre essas plantas, no período da manhã.

No laboratório, as anteras foram separadas com auxílio de uma pinça, sendo colocadas quatro anteras por eppendorfs, totalizando 90 eppendorfs, por ambiente. Posteriormente, os tubos foram colocados em dessecador, com sílica gel e mantidos a uma temperatura de 28 °C, por 24 horas, para que ocorresse a antese e para que os grãos de pólen tivessem seu teor de umidade reduzido (CUCHIARA *et al.* 2012).

Em seguida, foi realizado um teste para se determinar a viabilidade inicial dos grãos de pólen, utilizando meio de cultura específico para germinação de pólen de oliveira. Posteriormente os eppendorfs foram distribuídos entre os tratamentos (90 epperddorfs por tratamento).

Os tratamentos utilizados consistiram em manter os grãos de pólen armazenados em três condições diferentes, para posterior teste de viabilidade: temperatura ambiente (27 °C), geladeira (8 °C) e freezer (-10 °C). Passados 24 horas foi realizada nova avaliação, seguida por sete avaliações quinzenais. Em cada período de avaliação foram testados dez eppendorfs por tratamento (repetições).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 3 (dias de armazenamento x ambientes) e dez repetições.

Para se determinar a viabilidade dos grãos de pólen foi utilizado o método de germinação *in vitro*, utilizando meio de cultura específico para germinação de grãos de pólen de oliveira. O meio de cultura foi constituído por 4 g L<sup>-1</sup> de ágar, acrescido de 90 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 400 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico e pH ajustado para 5,79, na ausência de nitrato de cálcio e sulfato de magnésio, mantidos por 60 horas a 28 °C (SILVA *et al.* 2016).

Para cada etapa os grãos de pólen foram transferidos, com o auxílio de um pincel, na superfície da placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura. Posteriormente, as placas de Petri foram mantidas em BOD na ausência de luz a 28 °C por 60 horas, sendo contados os grãos de pólen germinados e não germinados com auxílio de um microscópio com objetiva de 10x (SILVA *et al.* 2016).

Foi considerado germinado o grão de pólen cujo comprimento do tubo polínico excedeu o dobro do próprio diâmetro (FIGUEIREDO *et al.* 2013). Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição constituído por um eppendorfs e cinco campos de visão por placa de Petri.

### 3° Experimento: Receptividade do estigma

A receptividade estigmática foi testada utilizando o método de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%. Esse método consiste na deposição de peróxido de hidrogênio a 3% no estigma das flores, nesse caso, os estigmas que apresentaram formação de bolhas foram considerados receptivos (KEARNS; INOUE, 1993).

Para este ensaio foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo as avaliações feitas de hora em hora do período das 7 as 18 horas, durante três dias, com 10 repetições, sendo avaliado a receptividade estigmática em três estágios de desenvolvimento floral: pré-antese, antese e pós-antese.

Para o experimento de caracterização de eventos florais, foi realizada uma descrição dos hábitos florais das plantas e comparado com os disponíveis na literatura. Todos os resultados foram registrados por meio de fotografia.

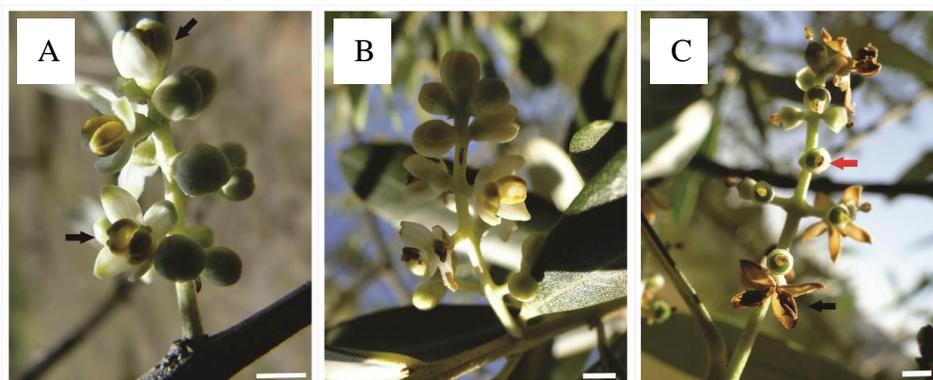
Para os experimentos de viabilidade polínica e receptividade estigmática os dados foram submetidos a uma análise de variância, sendo o experimento de viabilidade polínica submetido à regressão linear ou quadrática, em nível de 5% de probabilidade. E o experimento de receptividade estigmática submetido a um teste de agrupamento de médias, Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas no software estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a avaliação dos eventos florais, constatou-se que todos os botões florais das inflorescências não apresentam abertura concomitante, sendo assim, observam-se flores em diferentes estágios na mesma inflorescência (Figuras 1A e 1B).

**Figura 1** - Inflorescências de oliveira (*Olea europaea* L.), cultivar Arbequina. (A) Início da floração evidenciando flores em pré-antese, com diferentes tamanhos e flores no início da antese

- detalhe das anteras não deiscente (setas). (B) Inflorescência contendo flores em pré-antese, antese e pós-antese na mesma inflorescência. (C) Pós-antese de todas as flores de uma inflorescência - detalhe para a senescência da corola (seta preta), flores sem corola, com estigma apresentando uma coloração amarelo intenso (seta vermelha). Barra: 5mm. UFLA, Lavras, 2016.



Essa informação vai contra a estratégia de várias espécies de frutíferas de regiões temperadas, onde as plantas entram em dormência no outono e inverno, e apresentam um florescimento rápido e simultâneo durante a primavera, garantindo rápida polinização, fecundação, o que acarreta em homogeneidade no desenvolvimento do fruto (GUO *et al.* 2014).

Porém, essa característica de desuniformidade na florada da oliveira é intrínseca da espécie, conforme outros registros fenológicos encontrados na literatura, (SANZ-CORTÉS *et al.* 2002, OLIVEIRA *et al.* 2012, SADOK *et al.* 2013). Esse fato provavelmente se deve a oliveira diminuir a atividade metabólica, porém não entrar em dormência completa, nas estações mais frias, o que afeta a sincronia durante a diferenciação das gemas florais na primavera. Além disso, oscilações térmicas, durante o período invernal, podem acarretar em descompensação fisiológica no acúmulo de horas frio dessas gemas, ocasionando também desuniformidade e diminuição na florada (GOU *et al.* 2014).

Também durante a avaliação observou-se que na pré antese, botão fechado, não ocorre a liberação do grão de pólen sobre o estigma (Figura 1A).

A abertura das flores ocorre com maior frequência entre 10 e 11 horas, porém, as anteras não se encontram deiscentes, seu dessecamento e liberação do grão de pólen ocorre gradativamente ao longo de dois ou mais dias, não apresentando um padrão linear (Figura 1A). Essa característica é mais acentuada em plantas com polinização anemófila, onde a temperatura e umidade relativa do ar influenciam diretamente o dessecamento da antera e liberação do grão de pólen (MARTIN *et al.* 2010).

Com relação a longevidade floral (período entre antese e a senescência da corola) na cv. Arbequina foi de aproximadamente uma semana (Figura 1C). Essas informações também corroboram com Suárez *et al.* (2012), que trabalhando com alterações morfológicas, histoquímicas de pistilo de oliveiras constatou durante sua avaliação fenológica que entre o início da antese até sua senescência pode-se transcorrer mais de uma semana.

Com relação ao experimento de conservação do grão de pólen, verifica-se através do teste de Scott-Knott, Tabela 1, que o pólen armazenado no ambiente diminui drasticamente a sua viabilidade, após o segundo dia de armazenamento, próximo a 5%, sendo que 30 dias depois o material não respondeu mais ao teste de germinação em meio de cultura.

**Tabela 1.** Viabilidade de grãos pólen armazenados durante 105 dias em diferentes locais de armazenamento (temperatura ambiente com 27 °C, geladeira com temperatura de 8 °C e freezer com temperatura de -10 °C. UFLA, Lavras, 2016.

Tempo de armazenamento (dias)	Local de Armazenamento		
	Ambiente	Geladeira	Freezer
1	71,63 aA	71,63 aA	71,63 aA
2	5,28 bB	71,63 aA	70,26 aA
15	0,38 cB	55,68 bA	56,91 bA
30	0 cC	16,21 cB	52,09 cA
45	0 cC	9,95 dB	44,10 dA
60	0 cC	6,53 eB	29,91 eA
75	0 cB	0 fB	12,88 fA
90	0 cA	0 fA	2,34 gA
105	0 cA	0 fA	0 gA
Média		24,04	
CV (%)		7,21	

Médias seguidas pelas mesmas letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para vários estudos realizados com frutíferas 30% de germinação é considerada uma porcentagem aceitável para se garantir boa fecundação e frutificação (ALBUQUERQUE JR. 2010, SILVA *et al.* 2016). Sendo que a porcentagem de germinação em torno 5% pode ser considerada muito baixa para utilização desse material em trabalhos de hibridização em oliveiras.

