



**LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA DA SILVA**

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO DE  
GRÃOS DE PÓLEN E PACLOBUTRAZOL EM  
CULTIVARES DE OLIVEIRA**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA DA SILVA**

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN E  
PACLOBUTRAZOL EM CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Rafael Pio

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Luiz Fernando de Oliveira da.

Meio de cultura para germinação de grãos de pólen e  
paclobutrazol em cultivares de oliveira / Luiz Fernando de Oliveira  
da Silva. – Lavras : UFLA, 2014.

85 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Rafael Pio.

Bibliografia.

1. Olea europaea L. 2. Vingamento de frutos. 3. Melhoramento  
genético. 4. Indução floral. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 634.6323

**LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA DA SILVA**

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN E  
PACLOBUTRAZOL EM CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 11 de junho de 2014.

Dr. Adelson Francisco de Oliveira	EPAMIG
Dr. Antônio Decarlos Neto	UFLA
Dr. Emerson Dias Gonçalves	EPAMIG
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA

Dr. Rafael Pio - UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS - MG**

**2014**

A minha mãe, Elicéia, inspiração para os meus dias difíceis.

À Carolina Ruiz Zambon, amiga, noiva, companheira...  
meu respeito e admiração.

**DEDICO.**

AMO VOCÊS !!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta oportunidade de realizar este sonho e vencer mais esta etapa;

A minha família, em especial a minha mãe, pelo apoio, colo, carinho e confiança;

A minha irmã, Talita;

Aos vizinhos, parentes e amigos que sempre apoiaram de forma direta e indireta.

À Carolina Ruiz Zambon, não só pelo apoio na execução dos trabalhos, mas também pelo carinho, paciência e por ser muito mais que minha noiva e colega profissional...é exemplo e inspiração;

Ao José Emílio Bettiol Neto e toda sua família, pelos momentos vividos, carinho, ensinamento e uma grande amizade que levaremos pelo futuro;

A Tattiele Custódio Alves e Dili Luiza de Oliveira, pelo apoio na execução dos trabalhos e amizade;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade;

À Marli dos Santos Túlio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, por toda paciência ao longo desses anos, e ao Departamento de Biologia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a realização deste curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na execução dos trabalhos;

A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial aos colegas da Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF) e da Unidade Regional EPAMIG Sul de Minas (URESMA);

Aos meus orientadores e amigos, Professor D. Sc. Rafael Pio e Pesquisador D. Sc. Adelson Francisco de Oliveira, pela atenção, ensinamentos, paciência e amizade ao longo de mais esta etapa;

Aos professores; Dr. Antônio Decarlos Neto, Dr. Evaristo Mauro de Castro e Dr. Rafael Pio e aos pesquisadores Dr. Emerson Dias Gonçalves e Dr. Adelson Francisco de Oliveira, membros da banca, que muito contribuíram para melhoria deste trabalho;

A todos os professores da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos amigos de Itajubá;

Aos amigos de Lavras: da cidade...da UFLA...do pomar...do brejão;

A todos que de forma direta ou indireta, auxiliaram na realização deste trabalho.

A vocês,

**AGRADEÇO.**

## **EPIGRAFE**

*“...Não me entrego sem lutar,  
tenho ainda coração.  
Não aprendi a me render,  
que caía o inimigo então.  
E nossa história não estará pelo avesso,  
assim, sem final feliz.  
Teremos coisas bonitas pra contar.  
E até lá, vamos viver,  
temos muito ainda por fazer.  
Não olhe pra trás,  
apenas começamos.  
O mundo começa agora,  
apenas começamos.”*

Metal contra nuvens

(Renato Russo / Marcelo Bonfá / Dado Villa-Lobos)



## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho ajustar o meio de cultura básico para a germinação de grãos de pólen, determinar a capacidade polínica germinativa e quantificar o número de grãos de pólen por flor de diferentes cultivares dessa espécie e verificar as modificações vegetativas e anatômicas das cultivares de oliveira submetidas à diferentes doses de paclobutrazol (PBZ). O primeiro experimento foi conduzido em Maria da Fé, MG. Para determinação do meio de cultura, foram montados cinco experimentos sequenciais de acordo com as seguintes etapas: 1) concentrações de ágar (4, 6, 8 e 10 g.L<sup>-1</sup>) e ácido bórico (0, 400, 800 e 1200 mg.L<sup>-1</sup>); 2) valores de pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) e concentrações de sacarose (0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup>); 3) concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg.L<sup>-1</sup>) e sulfato de magnésio (0; 0,5; 1 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>); 4) temperatura de incubação (24, 26, 28, 30 e 32 °C) e 5) tempo de emissão do tubo polínico (0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas), sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para a determinação da taxa de germinação dos grãos de pólen foi utilizado o DIC com 28 tratamentos e quatro repetições. Para avaliação do número de grãos de pólen por flor foi utilizado DIC com 28 tratamentos e cinco repetições. O meio de cultura deve ser constituído por 4 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 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 temperatura de 28 °C. A ‘Manzanilla 215’ apresentou maior germinação e a ‘Ascolano 315’ apresentou maior quantidade de grãos de pólen por flor. O segundo experimento foi conduzido em Maria da Fé e Lavras, MG. O delineamento estatístico foi o DIC em esquema fatorial 2 [cultivares: Arbequina e Ascolano 315 (MGS ASC 315)] x 4 (doses: 6, 12 e 18 mL.planta<sup>-1</sup> de PBZ, além da testemunha) com três repetições. Foram avaliados o crescimento em altura e diâmetro, massa seca da parte aérea e radicular, teor de clorofila a, b e total, espessura da epiderme adaxial e abaxial e parênquima paliçádico e esponjoso. Em Lavras, a ‘Ascolano 315’ apresentou menor crescimento em altura. O paclobutrazol reduziu a altura, diâmetro e os teores de massa seca do sistema radicular das plantas cultivadas em Maria da Fé. O teor de clorofila a, b e total não foi alterado com a aplicação de PBZ, entretanto em Lavras, a ‘Ascolano 315’ apresentou maior teor de clorofila a e em Maria da Fé, a ‘Arbequina’ apresentou maiores teores de clorofila a, b e total. A ‘Arbequina’ foi mais influenciada pelo efeito do PBZ. A ‘Ascolano 315’, teve sua epiderme abaxial reduzida em 52,16% quando submetida à aplicação de 10,32 g.planta<sup>-1</sup> de PBZ. A ‘Arbequina’ apresentou maior espessura do parênquima paliçádico e esponjoso.

Palavras-chave: *Olea europaea* L. Vingamento de frutos. Melhoramento genético. Indução Floral.

## ABSTRACT

The objective of this work was adjust the basic culture medium, for germination of pollen grains, to determine the pollen germination capacity, to quantify the number of pollen grains per flower of different cultivars of this species and check the vegetative and anatomical changes of olive cultivars submitted to different doses of paclobutrazol (PBZ). The first experiment was conducted in Maria da Fé city, MG. To determine the culture medium, five sequential experiments were performed according to the following steps: 1) agar concentrations (4, 6, 8 and 10 g.L<sup>-1</sup>) and boric acid (0, 400, 800 and 1200 mg.L<sup>-1</sup>); 2) pH values (3.5, 4.5, 5.5 and 6.5) and sucrose concentrations (0, 30, 60 and 90 g.L<sup>-1</sup>); 3) Calcium nitrate concentrations (0, 200, 400 and 800 mg.L<sup>-1</sup>) and magnesium sulphate (0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L<sup>-1</sup>); 4) incubation temperature (24, 26, 28, 30 and 32 °C) and 5) incubation time (0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours). A completely randomized design being used, with four replications. To determine the rate of germination of pollen was used DIC with 28 treatment and four replications. To evaluate the number of pollen grains per flower was used DIC with 28 treatments and five replications. The culture medium must be composed of 4 g.L<sup>-1</sup> agar, 90 g.L<sup>-1</sup> sucrose, 400 mg.L<sup>-1</sup> of boric acid and pH adjusted to 5.79 in the absence of calcium nitrate and magnesium sulfate, maintained for 60 hours at 28 ° C. The ‘Manzanilla 215’ showed higher germination and ‘Ascolano 315’ showed the highest number of pollen grains per flower. The second experiment was conducted in Maria da Fé and Lavras citys, MG. The statistical design was DIC in factorial 2 [cultivars: Arbequina and Ascolano 315 (ASC 315 MGS)] x 4 (doses: 6, 12 and 18 mL.planta<sup>-1</sup> PBZ, plus the control) with three replications. Were evaluated growth in height and diameter, dry mass of shoots and roots, content of chlorophyll a, b and total, thickness of the adaxial and abaxial epidermis and palisade and spongy parenchyma. In Lavras, the ‘Ascolano 315’ showed less growth in height. Paclobutrazol reduced height, diameter and leaf dry mass of the root system of plants grown in Maria da Fé. The content of chlorophyll a, b and total has not changed with the application of PBZ, however in Lavras the ‘Ascolano 315’ showed a higher content of chlorophyll in Maria da Fé, ‘Arbequina’ higher concentrations of chlorophyll a, b and total. The ‘Arbequina’ was more influenced by the effect of PBZ. The ‘Ascolano 315’, had its abaxial reduced by 52.16% when subjected to the application of 10.32 g.plant<sup>-1</sup> PBZ. The ‘Arbequina’ showed higher thickness of palisade and spongy parenchyma.

Key words: *Olea europaea* L. Setting of fruits. Anatomics cuts. Breeding programs. Floral induction.

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Centro de origem e variabilidade genética.....	15
2.1.1	<i>Olea euromediterranea sativa</i> .....	16
2.1.2	<i>Olea euromediterranea oleaster</i> .....	16
2.2	Descrição da planta.....	17
2.3	Crescimento vegetativo e reprodutivo.....	19
2.4	Fatores que influenciam o crescimento vegetativo e reprodutivo .	21
2.5	Polinização, fecundação e desenvolvimento do fruto .....	22
2.6	Testes de germinação ' <i>in vitro</i> ' .....	23
2.6.1	Procedimento fluorocromático (FCR).....	23
2.6.2	Testes do conteúdo celular com corantes .....	23
2.6.3	Germinação do pólen em meio artificial .....	24
2.7	Autocompatibilidade e autoincompatibilidade .....	27
2.8	Indução floral e aplicação de fitorreguladores.....	28
2.9	Modificações anatômicas e fisiológicas em plantas.....	29
2.10	Ensaio de adaptação e melhoramento genético .....	30
2.11	Avanços na olivicultura em minas gerais .....	32
	REFERÊNCIAS.....	35

### SEGUNDA PARTE

	ARTIGO 1 - ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA E QUANTIFICAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE CULTIVARES DE OLIVEIRA .....	42
	ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES VEGETATIVAS E ANATÔMICAS EM CULTIVARES DE OLIVEIRA SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL (PBZ) .....	60
	ANEXOS.....	81

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a oliveira (*Olea europaea* L.) é cultivada em mais de 40 países distribuídos em quase todos os continentes. Com uma área aproximada de 10,6 milhões de hectares, com um pouco mais de 1 bilhão de plantas e uma produção de 16,8 milhões de toneladas de azeitonas, sendo que apenas 10% são destinadas ao consumo de mesa, a produção mundial em 2013 foi da ordem de 3.098.000 toneladas métricas (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL - COI, 2014).

No Brasil, azeitonas e azeite de oliva, são produtos disponibilizados por meio de importações, principalmente de países como Portugal e Argentina. Estima-se um gasto no ano de 2013 da ordem de US\$ 296.707,00 milhões de dólares com a importação de 54.458,78 mil toneladas de azeite (INTERNATIONAL TRADE MAP, 2014).

Com base nessas informações o Brasil começa a despertar para esta atividade. Há plantios já em produção nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Em Minas Gerais, os cultivos estão sendo realizados principalmente no sul do Estado, em áreas agricultáveis dos contrafortes da Serra da Mantiqueira, atingindo atualmente mil hectares, com cerca de 400 mil oliveiras cultivadas<sup>1</sup>.

Entretanto, para suprir o atual mercado nacional, seria necessário o plantio de 11 milhões de plantas, que poderiam gerar divisas da ordem de US\$ 636 milhões de dólares (VIEIRA NETO et al., 2011).

Empenhados em reverter esse quadro, pesquisadores da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal - Nilton Caetano de Oliveira

Catariana (EPAGRI) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vem desenvolvendo pesquisas com a cultura da oliveira nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente, e em outros micro climas do Brasil.

Nos Bancos de Germoplasma da empresa, existem 60 acesso de diferentes origens, os quais alguns vem apresentando resultados positivos apontando a viabilidade de sua exploração comercial na região da Serra da Mantiqueira. Alguns, além de produzirem adequadamente, apresentam um produto de excelente qualidade, sendo seu azeite submetido à análises químicas e classificado inicialmente como extra virgem, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2012).

Esses resultados tem despertado a atenção de produtores e empresários brasileiros diante da possibilidade de cultivo comercial da oliveira em território nacional. Como consequência, nos últimos cinco anos, a implantação de plantios comerciais vem crescendo na região da Serra da Mantiqueira, onde há hoje cerca de 70 produtores distribuídos em 60 municípios de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro<sup>2</sup>.

Porém, ainda existem lacunas nas atividades que precisam ser sanadas, como o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas as condições edafoclimáticas subtropicais do sudeste, desenvolvimento de técnicas capazes de induzir as plantas ao florescimento, mesmo na ausência do frio necessário para tanto, e ainda a melhoria da fixação dos frutos.

O objetivo com o presente trabalho foi dar suporte aos trabalhos de melhoramento genético da oliveira voltado para a seleção de cultivares adaptadas para regiões subtropicais e obter informações que possam aumentar o vingamento de frutos, além de verificar as modificações vegetativas e

---

<sup>2</sup> Comunicação pessoal - Nilton Caetano de Oliveira

anatômicas das cultivares de oliveira submetidas à aplicação de paclobutrazol (PBZ) visando a indução da floração.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Centro de Origem e variabilidade genética

A oliveira é a única espécie da família Oleaceae com fruto comestível. É uma das plantas cultivadas mais antigas, cuja origem como cultivo é de 4000-3000 anos antes de cristo na região da Palestina. Atualmente, 95% da área mundial cultivada se encontram na bacia mediterrânea (CRUZ et al., 2012).

Originária da Síria e Irã, a oliveira estendeu-se por toda a região do Mediterrâneo, e posteriormente para outras partes do mundo (LOUSSERT; BROUSSE, 1980). Nos países da América, provavelmente, as oliveiras chegaram por volta de 1520 com as primeiras expedições espanholas e portuguesas durante a época das grandes navegações. No Brasil, a oliveira foi introduzida em meados dos séculos XV e XVI nas regiões do Sul e Sudeste do país (GOBBATO, 1945).

A oliveira pertence ao Ramo Fanerógama, Sub-ramo Angiosperma, Classe Dicotiledônea, Subclasse Gamopetala-Tetracíclica, Ovário súpero e Ordem Contortales (GOBBATO, 1945; LOUSSERT; BROUSSE, 1980; UBOLDI, 1945).

Pertence à família botânica Oleaceae, que compreende espécies de plantas distribuídas por regiões tropicais e temperadas do mundo. As plantas desta família são em sua maioria árvores e arbustos, às vezes trepadeiras. Muitas delas produzem azeites essenciais em suas flores ou frutos, alguns dos quais são utilizados pelo homem (CRUZ et al., 2012).

Compreende cerca de 25 gêneros com 30 espécies. A oliveira cultivada corresponde ao gênero *Olea*, espécie *europaea*, subespécie *sativa*, que se diferencia da subespécie *oleaster*, em que estão classificadas as oliveiras silvestres, de onde originou a *Olea europaea sativa* por disseminação

espontânea e segregação de caracteres (GOBBATO, 1945; LOUSSERT; BROUSSE, 1980; UBOLDI, 1945).

Os dados de citogenética não permitem atualmente dar a composição do genoma do gênero *Olea*. A família Oleácea tem poliploides somente nos gêneros *Fraxinus* e *Jasminum*. Seu número de cromossomos é 23 ( $2n = 2x = 46$ ), que é característico de todas as espécies do gênero *Olea* (ALBA et al., 2009), apresentando grande variabilidade para diferentes caracteres, como altura de plantas, tamanho de folhas, tamanho e peso de frutos.

A espécie *Olea europaea* se subdivide em três grandes subespécies: Euromediterranea, Laperrini e Cuspidata, sendo a primeira subespécie a mais importante por compreender a oliveira atualmente cultivada.

A subespécie Euromediterranea se divide em *Olea euromediterranea sativa* e *Olea euromediterranea oleaster*.

### **2.1.1 *Olea euromediterranea sativa***

É conhecida também como oliveira cultivada. São constituídas por um grande número de cultivares melhoradas, multiplicadas por estacas ou por mudas enxertadas e que não se conhecem no estado selvagem.

### **2.1.2 *Olea euromediterranea oleaster***

Denominada de acebuche na África do Norte, se apresenta de forma espontânea como um arbusto espinhoso e de frutos geralmente pequenos. Estas formas espontâneas ou subespontâneas se distribuem na Espanha, Portugal, África do Norte, Itália, Crimeia, Cáucaso, Armênia e Síria. Provém de sementes extraviadas ou de árvores cultivadas anteriormente e depois abandonadas, que deram origem a populações de indivíduos que mais tarde voltaram ao estado selvagem. Existe a hipótese de que há formas diferentes de *Olea oleaster* nas



regiões onde anos tenha sido cultivada a oliveira, como Argélia, Tunísia, Marrocos e Síria.

## **2.2 Descrição da planta**

É uma árvore de tamanho médio, de quatro a oito metros de altura, dependendo da variedade. Pode permanecer viva e produtiva durante centenas de anos. O tronco é grosso e o córtex de cor cinza a verde acinzentada. A copa é arredondada embora mais ou menos lobulada; a ramificação natural tende a produzir uma copa bastante densa, mas a poda pode ser utilizada para a abertura da copa, permitindo a penetração da luz (CRUZ et al., 2012).

Apresenta polimorfismo com duas fases bem diferenciadas: a juvenil e a adulta. Estas fases se distinguem pela capacidade reprodutiva, potencial de enraizamento e na aparência de folhas e ramos. Durante a fase juvenil, a oliveira não é capaz de produzir frutos, possui maior potencial de enraizamento de estacas, folhas mais curtas e grossas e ramos em que o comprimento dos entrenós é menor. Ao contrário, na fase adulta alcança sua capacidade reprodutora, possui folhas maiores e mais delgadas e os ramos apresentam entrenós com maiores comprimentos (RAPOPORT, 1998).

O sistema radicular varia em função da origem da árvore, se é originado de sementes ou de estacas e das características do solo no qual está sendo cultivada. A semente origina um sistema radicular caracterizado por uma raiz pivotante central (LOUSSERT; BROUSSE, 1980). Por outro lado, a partir de estacas forma-se, desde o início, um sistema radicular fasciculado. A maioria destas raízes adventícias se comporta como raízes principais durante o desenvolvimento e crescimento da árvore (RAPOPORT, 1998).

As folhas adultas são simples e de forma elíptica, elíptico-lanceolada ou lanceolada, com comprimento variando de 5,0 a 7,0 cm e largura de 1,0 a 1,5

cm. A estrutura foliar permite adaptação a condições de elevada transpiração. Assim, a região adaxial é de cor escura e 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, também denominados placas foliares, o que permite resistir às condições de extrema seca (RAPOPORT, 1998).

A inflorescência tem forma 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 (RAPOPORT, 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, estilete curto e grosso e estigma biloculado e papiloso, que pode variar em sua forma dependendo da cultivar. A maturação dos órgãos sexuais ocorre vinte dias antes da floração, com o desenvolvimento do saco embrionário e a maturação dos gametas (RAPOPORT, 1998).

Quanto à carpometria, o fruto, denominado azeitona, é uma drupa de tamanho pequeno e forma elipsoidal, cujas dimensões variam em função da cultivar, podendo variar de 1,0 a 4,0 cm de comprimento e de 0,6 a 2,0 cm de largura. Possui uma só semente e é composto de três tecidos fundamentais: endocarpo, mesocarpo e exocarpo (RAPOPORT, 1998). O endocarpo corresponde à semente, o mesocarpo à polpa e o exocarpo epiderme externa do fruto. O conjunto destes tecidos denomina-se pericarpo, que se origina da parede do ovário.

A semente ou endocarpo pode apresentar diversas formas, tamanhos, simetrias e relevo em sua superfície, devido ao distinto número e continuidade de sulcos fibrovasculares originados pela pressão dos vasos que separam o mesocarpo e o endocarpo durante o desenvolvimento do fruto. Esses caracteres são utilizados como principal critério morfológico de classificação para a identificação de cultivares de oliveira (BARRANCO et al., 2000).

### **2.3 Crescimento vegetativo e reprodutivo**

A oliveira apresenta uma série de fenômenos cíclicos com caráter anual, como o crescimento de brotos e o desenvolvimento de frutos que vão determinar o crescimento vegetativo total da árvore e sua produção, estabelecendo forte relação de competição por assimilados entre ambos os processos. O crescimento de brotos ocorre no mesmo ano, entretanto, os processos que levam à frutificação precisam de dois anos consecutivos. No primeiro ano ocorre a formação de gemas e sua indução, após um período de repouso, durante o segundo ano, ocorre o desenvolvimento da flor, a floração, o crescimento e a maturação do fruto (FERNÁNDEZ-ESCOBAR, 1993; RALLO, 1998).

As gemas presentes nas axilas foliares dos ramos podem evoluir, dependendo dos estímulos recebidos, para gemas vegetativas ou reprodutivas. A mudança fisiológica que condiciona uma gema a formar flores é denominada indução floral, sendo um processo reversível (RALLO, 1998).

Segundo Fernández-Escobar et al. (1992) e Rallo (1998), frutos em desenvolvimento atuam como inibidores da indução floral, sendo que a eliminação destes, no intervalo de 6 a 7 semanas após a plena floração, aumenta a floração do ano seguinte. Esta inibição pode ser devido à ação de giberelinas que são sintetizadas nas sementes dos frutos em formação.

Após a iniciação floral, as gemas entram em um estado de latência, que se caracteriza pela ausência de crescimento visível em qualquer estrutura dos tecidos meristemáticos. As seguintes causas são responsáveis pela latência das gemas florais: causas endógenas, em que as gemas carecem de capacidade de crescimento, ainda que as condições sejam favoráveis (endolatência ou repouso) e condições ambientais desfavoráveis (ecolatência ou quiescência) que não permitem o crescimento meristemático (RALLO, 1998).

O período de tempo em que as gemas recuperam sua capacidade de crescimento é denominado saída de repouso. A causa determinante do desaparecimento da endolatência em oliveira, igualmente para espécies frutíferas caducifólias, é o frio hibernal conhecido como necessidade de frio (RALLO, 1998).

As condições climáticas durante a floração também são determinantes para a polinização e o vingamento do fruto. Temperaturas superiores a 30 °C inibem o desenvolvimento do tubo polínico, obtendo-se baixa percentagem de vingamento e incremento do número de frutos partenocárpico ou não fecundados (FERNÁNDEZ-ESCOBAR, 1993; RALLO, 1998). Outros fatores ambientais influenciam na produção, como estresse hídrico ou carências nutricionais. Esses fatores reduzem o número de flores por inflorescência e aumentam a taxa de aborto floral (RALLO, 1998).

Somente uma vez finalizado o período de concorrência por assimilados entre os jovens frutos em desenvolvimento e ovários sem fecundação, caracterizado por uma grande abscisão destes órgãos durante 6 ou 7 semanas depois da floração, é que ficará definido o número final de frutos, portanto, a carga produtiva da árvore (RALLO, 1998).

As interações entre o tubo polínico e o estilete representam um importante ponto de controle da fecundação para os frutos de oliveira. Ali ocorre a seleção de um só tubo polínico, fenômeno chamado seleção gamética, pelo

qual alguns gametas são preferidos em detrimento a outros, para a fecundação. A autoincompatibilidade em oliveira se expressa pelo atraso dos tubos polínicos do mesmo cultivar para atravessar o estigma. Por esta razão podem não chegar a tempo para encontrar primórdios seminais viáveis (CUEVAS, 1992).

Segundo Del-Rio e Caballero (1999) e Lousert e Brousse (1980), a polinização cruzada aumenta o vingamento dos frutos e conseqüentemente a produção de muitas cultivares, embora nem sempre ocorra desta maneira. Isto pode ser observado porque a velocidade de crescimento do tubo polínico é maior quando o grão de pólen origina-se de uma cultivar distinta.

#### **2.4 Fatores que influenciam o crescimento vegetativo e reprodutivo**

O conhecimento dos mecanismos que regulam o crescimento vegetativo e a indução floral em plantas frutíferas é fundamental para proporcionar melhorias no sistema de produção. Entre os aspectos relacionados à indução floral estão a água, fitohormônios e o estado nutricional (HALEVY, 1990).

Outros fatores, como temperatura, luz e cultivares podem influenciar nos mecanismos biológicos do florescimento da oliveira.

Há ainda diversos fatores relacionados à floração da oliveira a elucidar. A realização de pesquisas em condições de campo, onde vários e identificáveis fatores bióticos e abióticos interagem, dificultando a interpretação dos resultados se torna muito mais complexa.

O uso de técnicas alternativas, como a indução floral, permite a realização de pesquisas com controle mais eficiente dos fatores que influenciam o florescimento, mas os resultados podem, também, não representar a realidade.

Algumas destas têm sido utilizadas em muitas frutíferas, possibilitado a manipulação do crescimento vegetativo e da floração em algumas espécies.

## 2.5 Polinização, fecundação e desenvolvimento do fruto

A polinização é o evento onde ocorre a transferência dos grãos de pólen das anteras de uma flor, para o estigma da mesma, ou para o estigma de outra flor da mesma espécie, a esses eventos denomina-se autopolinização e polinização cruzadas, respectivamente (LEITE; SOUZA, 2003). Os grãos de pólen envolvidos nesse processo são constituídos de duas células haploides, sendo uma delas vegetativa e responsável pela formação do tubo polínico e a outra a célula generativa que passará por mitose para formação das células espermáticas, uma delas responsável pela fecundação da oosfera que originará o zigoto que posteriormente se desenvolverá em embrião e a outra se une com os núcleos polares formando o endosperma triploide.

Quando se trata de produção de alimentos, a polinização é um processo fundamental para garantir colheitas significativas para o abastecimento de alimentos à população. Em escala global, estima-se que mais de 75% das espécies vegetais utilizadas na agricultura sejam dependentes de animais para polinização (ALVES et al., 2010).

Além da necessidade de uma polinização entomófila e anemófila, a formação do fruto de oliveira pode ser influenciada por vários outros fatores, estruturais, morfológicos, e ambientais como, por exemplo: momento de liberação do pólen, viabilidade polínica, receptividade do estigma, fragilidade e sobrevivência do óvulo, compatibilidade genética, conteúdo de açúcar total de seu néctar, além de temperatura, umidade e luminosidade (ALVES et al., 2010).

Basicamente, quanto maior for à quantidade de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior a probabilidade de êxito na fertilização, porém, dependendo do tipo de pólen envolvido, o processo de fertilização pode ser afetado por fatores genéticos e fenotípicos, ocasionando má formação da semente e do fruto (LEITE; SOUZA, 2003).

## **2.6 Testes de Germinação ‘*in vitro*’**

O teste de germinação de grãos de pólen *in vitro* é imprescindível para programas de melhoramento genético de frutíferas, pois, por meio dessas análises preliminares torna-se possível verificar sua viabilidade, assim como realizar as primeiras inferências sobre problemas de esterilidade intrínsecos das cultivares em estudo (PIO et al., 2004).

Os métodos utilizados para avaliação da qualidade do pólen “*in vitro*” podem ser:

- A) Procedimento fluorocromático (FCR);
- B) Testes do conteúdo celular com corantes;
- C) Germinação do pólen em meio artificial.

### **2.6.1 Procedimento fluorocromático (FCR)**

O teste de FCR possui uma metodologia que correlaciona à integridade da membrana e crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen, por meio de técnicas de microscopia de fluorescência.

Nessa técnica os grãos de pólen que não são completamente fluorescentes são considerados inviáveis, pois, apresentam algum tipo de problema estrutural, enquanto que, os grãos de pólen completamente fluorescentes são metodologicamente considerados aptos à germinação, sendo assim viáveis (TECHIO et al., 2006).

### **2.6.2 Testes do conteúdo celular com corantes**

O teste por corantes reflete a atividade enzimática da desidrogenase durante o processo respiratório dos tecidos, sendo que esse tipo de atividade enzimática no grão de pólen está relacionado com sua capacidade de

germinação. Ou seja, o corante reage com o hidrogênio produzido na respiração celular do pólen, fazendo com que este adquira uma coloração diferenciada. Testes com lugol e sudan são empregados em estudos como indicativo de viabilidade polínica (HUANG et al., 2004). Porém, para muitos autores, estas metodologias apenas possibilitam a identificação de substâncias existentes no grão de pólen, como lipídios e amido podendo estar presentes em grãos viáveis ou não (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000). Outros tipos de corantes como ‘Solução de Alexander’ e ‘Carmim Acético’ também são empregados nesses testes, porém, para muitos autores, eles apenas refletem a integridade de algumas estruturas celulares como membrana plasmática e núcleo celular, não sendo um indicador direto de viabilidade polínica (PLINE et al., 2002).

### **2.6.3 Germinação do pólen em meio artificial**

A germinação *in vitro* emprega a utilização de um meio de cultura para determinar a aptidão da germinação dos grãos de pólen. Sendo que para uma alta taxa de germinação é necessário à compreensão de uma série de fatores como temperatura, pH, ajustes da composição do meio para a espécie trabalhada e período de emissão do tubo polínico.

A temperatura em que o pólen é exposto durante sua fase germinativa é diretamente relacionada com o desenvolvimento do tubo polínico. Chagas et al. (2010) trabalhando com desenvolvimento de tubos polínicos de porta enxerto de pereiras observaram que até 28 °C houve favorecimento da germinação e que temperaturas mais elevadas acarretaram em diminuição dessa porcentagem. Silva et al. (1999) trabalhando com germinação de grão de pólen de maracujá, observaram que em temperaturas entre 22 e 24 °C houve diminuição da taxa de germinação do pólen e temperaturas entre 27 e 28 °C favoreceram seu aumento.



Outro fator importante para o meio de cultura é o pH, sendo que seu ajuste varia de acordo com a espécie em estudo, influenciando diretamente na disponibilidade de fitorreguladores e nutrientes, além de intervir diretamente na solidificação do meio. Chagas et al. (2009), em seu estudo com diferentes cultivares de *Prunus persica* (L.), obtiveram como melhor resultado na germinação dos grãos de pólen em meio com pH aferido para 5,5. Chagas et al. (2010) estudando germinação de grãos de pólen de *Pyrus betulaefolia* e *Pyrus calleryana*, concluíram que o ideal para a germinação do pólen dessas espécies é o pH variando entre 5,2 e 5,8, respectivamente.

Com relação ao ajuste dos componentes básicos do meio, sabe-se que vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação *in vitro*, dos quais o ágar, a sacarose, o cálcio e o boro são os mais importantes (BOLAT; PIRLAK, 1999).

O ágar tem como função a solidificação do meio de cultura, possuindo como atributo a facilidade da incorporação dos nutrientes, além de proporcionar umidade relativa constante, fornecendo um ambiente onde os grãos de pólen possam se desenvolver. A concentração de ágar varia dependendo da espécie. Chagas et al. (2009), em seu estudo com *Prunus persica* (L.) obtiveram o melhor resultado de germinação (55,42%), com 10 g.L<sup>-1</sup> ágar. Chagas et al. (2010) estudando germinação de grãos de pólen de porta enxertos de pereira, conseguiram as maiores taxas de germinação à medida que aumentaram a concentração de ágar no meio de cultura.

A sacarose tem como finalidade o fornecimento de energia para os processos biossintéticos envolvidos no crescimento, diferenciação e morfogênese celular. Xie et al. (2004), estudando germinação de grãos de pólen de peras asiáticas e Chagas et al. (2009), estudando *Prunus persica* (L.), constataram que as maiores porcentagens de germinação foram alcançadas com as maiores concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, enquanto

Barbosa et al. (1991) em seu trabalho realizado com pessegueiros e nectarineiras subtropicais obtiveram os melhores resultados de germinação em meios com baixa concentração açúcar.