Com relação aos outros tratamentos, o armazenamento em geladeira, à temperatura de 8 °C, os grãos de pólen, com quinze dias, apresentaram viabilidade em torno de (56%), sendo que após esse período houve diminuição drástica da germinação polínica e 75 dias depois o material apresentava-se inviável (Tabela 1).

O método de armazenamento em freezer a -10°C apresentou resultado superior aos outros tratamentos, sendo que conservou durante mais tempo a viabilidade do material (Tabela 1). Aos

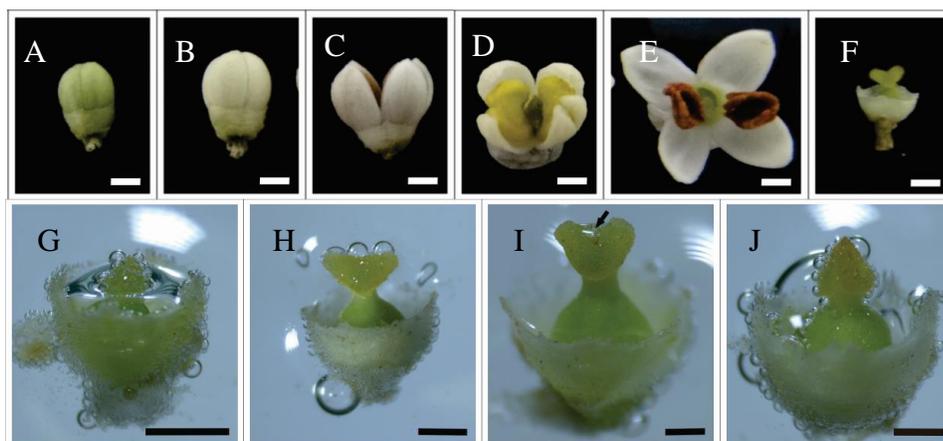
60 dias de armazenamento os grãos de pólen ainda apresentavam uma porcentagem de germinação em torno de 30%, ou seja, um parâmetro aceitável para a utilização segundo consta na literatura (HAUAGGE; BRUCKNER, 2002; ALBUQUERQUE JR., 2010). Quinze dias após esse período o material ainda apresentava baixa taxa de germinação, quando submetido ao teste no meio de cultura, somente perdendo completamente a viabilidade no 105 dia após implantação do experimento.

No que diz respeito a viabilidade do material, é possível observar que os grãos de pólen armazenado a 27 °C, temperatura ambiente, perdeu a viabilidade rapidamente. Esse fato pode estar relacionado com a alta temperatura do ambiente, que mantém ou acelera a atividade metabólica do material, inviabilizando-o rapidamente. O armazenamento em temperatura ambiente também torna o material mais susceptível a absorção de umidade do ar, o que acelera o metabolismo, além de tornar os grãos de pólen mais aptos ao ataque de fungos e microorganismos (KOUBOURIS *et al.* 2009).

Como também podem ser observados os tratamentos com temperaturas mais baixas apresentaram maior durabilidade. A utilização de baixas temperaturas está relacionado com a redução do metabolismo dos grãos de pólen, o que propicia maior longevidade do material (CUCHIARA *et al.* 2012).

Com relação a avaliação de receptividade do estigma, constatou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, os estigmas de todos os estágios de desenvolvimento e em todos os horários, apresentam formação de bolhas na cavidade estigmática quando submetidos ao teste de peróxido de hidrogênio a 3%, indicando atividade da enzima peroxidase, (Figura 2).

**Figura 2** - Desenvolvimento floral da oliveira, cultivar Arbequina e receptividade do estigma, em diferentes fases desse desenvolvimento, pelo método de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3%. (A e B) Flores em pré-antese. (C e D) Flores em antese. (E e F) Flores em pós-antese. (G) Botão floral extremamente verde, pré-antese, evidenciando estigma receptivo. (H) Estigma de botão floral, completamente desenvolvido, pré-antese e receptivo. (I) Flor em antese, detalhe para cavidade estigmática receptiva (seta). (J) Flor em pós-antese com estigma receptivo. Barra: 1mm. UFLA, Lavras, 2016.



Estes resultados são de grande valia para experimentos de melhoramento. Como as flores em pré-antese encontram-se receptivas, a hibridização controlada pode ser realizada sem que ocorra contaminação de grãos de pólen que não sejam a do material selecionado (Figuras 2A, 2B, 2G e 2H).

Entretanto recomenda-se ao melhorista a escolha de botões florais, desenvolvidos e o mais próximo possível da antese (Figuras 2B e 2H), Pois, apesar do estigma de oliveira estar receptivo é somente próximo a antese, da flor, que o tecido de transmissão do estilete vai

começar a quebra do amido e conseqüentemente ofertar nutrientes para desenvolvimento do tubo polínico (SUÀREZ *et al.* 2012).

Com relação ao tempo de receptividade do estigma, é assumido ser um caráter hereditário, porem sujeito a plasticidade fenotípica (STEINACHER; WAGNER, 2010). Basicamente o tempo de uma flor aberta e a duração da receptividade do gineceu, esta diretamente relacionada com a oferta de grão de pólen no ambiente (LANKINEN *et al.* 2006). Ou seja, alta oferta de grão de pólen, menor tempo de receptividade estigmática, menor oferta de pólen, maior o tempo da receptividade do mesmo.

Além disso, vários estudos, com diferentes espécies, tem demonstrado que a longevidade floral, aumenta com a altitude (ARROYO *et al.* 1981; BINGHAM; ORTHNER, 1998; BLIONIS; VOKOU, 2002), sendo esse fator em decorrência das taxas de polinização, que aparentemente são menores, ou devido as temperaturas mais baixas que acarretam em diminuição de atividade metabólica atrasando antese (STEINACHER; WAGNER, 2010), o que também é uma possível explicação para o período de receptividade desse experimento.

## CONCLUSÕES

1. A cultivar Arbequina exhibe geralmente antese diurna, assíncrona e com abertura floral entre 10 e 11 horas;
2. As anteras armazenadas em freezer preservam a viabilidade por até 60 dias;
3. Os estigmas apresentam-se receptivos desde a pré-antese, com frequência de receptividade prevalecente ao longo de todo o dia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo apoio financeiro na execução desse trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. L. J.; DENARDI, F.; DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.

ARROYO, M. T. K.; ARMESTO, J. J.; VILLAGRAN, C. Plant phenological patterns in the High Andean Cordillera of central Chile. **Journal of Ecology**, v. 69, n. 1, p. 205-223. 1981.

BINGHAM, R. A.; ORTHNER, A. R.; Efficient pollination of alpine plants. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 238-239, 1998.

BLIONIS, G. J.; VOKOU, D. Structural and functional divergence of *Campanula spatula* subspecies on Mt Olympos (Greece). **Plant Systematics and Evolution**, v. 232, n. 1, p. 89-105. 2002.

BRITO, A. C.; SOUZA, J. D.; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Propriedade do pólen e do stigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n. 2, p. 208-214, 2010.

CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneiro a baixas temperaturas. **Ceres**, v. 59, n. 1, p. 82-87, 2012.

EINHARDT P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade do pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M. A.; PIO, R.; SILVA, T. C.; SILVA, K. N.; Características florais e carpométricas e germinação in vitro de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 731-740, 2013.

GUO, L.; DAI, J.; RANJITKAR, S.; YU, H.; XU, J.; LUEDELING, E. Chilling and requirements for flowering in temperate fruit trees. **International Journal of Biometeorology**, v. 58, n. 6, p. 1195-1206, 2014.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras de clima temperado**. Viçosa: UFV, 2002. 88p.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University Press of Colorado, 1993. 579p.

KOUBOURIS, G. C.; METZIDAKIS, I. T.; VASILAKAKIS, M. D.; Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 209-214. 2009.

LANKINEN, A.; HELLRIEGEL, B.; BERNASCONI, G. Sexual conflict over floral receptivity. **Evolution**, v. 60, n. 12, p. 2454-2465, 2006.

MARTIN, M. D.; CHAMECKI, M.; BRUSH, G. Anthesis synchronization and floral morphology determine diurnal patterns of ragweed pollen dispersal. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 150, n. 9, p. 1307-1317, 2010.

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

SADOK, I. B.; CELTON, J. M.; ESSALOUH, L.; AABIDINE, A. Z.; GARCIA, G.; MARTINEZ, S.; GRATI-KAMOUN, N.; REBAI, A.; COSTES, E.; KHADARI, B.; QTL Mapping of flowering and fruting traits in olive. **Plos one**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2013.