O boro é um micronutriente que desempenha um importante papel na germinação e crescimento do tubo polínico. Possui a propriedade de interagir com as moléculas de sacarose presentes no meio de cultura, aumentando a eficiência de absorção desse composto pelos grãos de pólen, favorecendo o crescimento do tubo polínico (DANTAS et al., 2005).

Brewbaker e Kwack (1963) trabalhando com germinação de pólen *in vitro* de 86 espécies distribuídas em 39 famílias de angiospermas constataram que o cálcio e o boro têm um papel fundamental no início da germinação do tubo polínico.

O nitrato de cálcio utilizado no meio de cultura tem por finalidade diminuir a sensibilidade dos grãos de pólen e do tubo polínico as alterações no meio básico, sua principal função é contribuir para a resistência e crescimento linear do tubo polínico com diminuição de sua permeabilidade (BHOJWANI; BHATNAGAR, 1974).

Chagas et al. (2009), em seu estudo com *Prunus persica* (L.) e Barbosa et al. (1991), em seu trabalho com pessegueiros e nectarineiras, constataram que o requerimento desses micronutrientes na germinação de grãos *in vitro* variam de acordo com a espécie e da cultivar. Além disso, existe a necessidade do estabelecimento correto desses compostos dentro do meio de cultura, pois, seu excesso ou deficiência podem promover a não germinação ou rompimento dos grãos de pólen, levando a um falso resultado (RAMOS et al., 2008).

## 2.7 Autocompatibilidade e Autoincompatibilidade

A oliveira apresenta florada intensa, sendo responsável pela produção elevada em anos de alta carga. Entretanto a quantidade de flores que dá origem a frutos é pequena (CORDEIRO et al., 2004). Griggs et al. (1975) sugerem que em anos de alta carga, apenas 1% das flores já é o suficiente para que ocorra boa produção.

O vingamento das flores em fruto é o resultado dos processos vegetativos, como o crescimento de ramos e reprodutivo, e da indução floral, que ocorrem durante o ciclo bienal. Cada fruto é consequência do processo evolutivo de uma flor e seu número depende diretamente da quantidade e qualidade das flores.

O sucesso da reprodução sexuada nas plantas depende da interação altamente específica entre o pólen e o pistilo, o gametófito masculino e o órgão reprodutor feminino, respectivamente (KNOX, 1984).

O nível de floração influencia a porcentagem de flores perfeita e imperfeitas, existindo um efeito compensatório na qualidade da flor, que é maior nos anos com intensidade de floração baixa (CUEVAS; RALLO 1990). Em estudos conduzidos por Rosa (2003) foram registradas em oliveiras adultas da cultivar Blanqueta de Elvas, uma quantidade de flores perfeitas superior a 90%.

Estudos de campo apresentam uma grande variabilidade de resultados devido à dificuldade em controlar as condições ambientais, a queda de flores no período pós-antese e a porcentagem de flores imperfeitas que, nesta espécie, é variável de um ano para o outro (LAVEE, 2007).

A produção final de frutos de oliveira é determinada num curto e intenso período de abscisão de flores que ocorre durante 5 a 7 semanas após a plena florada (LAVEE, 2007).

A oliveira apresenta um mecanismo de esterilidade fisiológica que se caracteriza pela não formação de zigotos como obstáculos fisiológicos que impedem a fecundação, apesar da existência de pólen e óvulos funcionais. Esse mecanismo conhecido como incompatibilidade ocorre no sentido de garantir que não ocorra a autopolinização e assim garantir a variabilidade genética da espécie (CORDEIRO et al., 2011).

A incapacidade de a planta formar sementes viáveis pode ser total ou parcial (CUEVAS, 1992). Cordeiro et al. (2004) observaram em estudos sobre vingamento conduzidos *in vivo* em autopolinização comparativamente à polinização livre, menor quantidade de grãos de pólen no estigma de flores de algumas cultivares de oliveira e do número de tubos polínicos em desenvolvimento no estilete.

## **2.8 Indução floral e aplicação de fitorreguladores**

A utilização de triazóis, retardantes de crescimento, antagonistas da síntese de giberelinas na indução de florescimento em plantas, tem despertado grande interesse. Os triazóis destacam-se como o principal grupo de compostos desenvolvidos para o controle de fungos e por apresentarem propriedades reguladoras do crescimento vegetal. Dos vários triazóis existentes, o paclobutrazol (PBZ) é um dos produtos mais efetivos na redução do crescimento de plantas angiospermas (FLETCHER et al., 2000).

A aplicação de PBZ em cultivares de oliveira Bladi e Mission com três anos, aumentou o conteúdo de água e o teor de prolina nas folhas, que indica a aclimação da espécie ao estresse hídrico (YAZDANI; ARZANI; ARJI, 2007).

Em outras espécies frutíferas, os resultados obtidos tem demonstrado aumento da produtividade em função do aumento de número de flores por planta quando tratadas com PBZ, como em lima Persa (DELGADO et al., 1995), em

Kunquate ‘Meiwa’ (IWAHORI; TOMINAGA, 1986), e mangueira (ALBUQUERQUE et al., 2007; BARROS, 1996; SANTANA et al., 1997).

Ferrari e Sergent (1996), em estudos conduzidos com plantas de mangueira ‘Haden’ constataram que a aplicação do PBZ reduziu o crescimento vegetativo e antecipou sua floração. Além disso, incrementou o número e o peso total dos frutos por planta.

Há evidências de que o PBZ atua também em outras características das plantas. Em plantas cítricas, estudos conduzidos por Okuda et al. (1996) observaram redução no número de folhas das brotações e estudos conduzidos por Delgado et al., (1995) observaram aumento nos teores de clorofila da folhas.

Em geral, no uso de produtos inibidores da biossíntese da giberelina, o paclobutrazol é o que tem proporcionado aumento na produtividade de várias espécies lenhosas e culturas herbáceas, a exemplo do morangueiro (DEYTON et al. 1991; NISHIZAWA, 1993) e da mangueira (FERRARI; SERGENT, 1996).

## **2.9 Modificações anatômicas e fisiológicas em plantas**

O paclobutrazol tem como principal função a inibição do crescimento vegetativo das plantas, atuando na restrição da biossíntese da giberelina. O objetivo esperado com a aplicação desse produto é uma redução do crescimento vegetativo e também uma promoção do amadurecimento dos ramos, possibilitando no final, uma maior disponibilidade de assimilados pela planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Como na maioria dos triazóis, o PBZ se desloca principalmente via xilema, orientado pela corrente de transpiração, o que justifica sua maior eficiência quando aplicado via solo. Como os meristemas apicais não são diretamente conectados com o sistema vascular, o mecanismo de transporte do PBZ para esses tecidos meristemáticos não é completamente elucidado, sendo

que as principais possibilidades levantadas são a inibição da biossíntese de giberelinas ainda nas raízes, transporte do PBZ via xilema / floema / simplasto e/ou outro sinal ligado diretamente ao meristema (BANGERTH, 2006).

Além de sua função como redutor de crescimento vegetal, pode promover o aumento do número de flores perfeitas em plantas andromonoicas incremento do tamanho do fruto. Pode ainda, ocasionar o maior desenvolvimento ou inibição do sistema radicular, dependendo da espécie e da sua concentração e promover modificações na anatomia foliar, como por exemplo, o espessamento da cutícula e/ou maior peso por unidade de área (VIVANCO; FLORES, 2000).

O efeito da aplicação de triazóis sobre plantas tem sido relatado por diversos autores. Sreethar (1991) relataram grandes variações na estrutura estomática e funcional. Zhou et al. (1993) e Sopher et al. (1999) observaram um aumento na espessura do parênquima paliçádico de folhas. Ye et al. (1995) e Fletcher et al. (2000) relataram mudanças hormonais. Panneerselvam et al. (1997) relataram mudanças na taxa fotossintética e Muthukumarasamy e Panneerselvam (1997) relataram mudanças na atividade enzimática. Muthukumarasamy et al. (2000) relataram o efeito sobre o estresse salino e Feng et al. (2003) relataram seu efeito protetor sobre efeito do frio nas plantas.

São poucas as informações disponíveis sobre o efeito de triazóis como o PBZ na anatomia foliar.

## **2.10 Ensaio de adaptação e melhoramento genético**

Os ensaios de comparação de cultivares tem como objetivo determinar os genótipos mais adequados para uma determinada região. A expansão de cultivares de oliveira fora de sua região de origem tem ocorrido sem que haja

trabalhos precedentes que certifiquem sua adaptação às regiões em que estão sendo introduzidas (RALLO, 2005).

No entanto, nos últimos anos, o trabalho com experimentos varietais tem surgido como uma via direta, rápida e segura para buscar alternativas para introdução ou substituição de cultivares tradicionalmente cultivada em uma região ou em áreas com potencial de produção (CABALLERO et al., 2005).

Nos últimos anos, os pesquisadores tem-se preocupado com o melhoramento genético da oliveira, o que até então foi realizado de maneira empírica, selecionando-se aquelas cultivares mais adaptadas para uma determinada região, quase sempre obtidas em populações oriundas de cruzamentos espontâneos entre as cultivares mais plantadas. Esse procedimento resultou em muitas cultivares com características específicas para determinada região estudada (LAVEE et al., 1999; RALLO, 1995).

No entanto, apesar do grande número de cultivares selecionadas após a domesticação da espécie, muitas alterações ocorreram, desde importantes métodos de cultivo, até sua migração para diferentes regiões do globo, o que evidenciou a necessidade de adaptação de mais cultivares para essa nova realidade agrícola (RALLO, 1995).

Dentre as ferramentas disponíveis para o aumento da produtividade, o melhoramento genético constitui um instrumento de pesquisa que deve ser explorado, com a introdução de novos genomas, para ampliação da base genética. Posteriormente, a condução de programas de melhoramento para a cultura deve ser realizada a fim de obter uma população com suficiente variabilidade, para que se realize a seleção de plantas (ESPRAZZATO, 2008; SERRANO, 1990).

A EPAMIG tem sido pioneira entre as instituições de pesquisa agrícola nacionais no que se refere a estudos com o cultivo da oliveira, realizando experimentação para esta frutífera desde a década de 80, em sua Fazenda

Experimental no município de Maria da Fé, sul de Minas Gerais. Inicialmente, devido à elevada altitude e ao clima local, observou-se que a olivicultura poderia ser viável na região. Posteriormente foi verificada variabilidade genética suficiente na cultura que permitisse sua adaptação a diferentes regiões edafoclimáticas do estado (OLIVEIRA et al., 2009).

### **2.11 Avanços na olivicultura em Minas Gerais**

A oliveira é uma planta de clima mediterrâneo que necessita de baixas temperaturas no período que antecede a floração para ocorrência de produções satisfatórias. Temperaturas médias de inverno variando entre 8 e 10 °C, não ultrapassando 21 °C, altitudes variáveis (200 a 1.300 m) e regime de chuvas superior a 800 mm anuais são suficientes para produções econômicas (ARAYA, 2008).

Embora as condições de temperatura e de incidência de chuvas observadas em microrregiões de Minas Gerais não apresentem as características do clima mediterrâneo, considerado o mais apropriado ao cultivo desta planta, no sul de Minas Gerais, a ocorrência de baixas temperaturas é suficiente para quebra de sua dormência, tendo sido observada produção de azeitonas.

Os primeiros exemplares de oliveira foram introduzidos no município de Maria da Fé, em 1935, por agricultores descendentes de portugueses e 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 (fazendas, residências, institutos de pesquisa, praças públicas etc.).

Dando sequência a este trabalho, foram importadas sementes de cultivares de oliveira de diferentes países para aumentar a base genética dos Bancos de germoplasma da empresa, aumentando assim, a variabilidade



genética e verificar quais acessos teriam uma melhor adaptação as nossas condições edafoclimáticas. Recentemente, pesquisas realizadas por Val (2011), identificaram por meio da técnica de marcadores microssatélites GAPU 101, GAPU 71B, UDO99-039, UDO99-031, GAPU 89 e GAPU 59, 60 acessos de oliveira mantidos nos Bancos de Germoplasma da EPAMIG, os quais podem ser utilizados para programas de melhoramento, pois indicam a existência de uma substancial variabilidade genética.

Em 2008 foram registrados pela EPAMIG, 33 cultivares de oliveira no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Em janeiro de 2009, foi protocolado pedido de proteção de quatro cultivares junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares - SNPC, sendo esses registros efetivados em 2010. Dando continuidade nesse trabalho, em 2011 foi solicitado o pedido de proteção de mais quatro cultivares sendo efetivados no ano de 2012. Trata-se de evento inédito no Brasil, já que não existia ainda nenhuma cultivar protegida desta espécie.

Na vanguarda das pesquisas com a cultura da oliveira, a EPAMIG também foi responsável pelo primeiro azeite extraído no Brasil, utilizando o processo de prensagem e posterior decantação, separando o azeite por diferença de densidade.

Os resultados indicaram que o produto obtido possui qualidade comparável com os azeites produzidos em regiões tradicionais, podendo ser classificado como azeite de oliva extra virgem.

Consolidando um esforço de pesquisa, e fechando um ciclo de informações tecnológicas sobre o tema, a EPAMIG hoje conta em sua Fazenda Experimental, em Maria da Fé, equipamentos modernos e eficientes para extração de azeite de qualidade disponíveis para uso de produtores e parceiros interessados. No ano de 2011 foram extraído nesses equipamentos um volume de 500 litros de azeite. Em 2012 esse volume subiu para 3,2 mil litros e em 2013

para 5 mil litros. No ano de 2014 com a instalação de outra unidade de extração na região, estima-se uma produção de aproximadamente 10 mil litros de azeite, sendo que 50% de volume foram extraídos na Fazenda Experimental da Epamig, em Maria da Fé.

Os desafios para tornar o cultivo de oliveiras uma opção a mais para o agronegócio brasileiro, englobam investimentos em pesquisa científica, criatividade, disposição e interesse dos pesquisadores das diferentes instituições de pesquisa do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ALBA, V. et al. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 11-16, 2009.
- ALBUQUERQUE, J. A. S. et al. Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 292, n. 1/2, p. 1-12, 2007.
- ALVES, E. M. et al. Influência de abelhas africanas na concentração de açúcares no néctar de soja (*Glycine max* L. Merrill) var. Codetec 207. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 198-195, 2010.
- ARAYA, A. H. Desenvolvimento produtivo. **Olint**, Sant Sadurni d'Anoia, v. 1, n. 4, p. 12-15, 2008.
- BANGERTH, F. Flower induction in perennial fruit trees: still an enigma? **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 727, p. 177-196, 2006.
- BARBOSA, W. et al. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiros e nectarineiras subtropicais. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 17-28, 1991.
- BARRANCO, D. et al. **Catálogo mundial de variedades de olivo**. Madrid: Consejo Oleícola Internacional, 2000. 360 p.
- BARROS, P. G. Efeito do nitrato de potássio na floração e frutificação de mangueira cv. Tommy Atkins no sudeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p. 188-194, ago. 1996.
- BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.
- BOLAT, Y.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, v. 23, n. 4, p. 383-388, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 1**, de 30 de janeiro de 2012. Estabelecer o Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva na forma da presente Instrução Normativa e os limites de tolerância constantes dos seus Anexos I, II, III e IV. Disponível em: < <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 05 mar. 2014.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

CABALLERO, J. M. et al. Ensayos comparativos de variedades. In: RALLO, L. et al. (Ed.). **Variedades de olivo en España**. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía; Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2005. p. 385-394.

CHAGAS, E. A. et al. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) *Batsch* *Vulgaris*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14, 2009.

CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 261-266, 2010.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL - COI. **Cifras aceite de oliva**. 2014. Disponível em: < [http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es\\_ES](http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES)>. Acesso em: 08 maio 2014.

CORDEIRO, A. M. et al. Incompatibilidade pólen/pistilo em variedades de oliveira (*Olea europaea* L.). **Melhoramento**, Lisboa, n. 39, p. 114-121, 2004.

CORDEIRO, A. M. et al. Caracterização do vingamento da azeitona em cultivares de oliveira em autopolinização. **Actas Portuguesas de Horticultura**, Santarém, v. 14, p. 23-30, 2011.

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. 5, p. 120-157.

CUEVAS, J.; RALLO, L. Response to cross-pollination in olive with different levels of flowering. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 286, p. 179-182, 1990.