SANZ-CORTÉS, F.; MARTÍNEZ-CALVO, J.; BADENES, M. L.; BLEIHOLDER, H.; HACK, H.; LLÁCER, G.; MEIER, U. Phenological growth stages of olive tress (*Olea europaea*). **Annals of Applied Biology**, v. 140, n. 2, p. 151-157, 2002.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-Incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p. 202-209, 2012a.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ZAMBON, C. R. Caracterização agronômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012b.

SILVA, L. F. O.; ZAMBON, C. R.; PIO, R.; OLIVEIRA, A. F.; GONÇALVES, E. D. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 26-32, 2016.

STEINACHER, G.; WAGNER, J.; Flower longevity and of pistil receptivity in high mountain plants. **Flora**, v. 205, n. 6, p. 376-387, 2010.

SUÀREZ, C.; CASTRO, A. J.; RAPOPORT, H. F. Morphological, histological and ultrastructural changes in the olive pistil during flowering. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 133-146. 2012.

1 Artigo 2 - Preparado de acordo com a Revista Genetics and Molecular Research

2  
3 **ANORMALIDADES INDUZIDAS POR DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NA**  
4 **MICROSPOROGÊNESE DE DUAS CULTIVARES DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

5  
6 C.R. Zambon<sup>1</sup>, V.H. Techio<sup>1</sup>, L.F.O Silva<sup>2</sup>, A.F. Oliveira<sup>2</sup> R. Pio<sup>1</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil

9 <sup>2</sup>Campo Experimental de Maria da Fé, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais,  
10 Maria da Fé, Brasil.

11  
12 Corresponding author: C.R. Zambon

13 E-mail: carol-rzambon@hotmail.com

14  
15 **RESUMO.** O Objetivo desse trabalho foi avaliar a microsporogênese de duas cultivares de  
16 oliveiras submetidas a aplicação de diferentes defensivos agrícolas, na florada, e avaliar os  
17 impactos sobre a microsporogênese e a viabilidade polínica. Inicialmente inflorescências de duas  
18 cultivares de oliveira, Arbequina e MGS GRAP541, foram submetidas a aplicação de cinco  
19 defensivos agrícolas: óleo mineral, óleo de neem, dimetoato, deltametrina e tratamento controle  
20 (água), sendo as flores fixadas em Carnoy. As lâminas foram preparadas pela técnica de  
21 esmagamento e coloração por carmim propiônico 0,5%. Posteriormente, foram quantificadas as  
22 células em estágio normal e com anormalidades. Durante esse experimento foram também  
23 testados a viabilidade do pólen pelo método de coloração de Alexander e através de germinação  
24 *in vitro*, com pólen fresco, em meio de cultura para pólen de oliveira, sendo os resultados, dos  
25 dois métodos de viabilidade, analisados individualmente e em conjunto avaliando sua correlação.  
26 Como resultado, a quantificação de anormalidades na meiose, nas duas cultivares, houve efeito  
27 significativo entre os tratamentos, sendo que todos diferiram estatisticamente do grupo controle,  
28 que apresentou a menor porcentagem de anormalidades cromossômicas. Nos testes de viabilidade  
29 polínica, ambos os métodos, para as duas cultivares, apresentaram maior porcentagem de pólen  
30 viáveis no tratamento testemunha e menor porcentagem de viabilidade polínica na presença dos  
31 defensivos agrícolas. O método de viabilidade polínica por coloração, apresentou as maiores  
32 médias de pólen viáveis, porém, os dois métodos, quando comparados conjuntamente,  
33 apresentaram uma correlação linear positiva fortemente relacionada, indicando que ambos  
34 apresentam o mesmo padrão de comportamento ao longo dos tratamentos. Conclui-se que os  
35 produtos químicos utilizados aumentaram a porcentagem de anormalidades cromossômicas,  
36 durante a microsporogênese, que interferiu na viabilidade polínica das duas cultivares analisadas.  
37 O produto deltametrina foi o que provocou maior efeito sobre a meiose e a viabilidade de pólen,  
38 nesse experimento.

39  
40 **Key words:** *Olea europaea* L.; Viabilidade polínica; anormalidades meióticas

41  
42  
43  
44

45 **ABNORMALITIES INDUCED BY AGRICULTURAL DEFESNIVES IN**  
46 **MICROSPOROGENESIS OF TWO OLIVE CULTIVARS (*Olea europaea* L.)**  
47  
48

49 **ABSTRACT.** The objective of that work was evaluating the microsporogenesis of two cultivars  
50 of olive trees submitted to the application of different agricultural defensives, at blooming and  
51 evaluating the impacts on both microsporogenesis and pollen viability. Initially, inflorescences of  
52 two olive cultivars, Arbequina and MGS GRAP541, were submitted to the application of five  
53 agricultural defensives: mineral oil, neem oil, dimethoate, deltamethrin and control treatment  
54 (water), the flowers being fixed in Carnoy. The slides were prepared by the technique of squash  
55 and 0.5% propionic carmine staining. Afterwards, the cells at normal stage and with  
56 abnormalities were quantified. During that experiment, the pollen viability was also tested by the  
57 Alexander staining method and through *in vitro* germination with fresh pollen in culture medium  
58 for olive pollen, the results of the two viability methods, analyzed both singly and jointly,  
59 evaluating their correlation. As a result, the quantification of abnormalities at meiosis, in the two  
60 cultivars, there was a significant effect among the treatments, since all differed statistically from  
61 the control group, which presented the lowest percentage of chromosome abnormalities. In the  
62 pollen viability tests, both the methods, for the two cultivars, presented greater percentage of  
63 viable pollen in the control treatment and lowest percentage of pollen viability in the presence of  
64 the agricultural defensives. The method of pollen viability by staining presented the highest  
65 means of viable pollen, but, the two methods, when compared jointly, presented a strongly  
66 related positive linear correlation, indicating that both showed the same behavior pattern along  
67 the treatments. It follows that the chemicals utilized increased the chromosomic abnormality  
68 percentage during microsporogenesis, which interfered on the pollen viability of the two cultivars  
69 investigated. The product deltamethrine was the one which caused the greatest effect on the  
70 meiosis and pollen viability in that experiment.

71  
72 **Key words:** *Olea europaea* L.; Pollen viability; meiotic abnormalities  
73  
74

75 **INTRODUÇÃO**  
76  
77

78 As oliveiras são exploradas agronomicamente para a produção de azeitonas destinadas a  
79 produção de conservas ou extração insdutrial de azeites. Os plantios atualmente tem avançado  
80 para regiões não tradicionais, principalmente nos trópicos.

81 Apesar das oliveiras serem originárias de regiões de clima temperado, suas folhas não são  
82 caducifólias, persistindo ao longo do ciclo produtivo, inclusive nas estações mais frias, onde  
83 existe diminuição da atividade metabólica dessa planta. Como nos trópicos as temperaturas são  
84 mais elevadas, durante o dia, e apresentam alta amplitude térmica, com o aumento da umidade  
85 foliar no período noturno, há necessidadede se utilizar defensivos agrícolas para controlar as  
86 enfermidades, inclusive no período de floração das oliveiras.

87 Além disso, o cultivo nos trópicos acarretam baixa fixação de azeitonas pós-florada, o que  
88 tem proporcionado produção de azeitonas ainda incipiente.

89 Aspectos relacionados a microsporogênese e fatores externos que podem influenciar esse  
 90 ciclo, como a aplicação de defensivos agrícolas na época da florada, são pouco explorados, sendo  
 91 que esses fatores, em última análise, possuem um impacto direto na viabilidade polínica e na  
 92 produção. Portanto, investigar irregularidades na microsporogênese devido a causas externas, é  
 93 fundamental para se avaliar o potencial produtivo de uma cultivar.

94 Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a microsporogênese de duas cultivares de  
 95 oliveiras submetidas a aplicação de diferentes defensivos agrícolas, durante a florada, e avaliar os  
 96 impactos sobre o comportamento meiótico e a viabilidade polínica.

## 98 MATERIAL E MÉTODOS

### 100 Material Vegetal

101  
 102 Para esse experimento foram utilizadas duas cultivares de oliveira: Arbequina, de origem  
 103 espanhola destinada principalmente à produção de azeite (Naveiro et al., 2000) e a MGS  
 104 GRAP541 cultivar desenvolvida e registrada a partir de trabalhos de melhoramento da EPAMIG  
 105 (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), sendo destinada tanto para produção de  
 106 azeite, como para produção de azeitona de mesa (Oliveira et al., 2012).

### 108 Experimento de Campo

109  
 110 O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Epamig, no município de Maria  
 111 da Fé, sul de Minas Gerais, Brasil.

112 O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 2 x  
 113 5, sendo duas cultivares: Arbequina e MGS GRAP541 e cinco defensivos agrícolas: óleo mineral  
 114 (5 L / 100 L de água), óleo de neem (1L / 100 L de água), dimetoato (50 mL / 100 L de água),  
 115 deltametrina (50 mL / 100L de água) e tratamento controle (água) e quatro blocos, sendo  
 116 marcado cinco ramos floríferos por planta, totalizando assim 20 unidades experimentais por  
 117 tratamento (Tabela 1).

118 As concentrações dos defensivos agrícolas utilizados foram estabelecidas a partir dos  
 119 rótulos dos produtos, de acordo com especificações dos fabricantes. Quando o produto não era  
 120 utilizado para a cultura da oliveira, no Brasil, foi utilizada dosagem recomendada, no rótulo, para  
 121 a cultura do citros, conforme vem sendo comumente utilizado pelos produtores.

122 Após a marcação dos ramos floríferos, os tratamentos foram aplicados (Tabela 1). Foi  
 123 realizada uma única aplicação local, de cada defensivo agrícola, no período da manhã, utilizando  
 124 cinco borrifadores devidamente identificados, sendo realizada de forma a atingir toda a superfície  
 125 da inflorescência. Para o tratamento controle foi pulverizado água destilada, com o objetivo de  
 126 igualar o manejo de pulverização com os demais tratamentos. A coleta e fixação das  
 127 inflorescências foram realizadas 10 dias após aplicação.

128  
 129 **Tabela 1.** Produtos aplicados nas inflorescências de duas cultivares de oliveiras.

<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Classe</b>	<b>Classe Toxicológica</b>
Azadirachta Indica	Tetranortriterpenóide	Inseticida	Classe III

(Óleo de neem)			
Deltamitrina	Piretróide	Inseticida	Classe I
Dimetoato	Organofosforado	Inseticida	Classe I
Óleo Mineral	Hidrocarboneto Alifático	Inseticida/Acaricida	Classe IV

130 Fonte: ANVISA, 2016; MAPA - Agrofit, 2016.

131

132

### 133 **Análise qualitativa em Microscopia eletrônica de varredura**

134

135 Botões florais, completamente desenvolvidos, da cultivar Arbequina, foram coletados em  
136 todos os tratamentos.

137 Os botões florais foram fixados, em Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%,  
138 formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl<sub>2</sub> 0,001M) e transferidos,  
139 no mínimo, cinco anteras de cada tratamento, para uma solução-tampão de cacodilato (0,05M)  
140 sendo lavados por três vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, esses botões, foram  
141 pósfixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% em água por 1 hora, lavados em água  
142 destilada, por três vezes, e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona  
143 (30%, 50%, 70%, 90% e 100%).

144 Posteriormente, as anteras foram levadas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em  
145 aparelho Balzers CPD 030<sup>®</sup> e em seguida, montados, em suportes de alumínio (stubs) e cobertos  
146 com ouro (evaporador Balzers SCD 050<sup>®</sup>) para observação em microscópio eletrônico de  
147 varredura LEO EVO 40<sup>®</sup>.

148

### 149 **Análises Meióticas**

150

151 Para observações na microsporogênese, botões florais, de todos os tratamentos, em  
152 diferentes estágios foram fixados em Carnoy (Etanol: ácido acético, 3:1), sendo renovado por três  
153 vezes num intervalo de 48 horas e posteriormente refrigerados e armazenados a uma temperatura  
154 -4 °C, no próprio fixador, até o preparo das lâminas.

155 Para o preparo das lâminas foi usado protocolo convencional para estudo meiótico pela  
156 técnica de esmagamento e coloração por carmin propiônico a 0,5% (Guerra and Souza, 2002).

157 Nesse experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em  
158 esquema fatorial 2 (cultivares) x 5 (produtos químicos), sendo 3 repetições e 10 lâminas por  
159 repetição.

160

### 161 **Viabilidade do Pólen**

162

163 A viabilidade dos grãos de pólen foi determinada por meio de coloração (VPC) e por  
164 Germinação (VPG).

165

### 166 **Viabilidade Polínica por Coloração (VPC)**

167

168 Para o Método de Viabilidade Polínica por Coloração (VPC), anteras completamente  
169 formadas foram fixadas em Carnoy (3:1), e posteriormente preparadas pela técnica de  
170 esmagamento e coloração com corante de Alexander (Alexander, 1980). Para as análises, foram  
171 considerados viáveis os grãos de pólen em que todo o protoplasma apresentou coloração roxa e  
172 inviáveis aqueles corados de verde.

173 Esse experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema  
174 fatorial 2 (cultivares) x 5 (defensivos agrícolas), com 4 repetições, sendo cada repetição  
175 constituída por uma lâmina, com conteúdo de três anteras, onde foram avaliados 200 grãos de  
176 pólen por repetição.

### 177 ***Viabilidade Polínica por Germinação (VPG)***

178 Para determinar a viabilidade polínica por germinação (VPG) utilizou-se meio de cultura  
179 específica para germinação de grãos de pólen de oliveira, constituído por 4 gL<sup>-1</sup> de ágar,  
180 acrescido de 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 400 mgL<sup>-1</sup> de ácido bórico e pH ajustado para 5,79, na ausência  
181 de nitrato de cálcio e sulfato de magnésio, mantidos por 60 horas a 28 °C (Silva et al., 2016).

182 Os grãos de pólen frescos foram transferidos, com o auxílio de um pincel, para a  
183 superfície da placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura. Posteriormente, as placas de  
184 Petri foram mantidas em BOD na ausência de luz a 28 °C por 60 horas, sendo contados os grãos  
185 de pólen germinados e não germinados com auxílio de um microscópio com objetiva de 10x  
186 (Silva et al., 2016).

187 Os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico excedeu o dobro do próprio  
188 diâmetro foram considerados germinados (Figueiredo et al., 2013). Este experimento foi  
189 conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (cultivares) x 5  
190 (defensivos agrícola), com quatro repetições, sendo cada repetição constituído por uma placa de  
191 petri onde foram contabilizados 200 grãos de pólen.

### 192 **Microscopia e processamento de imagens**

193 As análises foram realizadas em microscópio de luz (Zeiss, modelo Axio Labe as imagens  
194 capturas por uma câmera (AxioCam ERc5s).

195 As imagens de microscopia eletrônica foram geradas e registradas digitalmente em  
196 microscópio eletrônico de varredura LEO EVO<sup>®</sup> 40 (Carl Zeiss).

197 Todas as imagens foram processadas usando Software Photopaint do pacote Corel Draw<sup>®</sup>.

### 198 **Análise dos Resultados**

199 Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas  
200 pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas no  
201 software estatístico Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2011).

202 Para determinar a relação entre os métodos de Viabilidade Polínica por Coloração (VPC)  
203 e a Viabilidade Polínica por Germinação (VPG) do pólen foi realizado o teste de correlação de  
204 Pearson utilizando MINITAB 17<sup>®</sup> programa estatístico ( $P \leq 0,05$ ).

212 **RESULTADOS**

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

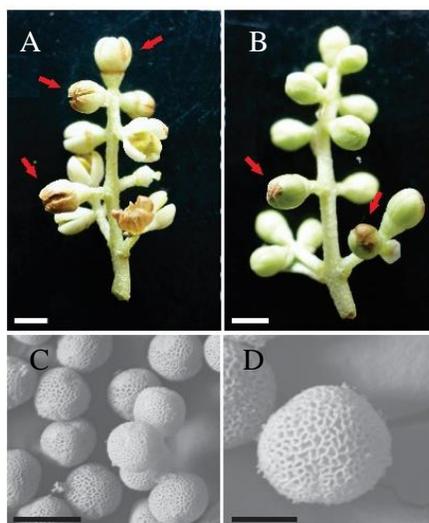
226

227

228

Durante a fase de aplicação dos defensivos agrícolas, no campo, o óleo mineral e óleo de neem causaram necrose nas pétalas de algumas flores, um dia após a pulverização, sendo que as flores danificadas permaneceram nas inflorescências até o dia da coleta (Figuras 1A e 1B). Contudo, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que não houve dano na ultraestrutura dos grãos de pólen nas condições dos tratamentos avaliados (Figuras 1C e 1D).