CUEVAS, J. **Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y frutificación de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.)**. 1992. 132 f. Tese (Doctoral em Ciências Biológicas) - Universidad de Córdoba, Córdoba, 1992.

DANTAS, A. C. M. et al. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 356-359, dez. 2005.

DEL-RÍO, C.; CABALLERO, J. M. **Caracterización agronômica preliminar de las variedades introducidas em El Banco de Germoplasma de Olivo de Córdoba em 1987**. Córdoba: Fruticultura Profesional, 1999. 15 p.

DELGADO, R.; RODRIGUEZ, R.; CASAMAYOR, R. Empleo de paclobutrazol em plantas de lima persa sobre naranjo trifoliado 'Rubdoux' a altas densidades. **Agrícola Vergel**, Buenos Aires, v. 179, n. 3, p. 121-125, 1995.

DEYTON, D. E.; SAMS, C. E.; CUMMINS, J. C. Strawberry growth and photosynthetic responses to paclobutrazol. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 9, p. 1178-1180, 1991.

ESPRAZZATO, C. A. **Apuntes de olivicultura**. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo, 2008. 152 p.

FENG, Z.; GUO, A.; FENG, Z. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. **Plant Growth Regul**, Dordrecht, v. 30, p. 277-283, 2003.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. et al. The time of floral induction in the olive. **Journal of the America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 2, p. 303-304, 1992.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Técnicas culturales para el control de la frutificación en el olivo. **Olivae**, Madrid, v. 46, n. 1, p. 38-41, 1993.

FERRARI, F. D.; SERGENT, E. A. Promocion de la floración y frutificación del mango cv. Haden, com Paclobutrazol. **Revista Faculdade de Agronomia**, Maracay, v. 22, n. 1/2, p. 1-8, 1996.

FLETCHER, R. A. et al. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, New York, v. 24, n. 4, p. 55-138, 2000.

GOBBATO, C. **Cultura da oliveira e noções sobre a industrialização das azeitonas**. Porto Alegre: UFRGS, 1945. 118 p.

GRIGGS, W. H. et al. **Olive pollination in Califórnia**. Califórnia Agriculture Experimental Station Bulletin, v. 869, p. 1-10, 1975.

HALEVY, A. H. Recent advances in control of flowering in horticultural crops. **Advances in Horticultural Science**, London, v. 37, n. 1, p. 39-43, 1990.

HUANG, Z. et al. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, n. 3, p.295-30, Mar. 2004.

INTERNATIONAL TRADE MAP. **List of products imported by Brazil:** detaled products in the following category: 150910 Olive oil, virgen. 2014. Disponível em: <[http://www.trademap.org/Product\\_SelCountry\\_TS.aspx](http://www.trademap.org/Product_SelCountry_TS.aspx)>. Acesso em: 08 maio 2014.

IWAHORI, S.; TOMINAGA, S. Increase in first-flush flowering of 'Meiwa' kunquat, *Fortunella crassifolia* Swingle, trees by paclobutrazol. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 347-353, 1986.

KNOX, R. B. Pollen-pistil interactions. In: **Celular Interactions**. Encycl. Pl. Physio. HESLOP-HARRISON, J; LINSKENS, H. F. (ed). Berlin: Sprinfer, v. 17, p. 508-609, 1984.

LAVEE, S. Biennial bearing in olive (*Olea europaea* L.). **Annales Serie. Historia Naturale**, Abidjan, v. 17, n. 1, p. 101-112, 2007.

LAVEE, S. Biennial bearing in olive (*Olea europaea* L.). **Annales Ser. Hist. Nat.**, v. 17, n. 1, p. 101-112, 2007.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. Polinização. In: **Frutas do Brasil:** pêra produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 23-28.

LOUSSERT, R.; BROUSSE, G. **El olivo**. Madrid: Mundi, 1980. 533 p.

MUTHUKUMARASAMY, M.; PANNEERSELVAM, R. Amelioration of NaCl stress by triadimefon in peanut seedlings. **Plant Growth Regul**, Dordrecht, v. 22, p. 157-162, 1997.

MUTHUKUMARASAMY, M.; DUTTA GUPTA, S.; PANNEERSELVAM, R. Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. **Biology Plant**, Oxon, v. 43, p. 317-320, 2000.

NISHIZAWA, T. Growth and yeild during the first year growing period as affected by paclobutrazol on greenhouse strawberry production. **Acta Horticulturae**, Hague, v. 329, n. 72, p. 51-53, 1993.

OKUDA, H.; KIHARA, T.; IWAGAKI, I. Effects of paclobutrazol application to soil at the begining of maturation on sprouting, shoot growth, flowering and carbohidrate contents in roots and leaves of Satsuma mandarine. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 71, n. 1, p. 785-789, 1996.

OLIVEIRA, A. F. et al. Pioneirismo marca pesquisa sobre oliveira em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 257, p. 109-117, 2009.

PANNEERSELVAM, R.; MUTHUKUMARASAMY M.; KARIKALAN, L. Triadimefon enhances growth and net photosynthetic rate in NaCl stressed plants of *Raphanus sativus* L. **Photosynthetica**, Prague, v. 34, p. 605-609, 1997.

PLINE, W. A. at al. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2193-2200, 2002.

PIO, L. A. S. et al. Germinação in vitro de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.293-296, 2004.

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.

RALLO. Selección y mejora genética del olivo en España. **Olivae**, Madrid, v. 59, n. 1, p. 46-53, 1995.

RALLO, L. Variedades de olivo en España: una aproximación cronológica. In: RALLO, L. et al. (Ed.). **Variedades de olivo en España**. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía; Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2005. p. 17-44.

RAMOS, J. D. et al. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2008.

RAPOPORT, H. F. Botánica y morfología. 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. 35-60.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v. 12, n. 4, p. 241-244, 2000.

ROSA, M.M. **Efeito da fertilização adotada na qualidade da flor e no vingamento da azeitona 'Blanqueta de Elvas'**. 79 p. Relatório (Trabalho de fim de curso - Engenharia Agronómica) - Universidade Técnica de Lisboa/Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2003.

SANTANA, J. R. F. et al. Efeito de indutores florais sobre o florescimento, frutificação e rendimento das cvs. de manga Van Dyke, Haden e Tommy Atkins no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 159-167, 1997.

SERRANO, J. M. F. La selección clonal en la moderna oleicultura. **Olivae**, Madrid, v. 31, n. 1, p. 34-37, 1990.

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

SOPHER, R. C. Chloroplastic changes associated with paclobutrazol induced stress protection in maize seedling. **Can J Bot**, v. 77, p. 1-12, 1999.

SREETHAR, V. M. Proline accumulation and reduced transpiration in the leaves of triazole treated mulberry plant. **Indian Bot Report**, v. 101, p. 1-5, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Crescimento e desenvolvimento. In: ROMANATO, E. et. al. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 335-643.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant Grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.

UBOLDI, A. **Tratado de olivicultura y extracción del aceite**. Buenos Aires: Suelo Argentino, 1945. 379 p.



VAL, A. D. B. **Caracterização genética de oliveira utilizando marcadores moleculares**. 2011. 100 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VIEIRA NETO, J.; SILVA, L. F. O.; DAL'COL, A. L.; OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA, M. C. Formulações comerciais de fertilizantes foliares na finalização de mudas de variedades de oliveira. **Ciência Agronômica**, v. 1, n. 42, p. 125-131, 2011.

VIVANCO, J. M.; FLORES, H. E. Control of root formation by plant growth regulators. In: BASRA, A. S. **Plant growth regulators in agriculture and horticulture: their role and commercial uses**. London: Haworth Press, 2000. cap. 1, p. 1-25.

XIE, S. et al. Pollen viability of Asian pear and effect of PGR, B and sucrose on germination and pollen tube development. **Journal of Fruit Science**, Ontario, v. 21, n. 4, p. 289-294, 2004.

YAZDANI, N.; ARZANI, K.; ARJI, I. Alleviation of drought stress through application of Paclobutrazol on olive (*Olea europaea* L.) trees, cultivars 'Bladi' and 'Mission'. **Iranian Journal of Agricultural Sciences**, New York, v. 38, n. 2, p. 287-296, 2007.

YE, Q. F.; ZHOU, W.J.; XI, W.F.; FANG, J.Y. Effect of S-3307 on levels of endogenous (IAA, ABA and ZT) and some physiological of rape seedlings. **Acta Agri Zhejiang**, v. 7, p. 451-456, 1995.

ZHOU, W.J. et al. Studies on the regulation mechanism of paclobutrazol to the growth of rape plant. **Acta Agric. Zhejiang**, v. 19, p. 316-320, 1993.

**ARTIGO 1 - ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA E  
QUANTIFICAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE  
CULTIVARES DE OLIVEIRA**

Preparado de acordo com a Revista Fruits - Versão Preliminar

Luiz Fernando de Oliveira da Silva<sup>I</sup>, Carolina Ruiz Zambon<sup>II</sup>, Rafael Pio<sup>I\*</sup>,  
Adelson Francisco de Oliveira<sup>III</sup>, Emerson Dias Gonçalves<sup>III</sup>

<sup>I</sup> Eng. Agr. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Dep. de Agricultura, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG. luizfernando.agronomia@gmail.com; rafaelpio@hotmail.com

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

<sup>III</sup> Eng. Agr. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Caixa Postal 3037, 37200-000. adelson@epamig.ufla.br; emerson@epamig.br

\* Autor para correspondência.

**RESUMO:** Visando dar suporte aos programas de melhoramento genético da oliveira voltado para a seleção de cultivares adaptadas para regiões subtropicais, objetivou-se com este trabalho ajustar o meio de cultura básico para a germinação de grãos de pólen, determinar a capacidade polínica germinativa e quantificar o número de grãos de pólen por flor de diferentes cultivares dessa espécie. Para determinação do meio de cultura, foram utilizados grãos de pólen da cultivar Arbequina espalhados sobre a superfície de placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura de acordo com as seguintes etapas: 1) concentrações de ágar (4, 6, 8 e 10 g.L<sup>-1</sup>) e ácido bórico (0, 400, 800 e 1200 mg.L<sup>-1</sup>); 2) valores de pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) e concentrações de sacarose (0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup>); 3) concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg.L<sup>-1</sup>) e sulfato de magnésio (0; 0,5; 1 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>); 4) temperatura de incubação dos grãos de pólen (24, 26, 28, 30 e 32 °C) e 5) tempo de emissão do tubo polínico (0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a inoculação). Em todas as etapas foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Após a determinação do meio de cultura básico avaliou-se a taxa de germinação dos grãos de pólen das cultivares de oliveira. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 28 tratamentos, com quatro repetições. Em seguida foi avaliado o número de grãos de pólen por flor das 28 cultivares de oliveira, sendo utilizado para esta etapa o delineamento experimental

inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada parcela experimental composta por um Eppendorf constituída por quatro leituras na lâmina de Neubauer. O meio de cultura para a germinação de grãos de pólen de oliveira deve ser 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 temperatura de 28 °C. A cultivar Manzanilla 215 apresentou maior germinação e a cultivar Ascolano 315 apresentou maior quantidade de grãos de pólen por flor.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L., taxa de germinação, vingamento de frutos, melhoramento genético.

## **ESTABLISHMENT OF GROWTH MEDIUM AND QUANTIFICATION OF GERMINATION POLLEN GRAINS OF OLIVE TREE CULTIVARS**

**ABSTRACT:** To support efforts to breed olive trees for the selection of cultivars adapted to subtropical regions, this work aimed to optimise the culture medium for the germination of pollen grains, to determine the pollen germination capacity and to quantify the number of pollen grains per flower of different cultivars of olive tree. To determine the optimal culture médium, pollen of ‘Arbequina’ were scattered over the surface of Petri dishes containing 20 mL of culture media with the following variations: 1) agar concentrations (4, 6, 8 and 10 g.L<sup>-1</sup>) and boric acid (0, 400, 800 and 1200 mg.L<sup>-1</sup>); 2) pH values ( 3.5, 4.5, 5.5 and 6.5) and sucrose concentrations (0, 30, 60 and 90 g.L<sup>-1</sup>); 3) concentrations of calcium nitrate (0, 200, 400 and 800 mg.L<sup>-1</sup>) and magnesium sulphate (0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L<sup>-1</sup>); 4) temperature (24, 26, 28, 30 and 32 °C); and 5) the pollen tube emission time (0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours after inoculation). At all stages, a completely randomised design with four replications was utilised. After determining the culture medium, the rate of germination of pollen grains of olive cultivars was evaluated. A completely randomised design with 28 treatments with four replicates was used. Subsequently, the number of pollen grains per flower of the 28 olive cultivars was evaluated; a completely randomised design with five replications was used for this step, and each plot consisted of an Eppendorf tube measured by four readings on a Neubauer slide. It was determined that the culture medium should be composed of 4 g.L<sup>-1</sup> agar, 90 g.L<sup>-1</sup> sucrose and 400 mg.L<sup>-1</sup> boric acid, and the pH should be adjusted to 5.79, and incubation for 60 hours at 28 °C. ‘Manzanilla 215’ showed the highest germination and ‘Ascolano 315’ presented the highest number of pollen grains per flower.

**Key-works:** *Olea europaea* L., germination rate, fruits setting, breeding programs.

## INTRODUÇÃO

A olivicultura é uma das principais atividades econômicas da região Mediterrânea, especialmente ao sul. A Espanha produz cerca de 33% de toda azeitona e azeite consumido no mundo, sendo a região de Andaluzia responsável por cerca de 80% da produção espanhola (GALÁN et al., 2005).

Na América do Sul, a Argentina e o Chile são os principais produtores e exportadores de azeitona e azeite, com 100 mil e 10 mil hectares plantados, respectivamente (SILVA et al., 2012a). No Brasil a atividade está em expansão, tendo plantios já estabelecidos nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (700 mil plantas, 2 mil hectares), além de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (500 mil plantas, 1 mil hectares), sendo observado um crescimento médio em torno de 20% ao ano<sup>3</sup>.

Porém, a olivicultura no Brasil, não se tornou uma alternativa econômica viável para os produtores, devido à baixa adaptação climática das cultivares introduzidas e a sua potencialidade econômica de extração e comercialização do azeite produzido (SILVA et al., 2012a). Algumas cultivares vem demonstrando boa adaptação às condições subtropicais, porém há necessidade de se incrementar trabalhos de melhoramento genético visando a seleção de indivíduos mais produtivos para essas regiões, tendo em vista produção de frutos com alto rendimento agroindustrial (SILVA et al., 2012b).

O conhecimento das características florais dos germoplasmas disponíveis é de grande importância para a seleção dos progenitores a serem utilizados nas hibridações, como a viabilidade e a capacidade germinativa dos grãos de pólen. A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores

---

<sup>3</sup> Comunicação pessoal - Nilton Caetano de Oliveira

coletados a campo é condição preliminar indispensável para os cruzamentos (CHAGAS et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2013).

Existe uma relação entre a porcentagem de germinação e viabilidade do pólen. Sabe-se que o meio de cultura deve possuir um agente gelificante, composto por carboidratos e elementos estimulantes como o ácido bórico e nitrato de cálcio. O pH do meio de cultura também influencia a germinação e a viabilidade dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008). Fatores como a temperatura e tempo de incubação também são importantes para se determinar uma boa germinação dos grãos de pólen e desenvolvimento do tubo polínico (CHAGAS et al., 2010).

Um fator a ser considerado é a autocompatibilidade ou autoincompatibilidade das diferentes cultivares de oliveira. Investigações com as cultivares Ascolano, Manzanillo e Sevillano mostraram que as chances de fecundação e frutificação foram muito maiores com a polinização cruzada do que após autopolinização (BRADLEY et al., 1961). Existe grande possibilidade dos pomares permanecerem improdutivos ou pouco produtivos quando implantado com uma única cultivar (BESNARD et al., 2001). Nesse caso, a determinação de cultivares que possuem grandes quantidades de grãos de pólen e com alta taxa de germinação é de fundamental importância na seleção de indivíduos polinizadores ou até mesmo no plantio intercalado de duas ou mais cultivares comerciais.

Objetivou-se com o presente trabalho determinar os componentes básicos do meio de cultura, identificar o tempo e a temperatura de incubação, capacidade germinativa e número de grãos de pólen por flor de diferentes cultivares de oliveira.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Epamig em Maria da Fé, sul de Minas Gerais, Brasil, a 22° 18' 51" de latitude Sul, 45° 23' 24" de longitude Oeste e altitude média de 1.276 metros. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é mesotérmico de inverno seco (Cwb), com temperatura média de 17 °C e precipitação em torno de 1.739 mm anuais. O solo é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico (SOUZA et al., 2013).

Para a determinação da composição do meio de cultura visando à maximização da germinação dos grãos de pólen da oliveira, foi utilizada a cultivar Arbequina, devido ao seu florescimento precoce em relação às demais. Os experimentos foram realizados de maneira sequencial, sempre utilizando o melhor resultado do experimento anterior para a montagem do tratamento subsequente.

Foram retiradas as anteras de 10 botões florais em pleno desenvolvimento no estágio 65 - BBCH Scale, o que representa 80% das flores abertas (SANZ-CORTÉS et al., 2002) coletadas no final da tarde, utilizando-se de uma pinça. As anteras foram armazenadas em placas de Petri destampadas à temperatura controlada (27 °C) em estufa de secagem por 12 horas na ausência de luz, para que ocorresse a antese, completa deiscência e liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008).

Após a liberação dos grãos de pólen, foram montados cinco experimentos para determinação dos componentes do meio de cultura: 1) ágar (4; 6; 8 e 10 g L<sup>-1</sup>) e ácido bórico (0; 400; 800 e 1.200 mg L<sup>-1</sup>); 2) pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) e sacarose (0; 30; 60 e 90 g L<sup>-1</sup>); 3) nitrato de cálcio (0; 200; 400 e 800 mg L<sup>-1</sup>) e sulfato de magnésio (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>), 4) tempo de emissão do tubo polínico (0; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 horas após a inoculação) e; 5)

temperatura de incubação dos grãos de pólen (24; 26; 28; 30 e 32 °C), sendo estes instalados em câmara de germinação tipo B.O.D.

Para cada etapa os pólenes foram inoculados, com o auxílio de um pincel, na superfície da placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura, procurando uniformizar sua distribuição ao longo da superfície do meio. Posteriormente, as placas de Petri foram tampadas e mantidas na ausência de luz por 72 horas e contados os grãos de pólen germinados e não germinados com auxílio de um microscópio com objetiva de 10x, sendo considerado germinado o grão de pólen cujo comprimento do tubo polínico excedeu o dobro do próprio diâmetro (CHAGAS et al., 2010). Estes experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição foi constituída por cinco campos de visão.

Determinado os componentes do meio de cultura, tempo e temperatura de emissão do tubo polínico, foi estabelecido um novo experimento de germinação *in vitro* com os grãos de pólen de 28 cultivares de oliveira (tratamentos): Alto D'Ouro, Arbequina, Arbosana, Ascolano 315 (MGS ASC315), Ascolano USA, Cerignola, Clone 113 (MGS NEBLINA), Clone 0025, Cornicabra, Galega, Grappolo 541 (MGS GRAP541), Grappolo 553, Grappolo 561 (MGS GRAP561), Grappolo 575, JB1, Koroneiki, Manzanilla 215, Manzanilla 234, Maria da Fé (MGS MARIENSE), Mission, Negroa, Penafiel SP, Pindolino, Salomé 488, Santa Catalina, Tafahi 390, Tahafi 391 e Zalmate 002. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição foi constituída por cinco campos de visão.

Para o experimento de contagem do número de grãos de pólen por flor, foi coletado aleatoriamente cinco botões florais de cada cultivar (estádio 65 - BBCH Scale). Em seguida, cada par de anteras, desses botões, foi retirado e

armazenado separadamente em tubos Eppendorf destampados à temperatura controlada (27 °C) por 24 horas na ausência de luz, para ocorrência da deiscência e liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008).

Após 24 horas foi acrescentada aos tubos uma solução de 1.000 µL de ácido láctico e após 48 horas, uma amostra de 10 µL de cada Eppendorf foi colocada em uma lâmina de leitura (Neubauer), para a realização da contagem do número de grãos de pólen, com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100x. O delineamento experimental nessa etapa foi inteiramente casualizado, com 28 tratamentos (cultivares), com cinco repetições, sendo cada parcela experimental composta por um Eppendorf com duas anteras, sendo cada repetição constituída por quatro leituras na lâmina de Neubauer.

A quantidade de grãos de pólen por flor foi calculada multiplicando-se a média do número de grãos de pólen de cada amostra pelo volume do ácido láctico da solução (1.000 µl) e dividindo este valor pelo produto entre o volume de ácido láctico da amostra (10 µl) e o número de anteras de cada tubo (duas). Em seguida este valor foi multiplicado por dois (número de anteras que existem em cada flor de oliveira).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância sendo utilizada regressão para os dados quantitativos e teste de médias (Scott & Knott ou Tukey) para os dados qualitativos. As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre os fatores ágar e ácido bórico. Observou-se que a concentração de 4 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 400 mg.L<sup>-1</sup> de ácido bórico promoveu maior germinação dos grãos de pólen (28,94%) (Figura 1).

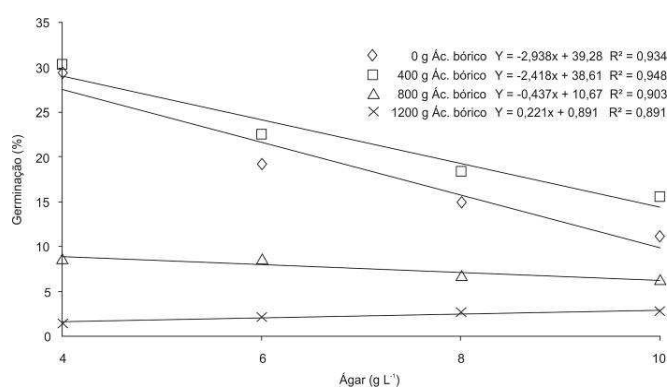


Figura 1 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de oliveira 'Arbequina'. Diferentes concentrações de Ágar e ácido bórico. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

O ágar tem como função a solidificação do meio de cultura, facilitar a incorporação dos nutrientes, proporcionar umidade relativa constante, além de promover o equilíbrio osmótico do meio, fornecendo assim, um ambiente propício para a emissão dos tubos polínicos (FERREIRA et al., 2007). Uma possível explicação para a maior porcentagem de germinação ter ocorrido na menor concentração de ágar (4 g.L<sup>-1</sup>) é que a menor quantidade desse agente solidificante possibilitou uma menor consistência do meio de cultura, favorecendo a absorção de água e nutrientes do meio para os grãos de pólen.

Já o ácido bórico apresenta função mais específica na formação e desenvolvimento do tubo polínico, podendo apresentar diferentes respostas dependendo da espécie. No presente estudo, a adição de 400 mg.L<sup>-1</sup> de ácido

bórico ao meio de cultura favoreceu a germinação dos grãos de pólen quando comparado aos resultados em sua ausência. Porém, quando a concentração de ácido bórico foi superior a  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , houve diminuição na porcentagem de germinação, fator provavelmente relacionado ao aumento gradual da concentração de soluto do meio o que acarretou rompimento e comprometimento da integridade das estruturas celulares dos grãos de pólen (DANTAS et al., 2005).

Como foi detectado que a presença do ácido bórico influenciou positivamente na germinação dos grãos de pólen das oliveiras, acredita-se que a pulverização foliar com esse elemento na florada possa aumentar a porcentagem de vingamento dos frutos. Mas como altas concentrações foram desfavoráveis para a germinação do pólen, maiores estudos são necessários para se quantificar a concentração ideal a ser utilizada a campo.

Em relação à sacarose e pH, houve interação significativa entre os fatores, sendo o melhor resultado encontrado quando adicionou-se  $90 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose ao meio e pH ajustado para 5,79 (75,88%) (Figura 2).

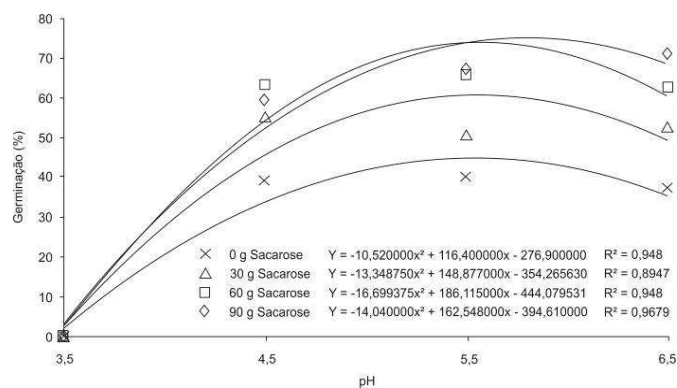


Figura 2 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de oliveira 'Arbequina'. Diferentes níveis de pH e concentrações de sacarose. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

A adição de sacarose como fonte de carboidratos visa suprir as necessidades metabólicas envolvidas no crescimento, agindo efetivamente na geração de energia ou como fonte de esqueletos de carbono para os processos biossintéticos da diferenciação celular (CHAGAS et al., 2010). Assim, a maior porcentagem de germinação com a elevação da concentração de sacarose pode ser justificada pela maior oferta de energia, na forma de carboidrato, favorecendo o crescimento do tubo polínico. Figueiredo et al. (2013) trabalhando com germinação de pólen de amoreira-preta, verificaram que as maiores taxas de germinação foram alcançadas com as maiores concentrações de sacarose adicionadas ao meio.

A elevação do pH proporcionou um aumento na porcentagem de germinação dos grãos de pólen. Entretanto, a partir do pH 5,79 houve decréscimo nos valores. Este fato pode estar relacionado com a maior ou menor disponibilidade dos componentes (nutrientes) e/ou desequilíbrio osmótico do meio de cultura.

A importância da determinação do pH ideal nos processos fisiológicos que envolvem os grãos de pólen está associada a maior porcentagem de germinação que estes possam oferecer, garantindo maiores chances de fertilização e, conseqüentemente, maiores frutificações e melhor índice de produção no campo (SALLES et al., 2006). Resultados semelhantes foram encontrados na germinação de grãos de pólen de diferentes cultivares de pessegueiro (pH 5,5) (CHAGAS et al., 2009) e pereira (pH 5,2 e 5,8) (CHAGAS et al., 2010).

No experimento com nitrato de cálcio e sulfato de magnésio, observou-se interação significativa entre os fatores. Entretanto a maior taxa de germinação dos grãos de pólen foi obtida na ausência de ambos os componentes (72,05%) (Figura 3). Resultados semelhantes foram observados para a germinação *in vitro*

de grãos de pólen de pereira ao utilizar nitrato de cálcio (CHAGAS et al., 2010) e pessegueiro (CHAGAS et al., 2009).

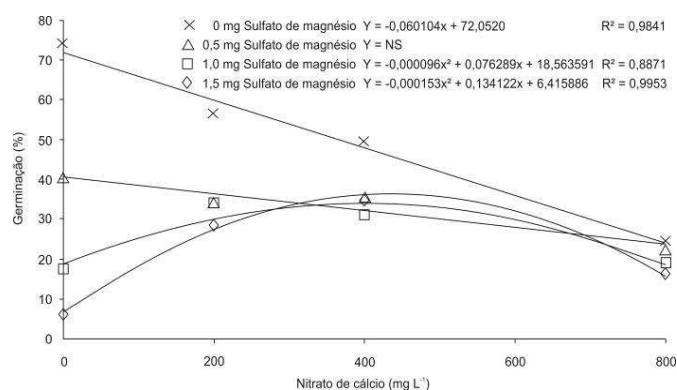


Figura 3 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de oliveira 'Arbequina'. Diferentes concentrações de nitrato de cálcio e sulfato de magnésio. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Dentre as temperaturas avaliadas, observou-se que a maior taxa de germinação dos grãos de pólen ocorreu quando submetidos a 28,21 °C (72,43%) (Figura 4). A temperatura em que o pólen é exposto, durante sua fase germinativa, é diretamente relacionada com o desenvolvimento do tubo polínico. Temperaturas muito baixas acarretam diminuição da atividade metabólica, impossibilitando a germinação, enquanto que, temperaturas muito elevadas acarretam degradação de proteínas e enzimas fundamentais para o desenvolvimento do tubo polínico.

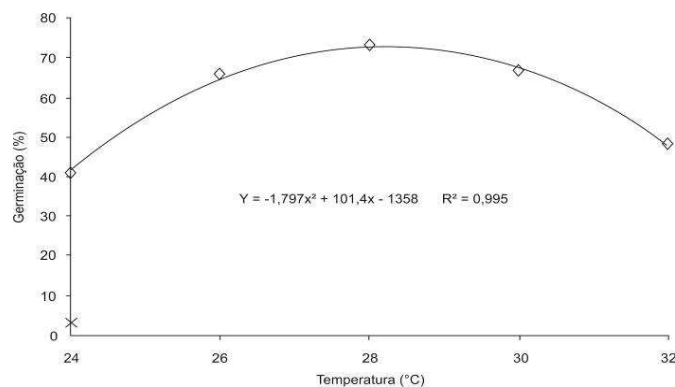


Figura 4 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de oliveira 'Arbequina'. Temperatura. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Esses resultados concordam com Chagas et al. (2010), que trabalhando com desenvolvimento de tubos polínicos de porta enxerto de pereira, observaram que até 28 °C houve favorecimento da germinação e que temperaturas mais elevadas acarretaram em diminuição dessa porcentagem.

Em condições de campo, uma correta temperatura ambiental é fundamental para que ocorra uma boa germinação dos grãos de pólen, desenvolvimento do tubo polínico, vingamento das flores e frutificação. Bradley et al. (1961) ao compararem duas temperaturas (15,6 e 32,2 °C) para germinação e desenvolvimento dos grãos de pólen de oliveira em condições de estufa verificaram que o crescimento do tubo polínico era mais rápido em temperaturas mais elevadas.

Em relação ao tempo de emissão do tubo polínico, verificou-se que 72 horas promoveu uma taxa de germinação de 73,89% (Figura 5). Vale ressaltar que embora o ponto máximo da curva tenha sido 95,36 horas, esse tempo proporcionou um pequeno aumento na taxa de germinação (incremento de 3,63%) não sendo observados ganhos significativos que justificassem a

permanência dos grãos de pólen, podendo acarretar outros problemas, tais como contaminação e um desequilíbrio do meio de cultura.

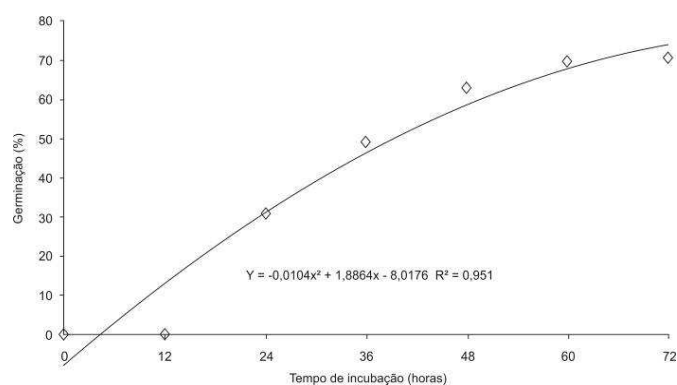


Figura 5 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de oliveira 'Arbequina'. Tempo de incubação. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Para avaliação da capacidade germinativa das diferentes cultivares avaliadas neste estudo, observou-se grande variabilidade na capacidade de germinação dos grãos de pólen (Tabela 1). O melhor resultado foi obtido pela cultivar Manzanilla 215 (81,56%) e resultados inferiores encontrados nas cultivares Penafiel SP, Alto D'Ouro e Mission (5,50%; 8,92% e 9,64% respectivamente).