**Figura 1.** Inflorescências e grãos de pólen da cultivar Arbequina de *Olea europaea* L. A. Inflorescência submetida a aplicação de óleo mineral, detalhe para as pétalas necrosadas (Setas). Bar = 3 mm. B. Inflorescência submetida a aplicação de Óleo de Neem, detalhe para as pétalas necrosadas (Setas). Bar = 3 mm. C. e D. Fotomicrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos grãos de pólen de *Olea europaea* submetido a aplicação de Deltamitrina. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . Bar = 10  $\mu\text{m}$ .



229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

Com relação a ultraestrutura os grãos de pólen, possuem aberturas alongadas, com os colpos localizados na região polar, caracterizando-os como tricolpado. O tipo de ornamentação é reticulada, com columelas espessas e irregulares (Figura 1D).

Para análise meiótica da cultivar Arbequina, a média de anormalidades entre os tratamentos, com os defensivos agrícolas, variou de 13,36% com óleo mineral para 21,58% com deltametrina. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os quatro tratamentos (Tabela 2).

242 **Tabela 2.** Porcentagem de Anormalidades meióticas na microsporogênese da cultivar Arbequina  
 243 de *Olea europaea* L. submetida a aplicação de diferentes defensivos agrícolas.

Arbequina	Médias (%)
Testemunha	4,53 a
Óleo mineral	13,36 b
Óleo de neem	18,55 b
Dimetoato	18,64 b
Deltametrina	21,58 b
CV	20,04
Média	15,33

244 Médias seguidas na mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de  
 245 probabilidade.

246

247 Para a cultivar MGSGRAP 541 verifica-se que o tratamento com óleo mineral apresentou  
 248 uma menor porcentagem de anormalidades, em relação aos outros três tratamentos com  
 249 defensivos agrícolas e todos esses tratamentos diferiram estatisticamente do grupo testemunha  
 250 para a taxa média de anormalidades (Tabela 3). A média de anormalidades, entre os tratamentos,  
 251 com os defensivos agrícolas variou de 12,83% com óleo mineral para 22,91% com deltametrina.  
 252 (Tabela 3).

253

254 **Tabela 3.** Porcentagem de Anormalidade meióticas na microsporogênese da cultivar MGSGRAP  
 255 541 submetida a aplicação de diferentes defensivos agrícolas.

MGSGRAP 541	Médias (%)
Testemunha	4,07 a
Óleo mineral	12,83 b
Óleo de neem	19,82 c
Dimetoato	18,77 c
Deltametrina	22,91 c
CV	11,55
Média	15,68

256 Médias seguidas na mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de  
 257 probabilidade

258

259 Para ambas as cultivares, há uma baixa porcentagem de anormalidades na meiose I, as  
 260 quais foram observadas somente na anáfase I (Tabela 4, Figura 2A).

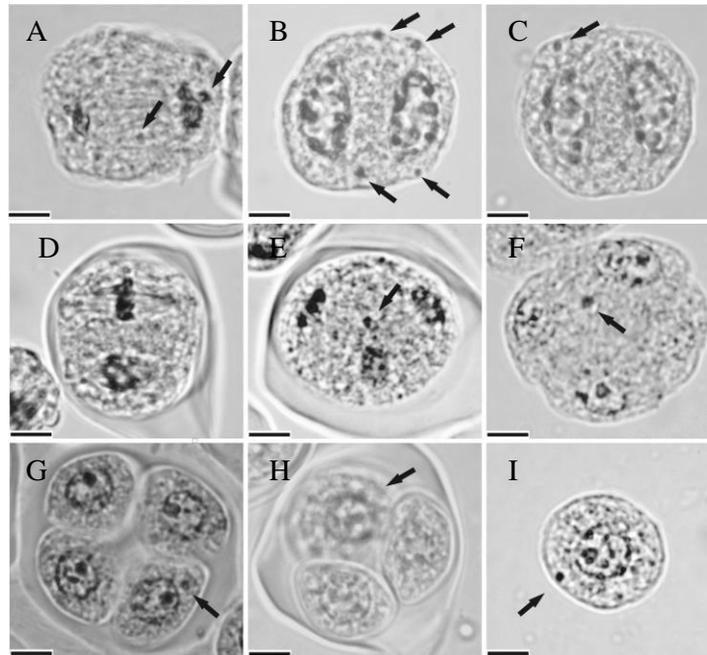
261 Na prófase II, também para as duas cultivares, foram observados  
 262 cromossomos/cromátides perdidas e vários micronúcleos (Tabela 4 e Figura 2 B,C). Na anáfase  
 263 II, também observou-se a presença de cromossomos/cromátides perdidos, mas somente sob efeito  
 264 dos fitossanitários dimetoato e deltametrina nas duas cultivares (Tabela 4 e Figura 2E) . Os  
 265 cromossomos/cromátides atrasadas foram observados nas fases subsequentes da meiose sob a  
 266 forma de micronúcleos (MN) nas telófases, tétrades e micrósporos (Tabela 4 e Figura 2F,G,I).  
 267 Em menor frequência também foram observadas tríades, em ambas a cultivares (Tabela 4 e  
 268 Figura 2H). Essas porcentagens de anormalidades foram muito baixas no tratamento testemunha,

269 das cultivares avaliadas, e mais pronunciados nos tratamentos onde foi utilizado algum tipo de  
270 defensivos agrícolas (Tabela 4 e Figura 2).

271 **Tabela 4.** Número de células analisadas e porcentagem de anormalidades celulares de cada estágio da meiose de duas cultivares de  
 272 oliveira

Estágios	Arbequina					MGS GRAP541				
	Controle	Óleo Mineral	Neem	Deltametrina	Dimetoato	Controle	Óleo Mineral	Neem	Deltametrina	Dimetoato
<b>Metáfase I</b>	77	96	84	77	42	76	80	60	74	41
<b>Anormalidades %</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total de células</b>	77	96	84	77	42	76	80	60	74	41
<b>Anáfase I</b>	47	53	34	36	30	28	32	36	35	31
<b>Anormalidades %</b>	11,32	7,02	5,56	2,7	0	0	0	5,26	0	0
<b>Total de células</b>	53	57	36	37	30	28	32	38	35	31
<b>Telófase I</b>	200	136	96	90	106	106	132	94	90	58
<b>Anormalidades %</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total de células</b>	200	136	96	90	106	106	132	94	90	58
<b>Prófase II</b>	87	116	80	130	152	140	54	143	196	73
<b>Anormalidades %</b>	5,43	23,18	20	25,71	19,15	6,04	20,59	25,52	26,32	26,26
<b>Total de células</b>	92	151	100	175	188	149	68	192	266	99
<b>Metáfase II</b>	53	63	57	73	145	135	94	72	103	96
<b>Anormalidades %</b>	13,11	18,18	18,57	16,09	15,7	0,74	23,58	13,25	30,87	17,95
<b>Total de células</b>	61	77	70	87	172	136	123	83	149	117
<b>Anáfase II</b>	36	46	28	32	33	36	37	32	39	34
<b>Anormalidades %</b>	0	0	0	25,58	23,26	0	0	0	18,75	10,53
<b>Total de células</b>	36	46	28	43	43	36	37	32	48	38
<b>Telófase II</b>	205	162	117	103	275	160	215	139	156	236
<b>Anormalidades %</b>	5,53	17,77	25,95	30,87	17,91	6,43	14,00	24,46	29,41	23,13
<b>Total de células</b>	217	197	158	149	335	171	250	184	221	307
<b>Tétrade</b>	350	209	217	236	161	324	379	265	115	283
<b>Anormalidades %</b>	5,15	14,34	23,59	25,32	27,15	4,42	11,66	22,29	28,13	19,83
<b>Total de células</b>	369	244	284	316	221	339	429	341	160	353
<b>Micrósporo</b>	174	103	379	229	145	260	196	165	115	145
<b>Anormalidades %</b>	4,4	22,56	30,38	24	17	5,8	19,01	28,26	26,28	21,2
<b>Total de células</b>	182	133	476	302	202	276	242	230	156	184
<b>N° Total de Células</b>	1287	1137	1332	1276	1339	1317	1393	1254	1199	1228

273 **Figura 2.** Anormalidades nas diferentes fases da meiose de duas cultivares de *Olea europaea*. A.  
 274 Anáfase I, com cromossomos atrasados (Seta). B. C. Prófase II com micronúcleos (Setas). D.  
 275 Metáfase II assincrônica. E. Anáfase assincrônica, com fuso tripolar e cromossomos atrasados  
 276 (Setas). F. Telófase II com micronúcleos. G. Tétrade com micronúcleos. H. Tríade evidenciando  
 277 um dos micrósporos maior (Seta). I. Micrósporo com micronúcleo (Seta). Barra = 5 µm.  
 278



279  
 280 A análise estatística demonstrou diferenças significativas para a interação cultivar x  
 281 defensivo agrícola para a viabilidade polínica obtida por coloração (VPC) e por germinação  
 282 (VPG) (Tabela 5 e 6) (Figuras 3A, 3B e 3C).