Tabela 1 Germinação média e número de grãos de pólen por flor de diferentes cultivares de oliveira. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Cultivar	Germinação (%)	Número de grãos de pólen por flor
Alto D'Ouro	8,92 i	9.581,25 c
Arbequina	73,65 b	9.204,17 c
Arbosana	48,47 e	6.777,08 e
Ascolano 315 (MGS ASC315)	58,59 d	14.545,83 a
Ascolano USA	62,35 c	8.000,00 d
Cerignola	50,65 e	6.862,50 e
Clone 113 (MGS NEBLINA)	49,14 e	7.464,58 d
Clone 0025	29,95 g	10.529,17 c
Cornicabra	13,21 h	10.862,50 b
Galega	25,02 g	9.493,75 c
Grappolo 541 (MGS GRAP541)	57,35 d	10.418,75 c
Grappolo 553	64,64 c	8.206,25 d
Grappolo 561 (MGS GRAP 561)	27,02 g	9.641,67 c
Grappolo 575	52,05 e	6.304,17 e
JB1	32,41 f	11.389,58 b
Koroneiki	15,97 h	6.200,00 e
Manzanilla 215	81,56 a	8.427,08 d
Manzanilla 234	68,17 b	11.612,50 b
Maria da Fé (MGS MARIENSE)	16,16 h	5.667,67 e
Mission	9,64 i	10.018,75 c
Negroa	18,72 h	10.018,75 c
Penafiel SP	5,50 i	7.508,33 d
Pindolino	38,00 f	7.343,75 d
Salomé 488	36,31 f	6.881,25 e
Santa Catalina	68,17 b	8.089,58 d
Tafahi 390	70,50 b	11.262,50 b
Tafahi 391	62,61 c	6.912,50 e
Zalmate 002	24,76 g	11.697,92 b
CV (%)	12,35	20,36

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para o número de grãos de pólen por flor de cada cultivar avaliada, também houve grande variação (Tabela 2). A cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou maior quantidade de pólen por flor (5.818,33) e as cultivares Maria da Fé (MGS MARIENSE) (2.266,67), Koroneiki (2.480,00), Grappolo 575 (2.521,67), Arbosana (2710,83), Cerignola (2.745,00), Salomé 488 (2.752,50) e Tafahi 391 (2.765,00) obtiveram menores quantidades.

Cultivares com grande quantidade de grãos de pólen necessitam de menor número de flores para as hibridações a campo em trabalhos de melhoramento genético. Para cultivares que apresentam menor taxa de germinação e menor quantidade de grãos de pólen por flor, uma opção seria sua utilização como progenitoras femininas. Outra questão é que estas cultivares com baixa quantidade de grãos de pólen e/ou baixa capacidade germinativa necessitam de cultivares polinizadoras para que haja boa fecundação e frutificação, sendo que a germinação *in vitro* de grãos de pólen apresenta alta correlação com a fertilização no campo (FIGUEIREDO et al., 2013).

Existem cultivares de oliveira que são autoincompatíveis e produzem pouco ou nenhum fruto em pomares monovarietais. Nesse caso, a polinização cruzada favorece produções maiores e mais regulares. Embora a autoincompatibilidade seja uma característica importante para a produção da azeitona, o modo de herança dessa autoincompatibilidade é, ainda, desconhecido para esta espécie, sendo esta questão uma das principais preocupações para os olivicultores, bem como para os economistas, sendo um impasse para possíveis previsões do mercado (BRETON; BERVILLÉ, 2012).

Uma solução para este problema é adicionar cultivares polinizadoras. Historicamente, cada cultivar possui uma ou mais cultivares tradicionais compatíveis (polinizadoras). Entretanto, pesquisadores buscam constantemente encontrar cultivares mais eficientes do que as tradicionais (CUEVAS et al., 2001; MOUTIER et al., 2006).



## CONCLUSÕES

O meio de cultura para a germinação de grãos de pólen de oliveira deve ser 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.

A cultivar Manzanilla 215 apresentou maior germinação (81,56%) e a cultivar Ascolano 315 apresentou maior quantidade de grãos de pólen por flor (5.818,33).

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro na execução desse trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da colsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

BESNARD, G. et al. Cultivar identification in the olive (*Olea europaea* L.) based on RADs. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, p. 668-675, 2001.

BRADLEY, M. V.; GRIGGS, W. H.; HARTMANN, H. T. Studies on self- and cross- pollination of olives. **California Agriculture**, Berkeley, v. 15, n. 3, p. 4-5, 1961.

BRETON, C. M.; BERVILLÉ, A. New hypothesis elucidates self-incompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 335, p. 563-572, 2012.

CHAGAS, E. et al. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunuspersica* (L.) *Batsch vulgaris*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14, 2009.

CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 261-266, 2010.

CUEVAS, J. et al. Response to cross-pollination and choice of pollinators for the olive cultivars (*Olea europaea* L.) “Manzanilla de Sevilla”, “Hojiblanca” and “Picual”. **Olivae**, Madrid, v. 85, p. 26-32, 2001.

DANTAS, A. C. M. et al. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 356-359, 2005.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

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

FIGUEIREDO, M. A. et al. Características florais e carpométricas e germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p. 731-740, 2013.

GALÁN, C. et al. Heat requirement for the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in several sites in Andalusia and the effect of the expected future climate change. **International Journal of Biometeorology**, New York, v. 49, p. 184-188, 2005.

MOUTIER, N. et al. Un groupe d'étude des compatibilités polliniques entre variétés d'olivier. **Le Nouvel Oliver**, Montpellier, v. 51, p. 8-11, 2006.

RAMOS, J. D. et al. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2008.

SALLES, L. A. et al. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SANZ-CORTÉS, F. et al. U. Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). **Annals of applied Biology**, Wellesbourne, v. 140, p. 151-157, 2002.

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

SILVA, L. F. O. et al. Caracterização agronômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012b.

SOUZA, F. B. M. et al. Produção e qualidade dos frutos de cultivares e seleções de pessegueiro na Serra da Mantiqueira. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p. 133-139, 2013.

**ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES VEGETATIVAS E ANATÔMICAS EM  
CULTIVARES DE OLIVEIRA SUBMETIDOS A APLICAÇÃO DE  
PACLOBUTRAZOL (PBZ)**

Preparado de acordo com a Bragantia - Versão Preliminar

Luiz Fernando de Oliveira da Silva<sup>I</sup>; Adelson Francisco de Oliveira<sup>II</sup>;  
Rafael Pio<sup>I\*</sup>; Carolina Ruiz Zambon<sup>III</sup> Tatielle Custódio Alves<sup>IV</sup>, Evaristo Mauro  
de Castro<sup>III</sup>

<sup>I</sup> Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Agricultura, Caixa Postal 3037, 37200-000. Lavras (MG). luizfernando.agronomia@gmail.com; rafaelpio@hotmail.com\*

<sup>II</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG-URESM, Caixa Postal 176, 37200-000 Lavras (MG). adelson@epamig.ufla.br

<sup>III</sup> Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Biologia, Caixa Postal 3037, 37200-000. Lavras (MG). carol-rzambon@hotmail.com; emcastro@ufla.br

<sup>IV</sup> Universidade Federal de Lavras - UFLA, Departamento de Ciências Florestais, Caixa Postal 3037, 37200-000. Lavras (MG). tatiellecustodio@yahoo.com.br

\* Autor para correspondência.

**RESUMO:** Embora o Brasil seja um grande importador, o país começa a despontar para a produção nacional de azeite e azeitona sendo esta atividade recente e em expansão. Sendo assim faz-se necessário ampliar as áreas aptas ao cultivo da oliveira e/ou desenvolver mecanismos capazes de induzir as plantas ao florescimento. Assim, o objetivo com este trabalho foi o de verificar as modificações vegetativas e anatômicas de plantas de oliveira submetidas a diferentes doses de paclobutrazol (PBZ). Os experimentos foram conduzidos em vasos em dois municípios de Minas Gerais: Maria da Fé e Lavras, entre os meses de abril e dezembro de 2011. Em cada uma das localidades, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 [cultivares: Arbequina e Ascolano 315 (MGS ASC315)] x 4 (doses: 6, 12 e 18 mL.planta<sup>-1</sup> de PBZ, além do controle sem aplicação) com três repetições, sendo cada parcela constituída por três plantas. Foram avaliados o crescimento em altura e diâmetro, massa seca da parte aérea e radicular, teor de clorofila a, b e total, espessura da epiderme adaxial e abaxial e parênquima

paliçádico e esponjoso. Em Lavras, a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou menor crescimento em altura. O paclobutrazol reduziu a altura, diâmetro e os teores de massa seca do sistema radicular das plantas cultivadas em Maria da Fé. O teor de clorofila a, b e total não foi alterado com a aplicação de PBZ, entretanto em Lavras, a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou maior teor de clorofila a e em Maria da Fé, a cultivar Arbequina apresentou maiores teores de clorofila. Para a espessura da epiderme abaxial, a cultivar Arbequina foi mais influenciada pelo efeito do PBZ, tendo apresentado resultados inferiores nas doses 0, 6 e 18 g.planta<sup>-1</sup>. A aplicação de PBZ ocasionou maior redução da espessura da epiderme abaxial da cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315). A cultivar Arbequina apresentou maior espessura do parênquima paliçádico e esponjoso.

Palavras chaves: *Olea europaea* L., PBZ, triazol, anatomia.

## VEGETATIVE AND ANATOMICAL CHANGES IN OLIVE TREE CULTIVARS SUBMITTED OF APPLICATION TO PACLOBUTRZOL (PBZ)

**ABSTRACT:** Although Brazil is a major importer, the country begins to dawn for domestic production of oil and olives with this recent activity and expanding. Therefore it is necessary to extend the fit to the cultivation of the olive and/or develop mechanisms to induce plants to flowering areas. Thus, the aim of this work was to verify the vegetative and anatomical changes of olive cultivars exposed to different doses of paclobutrazol (PBZ). The experiments were conducted in two municipalities of Minas Gerais: Maria da Fé and Lavras, between April and December 2011. In each location, the experimental design was a completely randomized factorial 2 [cultivars Arbequina and Ascolano 315 (MGS ASC315)] x 4 (doses: 6, 12 and 18 mL.planta<sup>-1</sup> PBZ, beyond control without application) with three replications, each plot had three plants. Growth in height and diameter, dry mass of shoots and roots, content of chlorophyll a, b and total, thickness of the adaxial and abaxial epidermis and palisade and spongy parenchyma were evaluated. In Lavras, Ascolano 315 cultivar (MGS ASC315) showed less growth in height. Paclobutrazol reduced height, diameter and leaf dry mass of the root system of plants grown in Maria da Fé. The content of chlorophyll a, b and total has not changed with the application of PBZ, however in Lavras Ascolano 315 cultivar (MGS ASC315) showed higher chlorophyll a and Maria da Fé Arbequina cultivar had high content of chlorophyll. For the thickness of the abaxial epidermis, the Arbequina cultivar

was more influenced by the effect of PBZ and presented results at lower doses 0, 6 and 18 g.plant<sup>-1</sup>. The application of PBZ caused higher reduction in the thickness of the abaxial epidermis of farming Ascolano 315 (MGS ASC315). The Arbequina cultivar showed greater thickness of palisade and spongy.

Key-words: *Olea europaea* L., PBZ, triazol, anatomy.

## INTRODUÇÃO

A área estimada com o cultivo de oliveira no mundo é de cerca de 10,6 milhões de hectares com um pouco mais de 1 bilhão de plantas e uma produção anual da ordem de 16,8 milhões de toneladas de azeitonas, sendo que apenas 10% deste volume é destinado ao consumo de mesa e o restante destinado a produção de azeite (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL - COI, 2014).

O Brasil é um grande consumidor de azeite e azeitona, configurando-se como o quarto maior importador destes produtos. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil importou no ano de 2012, 76 mil toneladas de azeite de oliva e em 2013 esse volume caiu para 73 mil toneladas (CONAB, 2014). O país começa a despontar para a produção nacional de azeite e azeitona e embora a atividade agrícola seja recente encontra-se em expansão, com áreas produtoras nos Estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2012a).

Em Minas Gerais, os cultivos estão sendo realizados principalmente no sul do Estado, em áreas agricultáveis dos contrafortes da Serra da Mantiqueira, atingindo até o ano de 2012 aproximadamente 700 hectares, com cerca de 300 mil oliveiras cultivadas (SILVA et al., 2012b) e atualmente estima-se que a área plantada tenha atingido dois mil hectares com cerca de 700 mil plantas. A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) vem pesquisando o comportamento de uma coleção de genótipos adaptados a esta região, tendo obtido até o momento, resultados promissores para acessos que se

destacam no florescimento e produções regulares de frutos (OLIVEIRA et al., 2012).

Faz-se necessário ampliar as áreas aptas ao cultivo da oliveira e/ou desenvolver mecanismos capazes de induzir as plantas ao florescimento. A indução floral é um processo irreversível, sendo ocasionado por estímulos externos como comprimento do dia e/ou temperaturas, as quais as gemas axilares foliares podem desenvolver-se em flores ou ramos (RALLO, 1998; BERNIER et al., 1991).

A utilização de fitorreguladores que exercem efeitos semelhantes ao do estresse hídrico, capazes de retardar o crescimento e inibir a síntese de giberelinas, tem despertado interesse de pesquisadores em utilizá-los como indutores de florescimento. Atualmente, já é utilizado em diversas culturas, como por exemplo, no cultivo da mangueira, onde atua além de induzir as plantas ao florescimento, no controle do crescimento, redução da poda e manipulação do cultivo para expansão da produção (SILVA, 2003).

Os reguladores vegetais são substâncias químicas que tem sido utilizadas para controlar o crescimento vegetativo de algumas fruteiras de clima temperado (cerejeira, macieira, pereira, pessegueiro e videira), subtropical (citros) e tropical (abacateiro e mangueira) (MOUCO et al., 2011).

Vale ressaltar que o manejo do crescimento vegetativo é de grande importância na produção de fruteiras, já que, evitando-se a brotação excessiva, pode-se promover a floração e a frutificação precoce em plantas jovens (SIQUEIRA; SALOMÃO, 2002; DAVENPORT, 2007).

A utilização de triazóis como o paclobutrazol (PBZ), tem sido mais um mecanismo para propiciar a floração por meio da promoção da paralisação do crescimento vegetativo e reduzindo o alongamento da brotação, sendo sua ação a inibição da biossíntese das giberelinas (GENÚ; PINTO, 2002). Entretanto, existem outros compostos que possuem o mesmo mecanismo de ação, como os

compostos quaternários (cloreto de mepiquat e o cloreto de chlormequat), os compostos cíclicos contendo um nitrogênio (uniconazole) e os acilciclohexanodionas (etil-trinexapac e o prohexadione-Ca) (ASIN et al., 2007).

Entretanto, a aplicação deste triazóis na estrutura foliar das plantas é pouco estudada, podendo ocorrer alterações que comprometam o desenvolvimento das mesmas. Estudos conduzidos por Oliveira (2010) em diferentes cultivares de oliveira demonstraram que o PBZ reduz o comprimento de entrenós e aumenta o número de ráculos florais. Além disso, estes estudos demonstraram também que doses crescentes do produto aumenta o teor de carboidrato, reduz a densidade estomática e aumenta o diâmetro dos estômatos. Kishorekumar et al. (2006) constataram que folhas de batata tratadas com PBZ sofreram diversas variações anatômicas como o aumento do número e comprimento dos estômatos.

A utilização comercial do PBZ em uma determinada frutífera depende, além de fatores como época, forma de aplicação e concentração, dos efeitos desejáveis e indesejáveis que o triazól pode ocasionar nas plantas.

Assim, o objetivo com este trabalho foi verificar as mudanças vegetativas e anatômicas das cultivares de oliveira [Arbequina e Ascolano 315 (MGS ASC315)] submetidas à diferentes doses de paclobutrazol (PBZ) na condições climáticas dos municípios de Maria da Fé e Lavras, ambos em Minas Gerais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos em dois municípios de Minas Gerais: Maria da Fé e Lavras, entre os meses de abril e dezembro de 2011.

Em Maria da Fé, o experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais em Maria da Fé, sul de



Minas Gerais, a 22° 18' de latitude Sul, 45° 23' de longitude Oeste e altitude média de 1.276 metros, com temperatura média de 17 °C e precipitação em torno de 1.739 mm anuais, sendo o clima segundo a classificação de Köppen, mesotérmico de inverno seco (Cwb) (SOUZA et al., 2013).

Em Lavras, o experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais em Lavras, localizado dentro do Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sul de Minas Gerais, a 21° 14' de latitude Sul, 45° 00' de longitude Oeste e altitude média de 910 metros, com temperatura média de 20,4 °C e precipitação em torno de 1.460 mm anuais, sendo o clima segundo a classificação de Köppen temperado chuvoso com inverno seco e verão chuvoso e subtropical, com inverno seco (Cwa) (DANTAS et al., 2007).

Foram utilizados para os experimentos mudas de oliveira, obtidas por meio de enraizamento de estacas e transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 20 L contendo uma mistura de terra e Provaso<sup>®</sup> na proporção de 1:1, v:v.

Em cada uma das localidades o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 [cultivares: Arbequina e Ascolano 315 (MGS ASC315)] x 4 (doses: 6, 12 e 18 mL.planta<sup>-1</sup> de PBZ, além do controle sem aplicação) com três repetições, sendo cada parcela constituída por três plantas, totalizando assim, 72 plantas por localidade.

As aplicações das doses de PBZ foram realizadas um ano após o transplântio das mudas para os vasos, sendo cada dose diluída em 500 mL de água e aplicadas via solo. Os vasos foram cobertos com sacos plásticos para evitar a perda de água e a irrigação foi realizada semanalmente adicionando-se um volume de 500 mL de água por vaso.

Foi realizada uma avaliação inicial aferindo a altura e o diâmetro das plantas. Após o período de condução dos experimentos, foram avaliadas a altura

e o diâmetro final das plantas. Posteriormente, as plantas foram retiradas dos vasos e separadas em parte aérea e sistema radicular sendo completamente limpas de terra. Após esse procedimento, as partes das plantas foram colocadas em estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 65 °C até atingir peso constante onde foram avaliados a massa seca da parte aérea e do sistema radicular.

Para a determinação dos teores de clorofila, foram coletadas folhas totalmente desenvolvidas no estágio 37 - BBCH Scale (SANZ-CORTÉS et al., 2002) no terço superior na porção mediana do ramo para cada tratamento, sempre seguindo a mesma orientação cardeal, sendo o limbo de cada folha separado do pecíolo e macerados em acetona 80%, na presença de CaCO<sub>3</sub>. Os extratos obtidos foram filtrados por meio de papel de filtro rápido, em balões de 50 mL, conforme metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). A absorbância da solução foi lida, em espectrofotômetro Ultraspec 2000<sup>®</sup>, a 647 e 663 nm. Os teores de clorofilas a, b e total foram calculados por meio das seguintes equações:

$$1) \text{ Clorofila a (mg.L}^{-1}\text{)} = (12,25 \times A_{663}) - (2,79 \times A_{647})$$

$$2) \text{ Clorofila b (mg.L}^{-1}\text{)} = (21,50 \times A_{647}) - (5,10 \times A_{663})$$

$$3) \text{ Clorofila total (mg.L}^{-1}\text{)} = (7,15 \times A_{663}) - (18,71 \times A_{647})$$

Onde A<sub>647</sub> e A<sub>663</sub> são a absorbância medido nos comprimentos de onda 647 e 663 nm, respectivamente.

Para a avaliação das modificações anatômicas foram coletadas três folhas totalmente desenvolvidas no estágio 37 - BBCH Scale (SANZ-CORTÉS et al., 2002) no terço superior na porção mediana do ramo para cada tratamento, sempre seguindo a mesma orientação cardeal e fixadas em FAA (formaldeído 37%, ácido acético glacial e etanol 50%; 1:1:18, v:v:v) para confecção das lâminas.

Os cortes transversais foram feitos utilizando um micrótomo manual, avaliando-se a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da epiderme adaxial e abaxial e do parênquima paliádico e esponjoso.

As fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando-se um fotomicroscópio Olympus BX-60<sup>®</sup> e objetiva de 10x.

As medições nas fotos foram feitas pelo programa de análise de imagens Image Tool (University of Texas, San Antonio, USA), utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

Todos os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância sendo utilizada regressão para os dados quantitativos e teste de médias (Tukey) para os dados qualitativos. As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com a análise de variância não houve interação significativa entre os fatores cultivares e doses de PBZ para o crescimento em altura e em diâmetro das plantas de oliveira. Entretanto, observou-se efeito significativo para os fatores isolados para a variável altura e para o fator doses de PBZ para a variável diâmetro das plantas no experimento conduzido em Lavras, e efeito significativo para o fator doses de PBZ para ambas as variáveis (altura e diâmetro) para o experimento conduzido em Maria da Fé (Figuras 1 e 2).

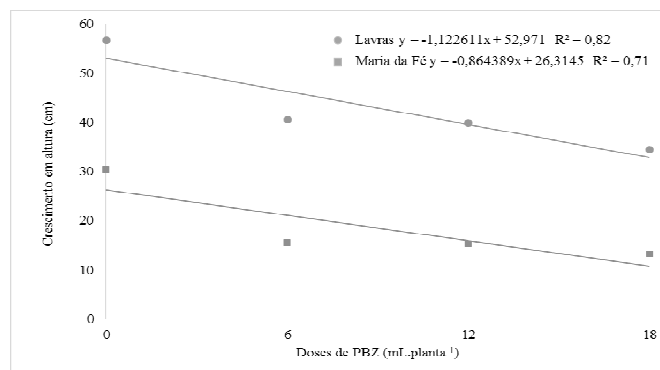


Figura 1 Crescimento médio em Altura (cm) de plantas de oliveiras em função de doses de PBZ, conduzidas em Lavras e Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

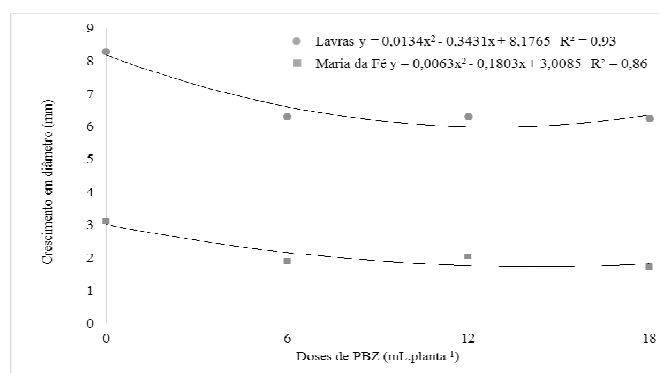


Figura 2 Crescimento médio em diâmetro (mm) de plantas de oliveiras em função de doses de PBZ, conduzidas em Lavras e Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

As plantas do presente estudo apresentaram maior crescimento na ausência do PBZ em ambas as localidades. Para a maior dose (18 mL.planta<sup>-1</sup> de PBZ) as plantas conduzidas em Lavras tiveram uma redução de 24,93% e em Maria da Fé em 59,13% de sua altura.

Setia et al. (1995) constataram a diminuição da altura de plantas de *Brassica carinata*, dentro de poucos dias após o tratamento com PBZ. Steffens & Wang (1984) ao trabalharem com plantas de maçã tratadas com PBZ,

observou o cessamento do crescimento durante a 6ª e 8ª semanas. Maia et al. (2008) ao trabalharem com o desenvolvimento de bananeiras observaram redução em 25% da altura das plantas quando tratadas com 2 g.planta<sup>-1</sup> de PBZ.

As plantas apresentaram o mesmo comportamento para a variável diâmetro em ambas as localidades. As plantas submetidas à dose de 12,80 mL.planta<sup>-1</sup> (Lavras) tiveram redução de 26,86% e as plantas submetidas a dose de 14,31 mL.planta<sup>-1</sup> (Maria da Fé) tiveram redução de 42,88% do seu diâmetro.

Siqueira et al. (2008) ao avaliarem o desenvolvimento do limoeiro 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pasq.) constataram que concentrações crescentes de PBZ, na ausência de GA<sub>3</sub>, reduziram os valores de comprimento e diâmetro do caule e comprimento dos entrenós. Oliveira et al. (2012a) ao trabalharem com plantas de oliveira cultivadas em Acauã (Norte de Minas) tratadas com 8 g.planta<sup>-1</sup> de PBZ observaram redução, aos 120 dias, de 42,8% da altura e 34,7% do diâmetro.

O PBZ interfere no crescimento vegetativo das plantas sendo seu efeito ligado diretamente à inibição da síntese de giberelinas, bloqueando as reações de oxidação na passagem de caureno para o ácido caurenoico no caminho desta síntese (RIBEIRO et al., 2007).

Para o experimento conduzido em Lavras, os resultados da análise de variância quando se avaliou a massa seca da parte aérea e do sistema radicular apresentaram interação significativa entre os fatores. Para o experimento conduzido em Maria da Fé, os resultados de massa seca da parte aérea apresentaram efeito significativo para o fator PBZ (Tabela 1 e Figura 3 e 4).

Tabela 1 - Massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR) para diferentes cultivares de oliveira submetidas a diferentes doses de PBZ. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Dose de PBZ (mL.planta <sup>-1</sup> )	Lavras				Maria da Fé			
	MSPA		MSSR		MSPA		MSSR	
	Cultivar							
<sup>1)</sup>	Arb	Asc	Arb	Asc	Arb	Asc	Arb	Asc
0	191,85 <sup>NS</sup>	215,24a	106,50 <sup>NS</sup>	87,73a	132,83 <sup>NS</sup>	135,89a	100,28 <sup>NS</sup>	87,46a
6	174,93 <sup>NS</sup>	134,94b	118,35 <sup>NS</sup>	65,83b	101,86 <sup>NS</sup>	96,93b	113,82 <sup>NS</sup>	65,56b
12	144,27 <sup>NS</sup>	114,92a	67,12 <sup>NS</sup>	53,58a	105,42 <sup>NS</sup>	79,69a	76,56 <sup>NS</sup>	78,81a
18	90,14 <sup>NS</sup>	101,15a	34,53 <sup>NS</sup>	56,87a	94,25 <sup>NS</sup>	87,06a	74,35 <sup>NS</sup>	89,11a
CV (%)	13,07		22,77		11,94		22,11	

Médias seguidas de mesma letra nas linhas, para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Arb = 'Arbequina'; Asc = 'Ascolano 315' ('MGS ASC315'). Valores em g.planta<sup>-1</sup>. <sup>NS</sup> = Não Significativo.

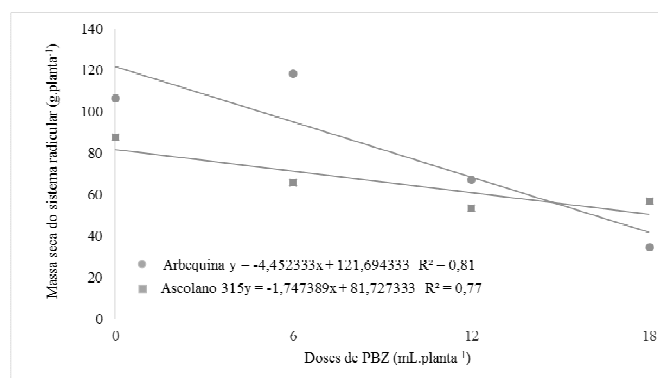


Figura 3 Regressão para massa seca da parte aérea e do sistema radicular (MSPA e MSSR) para diferentes cultivares de oliveira submetidas à diferentes concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

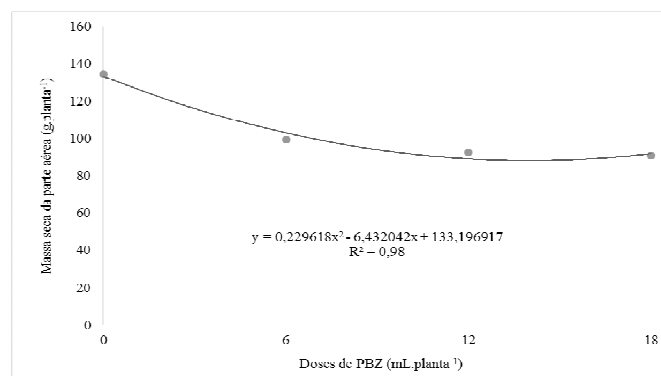


Figura 4 Regressão para massa seca da parte aérea e do sistema radicular (MSPA e MSSR) para diferentes cultivares de oliveira submetidas à diferentes concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

A cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou maior resposta aos efeitos do paclobutrazol, apresentando valores de massa seca estatisticamente igual ou inferior aos valores obtidos pela cultivar Arbequina.

Para o experimento conduzido em Lavras, a dose de 18,00 g.planta<sup>-1</sup> de PBZ proporcionou maior redução dos valores de massa seca do sistema radicular sendo a redução de 65,86% para a cultivar Arbequina e 38,49% para a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315).

Para o experimento conduzido em Maria da Fé, foi obtido maior redução para massa seca da parte aérea na dose de 14,06 g.planta<sup>-1</sup> de PBZ independentemente da cultivar, apresentando uma redução de 33,82%.

Estudos conduzidos por Siqueira et al. (2008) com limão 'Volkameriano', constataram redução do teor de massa seca da parte aérea em 45,25% e do sistema radicular em 22,11%. Também foi observado redução no teor de massa seca de laranja 'azedada' (*Citrus aurantium* L.) em 20,77% em estudos conduzidos por (LIDÓN et al., 2001).

São poucos os estudos realizados sobre os efeitos do PBZ no sistema radicular quando comparado aos estudos realizados na parte aérea, devido a

dificuldades técnicas, como aferir número e comprimento de raízes. Além disso, os resultados são contraditórios, muitas vezes nem constatando redução do crescimento, sugerindo que o seu efeito depende da espécie. Wang et al. (1986) constataram que o tratamento de mudas de macieira ‘York Imperial’ (*Malus domestica* Borkh) com PBZ via solo, aumentou a formação de raízes secundárias. Bausher e Yelenosky (1987) verificaram que aplicação via foliar de PBZ retardaram a formação de raízes secundárias em mudas de laranja ‘Doce’ (*Citrus sinensis*) e Lidón et al. (2001) verificaram que aplicação de PBZ via foliar, não afetou a produção de massa seca do sistema radicular de laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.).

Para os teores de clorofila, houve efeito significativo apenas para o fator cultivar em ambas as localidades. No experimento conduzido em Lavras, houve diferença significativa para o teor de clorofila a e para o experimento conduzido em Maria da Fé houve efeito significativo para os teores de clorofila a, b e total. (Tabela 2).

Tabela 2 Teor de clorofila ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em plantas de oliveira submetidas a diferentes doses de PBZ. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Cultivar	Lavras			Maria da Fé		
	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Clorofila
	a	b	Total	a	B	total
Arbequina	3,97b	2,27 <sup>NS</sup>	6,25 <sup>NS</sup>	5,78a	3,24 <sup>a</sup>	9,03a
Ascolano 315	6,22a	3,01 <sup>NS</sup>	9,22 <sup>NS</sup>	3,46b	2,23b	5,70b
CV (%)	30,09	26,95	28,87	19,81	17,98	18,02

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>NS</sup> = Não Significativo.

Para as plantas cultivadas em Lavras, a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) obteve resultado superior para clorofila a ( $6,22 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e para plantas



cultivadas em Maria da Fé, a cultivar Arbequina apresentou resultados superior para clorofila a, b e total (5,78; 3,24 e 9,03 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente).

Diferentemente do observado por Oliveira et al. (2012), no presente estudo as diferentes doses de PBZ não promoveu diferença significativa nos teores de clorofila a, b e total em ambas as cultivares. Vale ressaltar que o método utilizado para avaliar o teor de clorofila por estes autores (método de campo por meio de leitura em aparelho SPAD - 502Plus<sup>®</sup>) foi diferente do método utilizado no presente estudo (método laboratorial por meio de leitura em espectrofotômetro Ultraspec 2000<sup>®</sup>).

Em relação às modificações anatômicas para o experimento conduzido em Lavras, houve significância apenas para interação entre os fatores para a variável espessura da epiderme abaxial (Figura 5), sendo mostrado na figura 6 as seções transversais de folhas de oliveira.