283 Para os dados obtidos por VPC, a cultivar MGS GRAP541 foi a que apresentou a maior  
 284 porcentagem de pólenes viáveis. O melhor resultado foi obtido para o tratamento testemunha  
 285 (75,33%), seguido dos tratamentos com óleo de neem (36,65%) e óleo mineral (32,04%), não  
 286 havendo diferenças estatísticas entre eles. A menor porcentagem de viabilidade foi observada  
 287 para o tratamento com deltametrina (5,99%) (Tabela 5).

288 Com relação a cultivar Arbequina, excluindo o resultado da testemunha (58,73%), as  
 289 plantas com maior taxa de viabilidade polínica foram as que receberam os tratamentos com Óleo  
 290 Mineral (16,66%), óleo de neem (15,17%), dimetoato (12,94%) não diferindo estatisticamente  
 291 entre si. Assim como observado para a cv. MGS GRAP541, o tratamento com a aplicação de  
 292 deltametrina provocou maiores efeitos sobre a viabilidade do pólen, com taxa inferior a 5%  
 293 (Tabela 5).

294 A análise dentro de cada tratamento mostrou que há diferenças significativas para a VPC  
 295 entre as duas cultivares somente nos tratamentos dimetoato e deltametrina.

296  
 297

298 **Tabela 5.** Viabilidade polínica por método de coloração (VPC) de duas cultivares de *Olea*  
 299 *europaea* L..

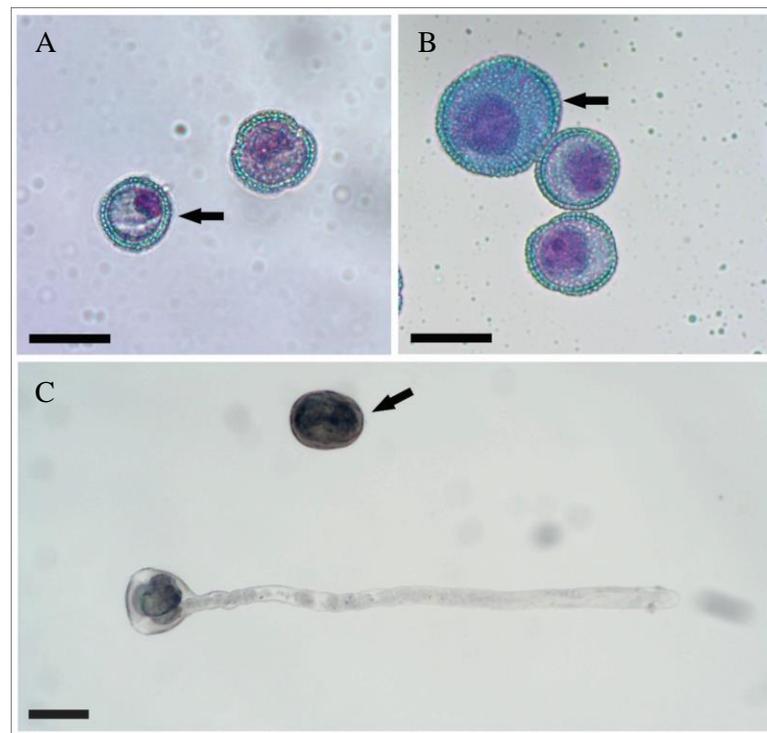
Cultivar	Tratamentos				
	Testemunha	Óleo mineral	Óleo de neem	Deltametrina	Dimetoato
Arbequina	58,73 bA	16,66 bB	15,17 bB	4,08 aC	12,94 aB
MGS GRAP541	75,33 aA	32,04 aB	36,65 aB	5,99 aD	15,94 aC
CV (%)	12,77				
Média	27,36				

300 Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre  
 301 sim pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

302  
 303

304 **Figura 3.** Viabilidade polínica de duas cultivares de oliveiras por diferentes metodologias. A.  
 305 Grãos de pólen submetidos a coloração de Alexander, pólen inviável (Seta), e pólen viável. Bar =  
 306 20 µm. B. Grãos de pólen viáveis, evidenciando grão de pólen com tamanho maior em relação  
 307 aos demais (Seta). Bar = 20 µm. C. Grãos de pólen submetidos ao teste de viabilidade polínica  
 308 por germinação, grão de pólen inviável (Seta) e viável com germinação do tubo polínico. Bar =  
 309 20 µm.

310



311

312

313

314

315

Para os dados obtidos por VPG, a cultivar MGS GRAP541, foi a que apresentou a maior  
 porcentagem de pólen germinados. O melhor resultado foi obtido para o tratamento testemunha (  
 61,34% ), seguidos dos tratamentos com óleo de neem (26,39%) e óleo mineral (24,84%), não

316 havendo diferenças estatísticas entre esses. A menor porcentagem de viabilidade foi observada  
317 para o tratamento com deltametrina (4,76%) (Tabela 6).

318 Para a cultivar Arbequina, excluindo o resultado da testemunha (58,73%), as plantas com  
319 maior taxa de viabilidade polínica foram as que receberam os tratamentos com óleo mineral  
320 (13,92%), óleo de neem (12,47%), dimetoato (11,97%) não diferindo estatisticamente entre si.  
321 Assim como observado para a cv. MGS GRAP541, o tratamento com a aplicação de deltametrina  
322 provocou maiores efeitos sobre a viabilidade do pólen, com taxa inferior a 5% (Tabela 6).

323 Assim como para VPC, a análise dentro de cada tratamento mostrou que há diferenças  
324 significativas para a VPG entre as duas cultivares somente nos tratamentos dimetoato e  
325 deltametrina.

326

327 **Tabela 6.** Viabilidade polínica por método de germinação (VPG) de duas cultivares de *Olea*  
328 *europaea* L..

Cultivar	Tratamentos				
	Testemunha	Óleo mineral	Óleo de neem	Deltametrina	Dimetoato
Arbequina	46,05 bA	13,92 bB	12,47 bB	3,60 aC	11,97 aB
MGS GRAP541	61,34 aA	24,84 aB	26,39 aB	4,76 aD	11,97 aC
CV (%)	13,48				
Média	21,73				

329 Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre  
330 sim pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

331

332 O teste de correlação de Pearson mostrou uma correlação linear positiva fortemente  
333 relacionada, entre as metodologias, para ambas as cultivares, sendo MGS GRAP541 ( $r^2 = 0,9804$ )  
334 e Arbequina ( $r^2 = 0,9704$ ).

335

## 336 DISCUSSÃO

337

338 Durante a análise meiótica observa-se uma baixa porcentagem de anormalidades no  
339 tratamento testemunha, para ambas as cultivares, o que sugere que sem a intervenção de  
340 agroquímicos existe estabilidade na meiose.

341 A partir do momento que se utiliza algum tipo de produto fitossanitário, se verifica um  
342 aumento na porcentagem de anormalidades na microsporogênese, mas que no caso dos  
343 tratamentos com óleo mineral, óleo de neem e, em parte, também com o dimetoato, não chegam  
344 a comprometer totalmente a viabilidade de pólen. Ao contrário da deltametrina que, além do  
345 efeito sobre o comportamento meiótico, provocou maiores consequências à viabilidade polínica.

346 A necrose, presentes nas inflorescências dos tratamentos, onde foi aplicado o óleo  
347 mineral, pode ter ocorrido devido a acidificação natural de moléculas insaturadas, presentes no  
348 produto. Essa necrose ocorre devido a ruptura das membranas celulares, causada por esses  
349 compostos ácidos (Tan et al., 2005).

350 Em relação aos efeitos sobre o DNA/cromossomos, as informações sobre a  
351 genotoxicidade/ mutagênicidade do óleo mineral ainda são insuficientes. Porém, considerando  
352 que o óleo mineral é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos, de ciclo parafínicos e  
353 aromáticos saturados e insaturados, provenientes da destilação do petróleo e cujo o impacto da

354 contaminação nos diferentes estágios de produção, da indústria petrolífera no meio ambiente é  
355 conhecido (Leme et al., 2008a), é de se esperar que também possam provocar efeitos sobre as  
356 células, dependendo da concentração.

357 Leme et al.,(2008b) trabalhando com genotoxicidade de células de raízes de cebola  
358 submetidas a hidrocarbonetos petrolíferos, presentes na água, observou aumento significativo da  
359 porcentagem de anormalidades celulares, nos tratamentos com água contaminada. Os autores  
360 concluíram que esse resultado se deve provavelmente a mistura de hidrocarbonetos presentes no  
361 tratamento com resíduo de petróleo e que esses hidrocarbonetos interferem diretamente na  
362 formação das fibras do fuso, das células meristemáticas radiculares, culminando numa maior  
363 porcentagem de anormalidades celulares.

364 Uma possível explicação para a ocorrência de anormalidades na meiose do tratamento  
365 submetido a aplicação com óleo mineral, é que a exposição dos botões florais, a esse produto,  
366 mesmo sendo um derivado do petróleo diluído, também possa ter causado distúrbios na  
367 polimerização das fibras do fuso, aumentando a porcentagem de anormalidades celulares em  
368 relação ao grupo controle.

369 A necrose causada pelo uso do óleo de neem foi relatada também em outros trabalhos.  
370 Rickli et al. (2011) e Mossini and Kimmelmeier (2005), descreveram que produtos oriundos  
371 desse óleo podem causar fitotoxicidade em plantas, quando aplicados em altas concentrações,  
372 porém, essa fitotoxicidade se manifesta dependendo da espécie de planta, idade, fase de  
373 desenvolvimento, assim como condições ambientais.

374 Akiboro e Bakare (2007), trabalhando com citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes  
375 concentrações de extratos de plantas medicinais, em raízes de cebola (*Allium cepa* Linn),  
376 observaram que o extrato de Neem (*Azadirachta indica*) apresentou efeito mitodepressivo nas  
377 células radiculares, além de aumentar a porcentagem de anormalidades celulares, em todas as  
378 concentrações utilizadas, em relação ao tratamento controle. Os autores atribuem esses resultados  
379 a alta concentração de metais pesados como Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Ferro (Fe),  
380 Cadmo (Cd) e Chumbo (Pb) que compõem o extrato de Neem.

381 Kwankua et al., (2010) avaliaram a genotoxicidade de Neem em raízes de *Allium cepa* Linn  
382 e *Eucrosia bicolor* também observaram diminuição da atividade mitótica e aumento da incidência  
383 de anormalidades celulares, em todas as concentrações, para as raízes de ambas as plantas. Como  
384 uma possível explicação para esses resultados, os autores descreveram que o Neem possui  
385 características químicas semelhantes à colchicina, funcionando como um antimitótico afetando a  
386 síntese e despolimerização das fibras do fuso que culmina em uma maior incidência de  
387 anormalidades nas células.

388 As anormalidades causadas pelo Dimetoato também podem estar associadas à efeitos  
389 sobre a polimerização dos microtúbulos, pois existem relatos de alguns herbicidas,  
390 organofosforados, que formam complexos com os dímeros de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina impedindo a normal  
391 polimerização (Hanser et al., 1998). Em estudos em cromossomos metafísicos mitóticos de  
392 plantas, verifica-se que mesmo, em baixas concentrações, certos inseticidas organofosforados,  
393 inibem a formação de fusos cromáticos induzindo a separação dos cromossomos, sendo que estes  
394 ficam dispersos no citoplasma (Morejohn et al., 1987).

395 Binsfeld et al. (2000), trabalhando com o efeito de dois herbicidas, Oryzalin (ORY) do  
396 grupo das Dinitroanilinas e Amiprofós-metil (APM) do grupo dos organofosforados, sobre a  
397 polimerização de microtubulos, em células do mesofilo de Girassol silvestre (*Helianthus*

398 *maximiliani* L.), observaram modificações mitóticas causadas pela ausência de microtúbulos,  
399 seguido do aparecimento de células com cromossomos espalhados pelo citoplasma, com posterior  
400 condensação destes, formando micronúcleos. Assim como para o óleo mineral e para o óleo de  
401 nem, até o momento, não foram encontrados relatos dos efeitos do Dimetoato sobre a  
402 microsporogênese.

403 A menor porcentagem de grãos de pólen viáveis e a maior taxa de anormalidades  
404 cromossômicas causadas pela deltamitrina também pode estar relacionada à distúrbios na  
405 formação das fibras do fuso, já relatadas para células em mitose (Chauhan et al., 1986). Alguns  
406 autores trabalhando com fitotoxicidade de piretróides em meristemas de raízes de cebola (*Allium*  
407 *cepa*) encontraram resultados análogos. Chauhan et al., (1986), trabalhando com efeitos da  
408 deltamitrina em meristemas de raízes de cebola, constataram aumento de anormalidades mitóticas  
409 para todas as concentrações do produto utilizadas. Chauhan & Gupta, (2005), estudando efeito  
410 combinados de herbicidas com piretróides, em meristemas de raízes de cebola, observaram que  
411 altas concentrações de deltamitrina acarretaram em aumento de frequência de anormalidades e  
412 que seu uso combinado, com determinados herbicidas, culminou em maiores efeitos fitotóxicos a  
413 planta do que sua utilização isolada. Çavuşoğlu et al., (2010) trabalhando com efeitos da  
414 Cipermetrina em meristemas radiculares de cebola, concluiu que a utilização desse piretróide, em  
415 qualquer dosagem, acarreta em diminuição da atividade mitótica e aumento da incidência de  
416 anormalidades durante esse processo.

417 Além disso, já foi constatada, uma série alterações, em nível celular, acarretada pela  
418 utilização da deltamitrina. Chauhan & Gupta, (2005), observaram que a deltamitrina em células  
419 de raízes de cebola aumentaram o número de proplastídios e mitocôndrias, sendo que os  
420 proplastídios se apresentaram elétrodensos e altamente constrictos na região central. Também  
421 observaram alterações morfológicas no retículo endoplasmático, complexo de Golgi, na estrutura  
422 da membrana plasmática e parede celular, além de distúrbios nos arranjos de microtúbulos. Além  
423 disso, Çavuşoğlu et al., (2010), observou, na planta, redução significativa de clorofila A, B e  
424 carotenoides, e aumento de determinadas enzimas antioxidantes, indicando estresse oxidativo  
425 após a utilização do produto.

426 Com relação, aos testes de viabilidade polínica, para ambas as cultivares, o método de  
427 viabilidade polínica por coloração apresentou as maiores médias de pólen viáveis. Porém, ambos  
428 os métodos, quando comparados, pelo teste de correlação de Pearson, apresentaram uma  
429 correlação linear positiva fortemente relacionada, indicando que independentemente do método  
430 adotado ambos exemplificaram a porcentagem da viabilidade polínica ao longo dos tratamentos.

431 Geralmente o método de viabilidade polínica por germinação é preconizado, por se tratar  
432 de um método de avaliação direto que permite verificar o potencial germinativo do material  
433 analisado (Techio et al., 2006). Enquanto que os métodos de viabilidade polínica por coloração,  
434 se tratam de indicadores de viabilidade indiretos, que se baseiam em parâmetros citológicos,  
435 refletindo a integridade de determinadas estruturas celulares (Pline et al., 2002). Porém, como  
436 ambos os métodos apresentaram uma alta correlação linear positiva, sugere-se, para futuros  
437 estudos com *Olea europaea* L., a adoção do método de Viabilidade polínica por coloração, pois  
438 assim como observado por Techio et al., (2006), fornece resultados mais rápidos e com baixo  
439 custo.

440 Também pode ser observado que independentemente do método de viabilidade utilizado,  
441 a cultivar MGSGRAP 541 apresentou as maiores médias percentuais de pólen viáveis, em

442 relação a cultivar Arbequina. Silva et al., (2016) trabalhando com estabelecimento de meio de  
443 cultura e quantificação de grãos de pólen de diferentes cultivares de oliveiras, entre essas duas  
444 cultivares, a que apresentou as maiores médias percentuais de germinação/viabilidade polínica foi  
445 a cultivar Arbequina. Essa diferença de viabilidade polínica, entre as cultivares e entre safras é  
446 esperada, uma vez que a viabilidade polínica vai estar relacionada com uma série de fatores  
447 como: temperatura, umidade, condições nutricionais da planta, (Sharma et al., 1991; Franchi et  
448 al., 2011; Song et al., 2014).

449 Também pode-se verificar que independentemente do método de viabilidade polínica  
450 adotado e da cultivar, os grãos de pólen apresentaram alta porcentagem de viabilidade polínica no  
451 tratamento controle e diminuição da viabilidade polínica conforme o produto, seguindo esse  
452 gradiente: óleo mineral, óleo de neem, dimetoato e deltametrina, que coincidem com o aumento da  
453 porcentagem de anormalidades meióticas contabilizadas durante a microesporogenese, sugerindo  
454 que as irregularidades observadas na meiose são significativas em termos de viabilidade polínica.

455 Corrêa et al., (2005) trabalhando com viabilidade polínica da família Araceae afirma que  
456 uma alta porcentagem de tétrades normais, resulta num alto percentual de grãos de pólen viáveis  
457 e que altos percentuais de esterilidade de grãos de pólen podem ser devido a irregularidades  
458 durante a meiose. Os mesmos autores ainda afirmam que irregularidades dos movimentos  
459 cromossômicos conduzem a formação de tétrades com micronúcleos, devido ao atraso dos  
460 cromossomos na anáfase II.