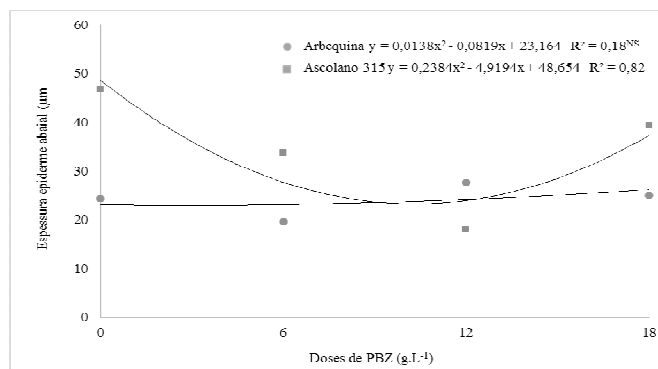


Figura 5 Regressão para espessura da epiderme abaxial para cultivares de oliveira submetidas a diferentes concentrações de PBZ, para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

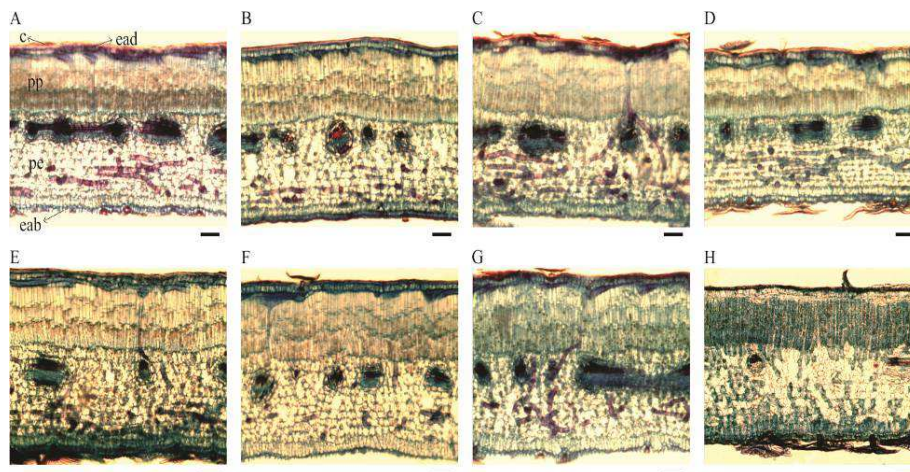


Figura 6 Seções transversais de folhas de cultivares de oliveira submetidas a diferentes doses de PBZ, para o experimento conduzido em Lavras, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014. A) ‘Arbequina’ e 0 mL de PBZ; B) ‘Arbequina’ e 6 mL de PBZ; C) ‘Arbequina’ e 12 mL de PBZ; D) ‘Arbequina’ e 18 mL de PBZ; E) ‘Ascolano 315’ (MGS ASC315) e 0 mL de PBZ; F) ‘Ascolano 315’ (MGS ASC315) e 6 mL de PBZ; G) ‘Ascolano 315’ (MGS ASC315) e 12 mL de PBZ; H) ‘Ascolano 315’ (MGS ASC315) e 18 mL de PBZ. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

Para a espessura da epiderme abaxial, a cultivar Arbequina foi mais influenciada pelo efeito do PBZ, tendo apresentado resultados inferiores nas doses 0, 6 e 18  $\text{g.planta}^{-1}$  que a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315). Para a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315), a aplicação de 10,32  $\text{g.planta}^{-1}$  de PBZ ocasionou redução de 52,16% na espessura da sua epiderme abaxial.

Uma possível explicação para a redução da espessura da epiderme abaxial na dose de 10,32  $\text{g.planta}^{-1}$  de PBZ pode não estar relacionada com a concentração do produto e sim com as condições de intensidade de radiação, ou seja, a atenuação da radiação incidente nesse tratamento, principalmente no que se refere à incidência de ondas longas refletidas do ambiente para a face abaxial da folha, ocasionando assim uma menor taxa transpiratória na planta, o que

posteriormente pode ter refletido no desenvolvimento de uma epiderme abaxial menos espessa.

Em relação às mudanças anatômicas para o experimento conduzido em Maria da Fé, houve efeito significativo apenas para o fator cultivar (Tabela 3), sendo mostrado na figura 7 as seções transversais de folhas de oliveira.

Tabela 3 - Modificações nos tecidos foliares de cultivares de oliveira submetidos a diferentes doses de PBZ, para o experimento conduzido em Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

Cultivar	EAD	PP	PE	EAB
Arbequina	23,74 <sup>NS</sup>	166,99 a	223,14 a	23,19 b
Ascolano 315	21,78 <sup>NS</sup>	139,01 b	203,85 b	21,40 a
CV (%)	14,99	8,89	5,87	17,76

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EAD = Espessura da epiderme adaxial; PP = Espessura do parênquima paliçádico; PE = Espessura do parênquima esponjoso; EAB = Espessura da epiderme abaxial. Valores em  $\mu\text{m}$ . <sup>NS</sup> = Não Significativo.

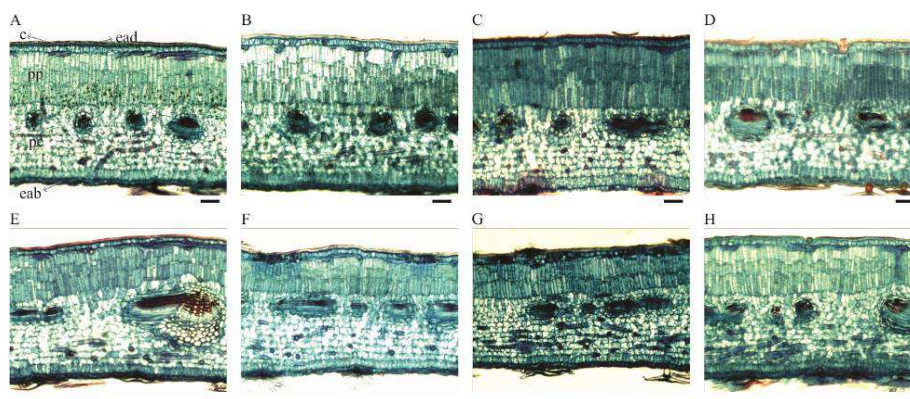


Figura 7 - Seções transversais de folhas de diferentes cultivares de oliveira submetidas a doses de PBZ, para o experimento conduzido em Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014. A) 'Arbequina' e 0 mL de PBZ; B) 'Arbequina' e 6 mL de PBZ; C) 'Arbequina' e 12 mL de PBZ; D) 'Arbequina' e 18 mL de PBZ; E) 'Ascolano 315' e 0 mL de PBZ; F) 'Ascolano 315' e 6 mL de PBZ; G) 'Ascolano 315' e 12 mL de PBZ; H) 'Ascolano 315' e 18 mL de PBZ. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

A aplicação do PBZ não ocasionou diferença para os valores de epiderme adaxial e abaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso. Entretanto as cultivares apresentaram diferença entre si para os valores da espessura dos parênquimas. A cultivar Arbequina apresentou os maiores resultados para o parênquima paliçádico (166,99  $\mu\text{m}$ ) e para o parênquima esponjoso (223,14  $\mu\text{m}$ ).

Uma possível explicação para a ausência de efeito do PBZ sobre as variáveis estudadas pode estar relacionada com as condições climáticas da região de origem e domesticação dessa espécie. A região do Mediterrâneo apresenta invernos com frio intenso e úmido e verões quentes e secos e sendo assim, a oliveira pode ser considerada uma espécie altamente adaptada para condições ambientais extremas, sujeita a pouca plasticidade fenotípica de suas estruturas anatômicas quando submetidas a intervenções, como no caso a aplicação do placobutrazol.

## CONCLUSÕES

Em Lavras, a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou menor crescimento em altura.

O paclobutrazol reduziu a altura, diâmetro e os teores de massa seca do sistema radicular das plantas cultivadas em Maria da Fé.

O teor de clorofila a, b e total não foi alterado com a aplicação de PBZ, entretanto em Lavras, a cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315) apresentou maior teor de clorofila a e em Maria da Fé, a cultivar Arbequina apresentou maiores teores de clorofila a, b e total.

A cultivar Arbequina foi mais influenciada pelo efeito do PBZ, tendo apresentado resultados inferiores nas doses 0, 6 e 18  $\text{g.planta}^{-1}$  para a espessura

da epiderme abaxial. A aplicação de PBZ ocasionou maior redução da espessura da epiderme abaxial da cultivar Ascolano 315 (MGS ASC315).

A cultivar Arbequina apresentou maior espessura do parênquima paliçádico e esponjoso.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro na execução desse trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da colsa de estudos.

### **REFERÊNCIAS**

ASIN, L.; ALEGRE, S.; MONTSERRAT, R. Effect of paclobutrazol, prohexadione-Ca, deficit irrigation, summer pruning and root pruning on shoot growth, yield, and return bloom, in a 'Blanquilla' pear orchard. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 142-148, 2007.

BAUSHER, M. G.; YELENOSKY. Sensitivity of potted citrus plants to top sprays and oil applications of paclobutrazol. **Hortscience**, Alexandria, v. 21, p. 141-143, 1986.

BERNIER, G.; KINET, J. M.; SACHS, R. M. **Physiology of flowering**. Boca Raton: CRC, 1991. 59 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Indicadores da Agropecuária. 2014, 78p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_01\\_31\\_12\\_02\\_04\\_conab\\_janeiro\\_versao\\_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_31_12_02_04_conab_janeiro_versao_final.pdf)>. Acesso em: 04 maio 2014.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL - COI. **The olive world**. 2014. Disponível em: < [http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-ingles/index\\_ingles.html](http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-ingles/index_ingles.html)>. Acesso em: 04 maio 2014.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, 2007.

DAVENPORT, T. L. Reproductive physiology of mango. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 19, n. 4, p. 363-376, 2007.

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

FLETCHER, R. et al. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, New York, v. 24, p. 55-138, 2000.

GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. **A cultura da mangueira**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2002. 454 p.

KISHOREKUMAR, A. et al. Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on the foliage characteristics of Chinese potato (*Solenostemon rotundifolius* Poir., J.K. Morton). **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 50, n. 3/4, p. 127-129, 2006.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 362-385, 1987.

LIDÓN, A. G. et al. Influencia del Paclobutrazol em patrones de cítricos. **Investigación agraria, producción y protección vegetales**, Madrid, n.16, p. 59-69, 2001.

MAIA, E. et al. Desenvolvimento de bananeiras cultivadas em ambiente protegido sob efeito do paclobutrazol aplicado nas folhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 989-993, 2008.

MOUCO, M. A. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Controle do crescimento vegetativo e floração de mangueiras cv. Kent com reguladores de crescimento vegetal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1043-1047, 2011.

OLIVEIRA, A. F. et al. Paclobutrazol em oliveira submetida a diferentes regimes hídricos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2137-2148, 2012a.

OLIVEIRA, D. L. **Paclobutrazol e restrição hídrica na vegetação e florescimento da oliveira (*Olea europaea* L.)**. 2010. 122 p. Tese (Doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OLIVEIRA, M. C. et al. Enraizamento de estacas em cultivares de oliveira promissoras para a Serra da Mantiqueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 147-150, 2012b.

RALLO, L. Fructificación y producción. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZE, S.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. 2ª ed. Junta de Andaluzia: Mundi, 1998. p. 129-161.

RIBEIRO, M. C. C. et al. Utilização do retardante de crescimento Paclobutrazol em Girassol (*Helianthus annuus*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1104-1106, 2007.

SANZ-CORTÉS, F. et al. Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). **Annals of applied Biology**, Wellesbourne, v. 140, p. 151-157, 2002.

SETIA, R. C.; BRATHAL, G.; SETIA, N. Influence of paclobutrazol on growth and yield of Brassica carinata A.Br. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 16, p. 121-127, 1995.

SIQUEIRA, D. L.; SALOMÃO, L. C. C. Efeito do paclobutrazol no crescimento e florescimento dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 355-369, 2002.

SIQUEIRA, D. L. et al. Distribuição da massa de matéria seca em limoeiro ‘Volkameriano’ submetidos a diferentes doses de paclobutrazol e ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 6, p. 512-517, 2008.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1223-1227, 2003.

SILVA, L. F. O. et al. Caracterização agrônômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 42, n. 3, p. 350-356, 2012a.

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, 2012b.

SOUZA, F. B. M. et al. Produção e qualidade dos frutos de cultivares e seleções de pessegueiro na Serra da Mantiqueira. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p. 133-139, 2013.

STEFFES, G. L.; WANG, S. Y. Physiological changes induced by paclobutrazol (PP333) in apple. **Acta Horticulturae**, v. 146, p. 135-142, 1984.

WANG, S. Y.; SUN, T.; FAUST, M. Translocation of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, in apple seedlings. *Plant Physiology*, Califórnia, v. 82, p. 11-14, 1986.



## ANEXOS

Anexo 1 Análise de variância para concentrações de ágar e ácido bórico. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM
Agar	3	218,558739*
Ác. bórico	3	1542,806152*
Agar x Ác. bórico	9	107,733774*
CV (%)	22,62	

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 2 Análise de variância para níveis de pH e concentrações de sacarose. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM
pH	3	13926,469625*
Sacarose	3	572,791304*
pH x Sacarose	9	39,515141*
CV (%)	14,36	

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 3 Análise de variância para concentrações de nitrato de cálcio e sulfato de Magnésio. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM
Nitrato de cálcio	3	646,652921*
Sulfato de magnésio	3	1257,997012*
Nitrato de cálcio x Sulfato de Magnésio	9	440,944669*
CV (%)	19,12	

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 4 Análise de variância para temperatura. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM
Temperatura	4	447,518833*
CV (%)		14,25

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 5 Análise de variância para tempo de incubação. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM
Tempo de incubação	6	3582,944249*
CV (%)		17,05

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 6 Análise de variância para taxa de germinação e número de grãos de pólen. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM	
		Taxa de Germinação	Nº de grãos de pólen
Cultivar	27	2071,326036*	8622540,255732*
CV (%)		12,35	20,36

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

Anexo 7 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM			
		Altura <sup>1</sup>	Diâmetro <sup>1</sup>	MSPA	MSSR
Cv	1	2,186903	0,143861	453,879037	728,201667
PBZ	3	4,614721*	0,332152	2503,054338*	325,351700
Cv x PBZ	4	0,486345	0,045497	222,467549	1115,045256
CV (%)		21,52	26,73	11,94	22,11

\* Siginificativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. MSPA = Massa seca da parte aérea; MSSR = Massa seca do sistema radicular. <sup>1</sup>Dados transformados por raiz quadrada - SQRT (Y).

Anexo 8 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM			
		Altura <sup>1</sup>	Diâmetro <sup>1</sup>	MSPA	MSSR
Cv	1	2,683309	0,017201	1011,791204	1464,375037*
PBZ	3	3,062899	0,206093	510,293993	3697,495249*
Cv x PBZ	4	0,969347	0,017278	228,245526	1408,160715*
CV (%)		9,27	3,83	12,62	22,77

\* Siginificativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. MSPA = Massa seca da parte aérea; MSSR = Massa seca do sistema radicular. <sup>1</sup>Dados transformados por raiz quadrada - SQRT (Y).

Anexo 9 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM		
		Clorofila a <sup>1</sup>	Clorofila b <sup>1</sup>	Clorofila total <sup>1</sup>
Cv	1	1,758696*	0,586882*	2,263487*
PBZ	3	0,032650	0,074544	0,086737
Cv x PBZ	4	0,030324	0,036158	0,039716
CV (%)		19,81	17,98	18,02

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. <sup>1</sup>Dados transformados por raiz quadrada - SQRT (Y).

Anexo 10 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM		
		Clorofila a <sup>1</sup>	Clorofila b <sup>1</sup>	Clorofila total <sup>1</sup>
Cv	1	2,174544*	0,500101	2,571408
PBZ	3	0,342894	0,123693	0,459359
Cv x PBZ	4	0,040756	0,017669	0,045809
CV (%)		30,09	26,95	28,87

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. <sup>1</sup>Dados transformados por raiz quadrada - SQRT (Y).

Anexo 11 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Maria da Fé. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM			
		EAD	EAB	PP	PE
Cv	1	23,128067	19,242504	4696,443037*	2230,696017*
PBZ	3	4,453428	9,457971	125,454771	155,568072
Cv x PBZ	4	8,910189	10,369860	406,538271	122,200961
CV (%)		14,99	17,76	8,89	5,87

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. EAD = Espessura da epiderme adaxial; EAB = Espessura da epiderme abaxial; PPE = Espessura do parênquima paliçádico; PE = Espessura do parênquima esponjoso.

Anexo 12 Análise de variância para cultivares e concentrações de PBZ para o experimento conduzido em Lavras. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

FV	GL	QM			
		EAD	EAB	PP	PE
Cv	1	4,166667	630,375000	1426,041667	40,041667*
PBZ	3	54,722222	190,819444	918,819444	406,375000*
Cv x PBZ	4	38,944444	286,708333	139,597222	103,819444*
CV (%)		19,80	24,85	18,87	6,48

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. EAD = Espessura da epiderme adaxial; EAB = Espessura da epiderme abaxial; PPE = Espessura do parênquima paliçádico; PE = Espessura do parênquima esponjoso.