461 Também é importante informar que, independente do tratamento e da cultivar avaliada, foi  
462 registrado uma baixa frequência de tríades, em ambas as cultivares, indicando a possibilidade de  
463 formação de gametas não reduzidos, a qual é ratificada pela presença de grãos de pólen de  
464 tamanhos maiores.

465 Em muitas espécies, os mecanismos para conduzir a formação de gametas  $2n$  tem sido  
466 amplamente estudado para utilização em trabalhos de melhoramento (Lima et al., 2015). O  
467 aspecto mais vantajoso da utilização de gametas não reduzidos, é a possibilidade de  
468 poliploidização, podendo ser obtida pela união de um gameta normal com um não reduzido,  
469 formando um triploide, ou pela união de dois gametas não reduzidos, formando um tetraploide. A  
470 utilização desses gametas possibilita a transferência de genes desejáveis entre níveis de ploidia  
471 diferentes. (Schifino- Wittmann and Ahnol, 2001). As plantas oriundas desse processo de  
472 poliploidização sexual podem ter um performance melhor devido as maiores possibilidades de  
473 interação multialélicas (Schifino- Wittmann e Ahnol, 2001).

474

## 475 **CONCLUSÃO**

476

477 Para as duas cultivares avaliadas, houve aumento significativo na porcentagem de  
478 anormalidades cromossômicas quando se utilizou algum tipo de produto químico.

479 O produto deltametrina provocou maior efeito sobre a meiose e a viabilidade de pólen.

480 A cultivar MGS GRAP 541 destacou-se com a maior taxa de viabilidade polínica nos  
481 tratamentos testemunha, óleo mineral e óleo de neem.

482 O aumento da porcentagem de anormalidades cromossômicas interfere diretamente na  
483 viabilidade polínica.

484

## 485 **AGRADECIMENTOS**

486  
 487 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, a  
 488 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo apoio financeiro  
 489 na execução desse trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –  
 490 CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

491

492 **REFERÊNCIAS**

493

494 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, (2016). Lista de Produtos Técnicos de  
 495 Referência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 09 de junho de 2016. Disponível em:  
 496 [http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos /produtos-equivalentes](http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/produtos-equivalentes) .  
 497 Acessado em 21 de outubro de 2016.

498

499 Akinboro A and Bakare AA, (2007) Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five  
 500 medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 470-475.

501

502 Alexander MPA, (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol*. 55:  
 503 13-18.

504

505 Binsfeld PC, Peters, JA , Schnabil EH, (2000). Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos  
 506 microtúbulo em protoplasto de *Helianthus maximiliani*. *Revista Brasileira de Fisiologia*. 12: 263-  
 507 272.

508

509 Çavuşoğlu K, Kaya A and Yılmaz F, Yalçın E, (2010). Effects of cypermethrin on *Allium cepa*.  
 510 *Environmental Toxicology*. 27: 583-589.

511 Chauhan LKS and Gupta SK, (2005). Combined and ultrastructural effects of substituted érea  
 512 herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristema cells of *Allium cepa*.  
 513 *Pesticide biochemistry and physiology*. 82: 27-35.

514

515 Chauhan LKS, Dikshith TSS, Sundararaman V, (1986). Effect of deltamethrin on plant cells – I.  
 516 Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutation Research*. 171: 25-30.

517

518 Consejo Oleícola Internacional - COI, (2016). International olive oil council. Consejo Oleícola  
 519 Internacional. 01 de novembro de 2015. Disponível em:  
 520 <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> . Acessado em 19  
 521 de outubro de 2016.

522

523 Corrêa MGS, Viégas J, Silva JB, Ávila FV, et al., (2005). Meiose e viabilidade polínica na  
 524 família Araceae. *Acta Botanica Brasílica*. 19: 295-303.

525 Ferreira DF, (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. 35:  
 526 1039-1042.

527 FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.  
 528 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

- 529  
530 Figueiredo MA, Pio R, Silva TC, Silva KN, (2013). Características florais e carpométricas e  
531 germinação in vitro de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. *Pesquisa Agropecuária*  
532 *Brasileira*. 48: 731-740.
- 533 Franchi GG, Piotto B, Nepi M, et al, (2011). Pollen and seed desiccation tolerance in relation to  
534 degree of developmental arrest, dispersal, and survival. *Journal of Experimental Botany*. 62:  
535 5267-5281.
- 536  
537 Guerra, M. S., & Souza, M. J. (2002). Como observar cromossomos: um guia de técnicas em  
538 citogenética vegetal, animal e humana (pp. 17–38). Ribeirão Preto SP: FUNPEC.
- 539 Hansen AL, Gertz A, Joersbo M, Andersen SB, (1998) Antimicrotubule herbicides for *in vitro*  
540 chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica*. 101: 231-237.
- 541  
542 Kwankua W, Sengsai S, Kuleung C, et al., (2010) Sunlight decreased genotoxicity of  
543 azadirachtin on root tip cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 949-954.
- 544  
545 Leme DM, Franceschi D, Marin-Morales MA, (2008) Action mechanisms of petroleum  
546 hydrocarbons presente in water impacted by na oil spill on the genetic material of *Allium cepa*  
547 root cells. *Aquatic Toxicology*. 88:214-219b.
- 548  
549 Leme DM, Marin-Morales MA, (2008) Chomosome aberration and micronucleus frequencies in  
550 *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. *Mutation Research*. 650:  
551 80-86a.
- 552  
553 Lima DC, Brazl GT, Reis GB, Techio VH, et al., (2015). Implications of mitotic and meiotic  
554 irregularities in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Genetics and Molecular Research*. 15:  
555 1-10.
- 556 Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, (2016). Sistema de agrotóxicos e  
557 fitossanitários. AGROFIT. 21 de novembro de 2016. Disponível em:  
558 [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) . Acessado em 21 de outubro  
559 de 2016.
- 560  
561 Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer J, Bajer AS, et al., (1987). Oryzalin, a dinitroaniline  
562 herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. *Planta*. 172:  
563 252-264.
- 564  
565 Mossini SAG and Kimmelmeier C, (2005) A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos  
566 usos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 24: 139-148.
- 567  
568 Navero DB, Cimato A, Fiorino P, et al. (2000). Catalogo mundial de variedades de olivo. 1st edn.  
569 Consejo Oleícola Internacional, Madrid.
- 570

- 571 Oliveira AF, et al., (2012). Caracterização e proteção de cultivares. In: Oliveiras no Brasil  
572 (Oliveira AF., eds). EPAMIG.  
573
- 574 Pline WA, Edmisten KL, Oliver T, Wilcut JW, et al., (2002). Use of digital image analysis  
575 viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton  
576 pollen viability. *Crop Science*. 42: 2193-2200.  
577
- 578 Rickli HC, Fortes AMT, Silva PSS, Pilatti DM, et al., (2011). Efeito alelopático de extrato  
579 aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, feijão e picão-preto. *Ciências*  
580 *Agrárias*. 32: 473-484.  
581
- 582 Schifino- Wittmann M.T.; Agnol, M.D. (2001) Gametas não reduzidos no melhoramento de  
583 plantas. *Ciências Rural*. 31:169-175.  
584
- 585 Sharma CP, Sharma PN, Chatterjee C, et al, (1991). Manganese deficiency in maize affects  
586 pollen viability. *Plant and Soil*. 138: 139-142.  
587
- 588 Silva LFO, Zambon CRZ, Pio R, Oliveira AF, et al., (2016). Establishment of rowth médium and  
589 quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical áreas. *Bragantia*. 75: 26-  
590 32.  
591
- 592 Silva LO, Oliveira AF, Pio R, ZAMBON. C.R, (2012). Caracterização agronômica e  
593 carpométrica de cultivares de oliveira. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 42: 350-356.  
594
- 595 Song G, Chen Q, tang c, (2014). The effects of high-temperature stress on the germination of  
596 pollen grains of upland cotton during square development. *Euphytica*. 200: 175-186.  
597
- 598 Tan BL, Sarafis V, Beattie GAC, WHITE R, et al., (2005). Localization and movement of  
599 mineral oil mineral oil in plants by fluorescence and confocal microscopy. *Journal of*  
600 *Experimental Botany*. 56: 2755-2763.
- 601 Techio VH, Davide LC, Pedrozo CD, Pereira AP, (2006). Viabilidade do grão de pólen de  
602 acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interpecíficos (capim elefante x milheto). *Acta*  
603 *Scientiarum Biological Sciences*. 28: 7-12.