



DANIEL FERNANDES DA SILVA

**IMPROVEMENTS IN THE
MICROPROPAGATION OF THE OLIVE TREE**
(Olea europaea L.)

LAVRAS – MG
2017

DANIEL FERNANDES DA SILVA

**IMPROVEMENTS IN THE MICROPROPAGATION OF THE OLIVE
TREE (*Olea europaea* L.)**

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

Prof. Dr. Rafael Pio
Orientador

Prof. Dr. Franco Famiani
Prof. Dr. Maurizio Micheli
Coorientadores

**LAVRAS – MG
2017**

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

Silva, Daniel Fernandes da.

Improvements in the micropropagation of the olive tree (*Olea europaea* L.) / Daniel Fernandes da Silva. - 2017.

93 p. : il.

Orientador(a): Rafel Pio.

Coorientador(a): Franco Famiani, Maurizio Micheli.

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

Bibliografia.

1. Micropropagação de oliveira. 2. Propagação vegetativa. 3. Botânica Aplicada. I. Pio, Rafel . II. Famiani, Franco . III. Micheli, Maurizio .

DANIEL FERNANDES DA SILVA

**IMPROVEMENTS IN THE MICROPROPAGATION OF THE OLIVE
TREE (*Olea europaea* L.)**

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

APROVADA em 25 de maio de 2017.

Dr. Moacir Pasqual UFLA

Dr^a. Joyce Dória Rodrigues Soares UFLA

Dr. Adriano Bortolotti da Silva UNIFENAS

Dr. Paulo Márcio Norberto EPAMIG

Prof. Dr. Rafael Pio
Orientador

Prof. Dr. Franco Famiani
Prof. Dr. Maurizio Micheli
Coorientadores

**LAVRAS – MG
2017**

À minha mãe, **Nailza Caetano da Silva** (*in memoriam*), minha estrela no céu, que nos poucos anos ao meu lado me ensinou tudo o que eu precisava saber para ser feliz.

À minha esposa, **Fabiola Villa**, pelo seu imenso amor, carinho e dedicação, em todo o tempo em que estamos juntos. Meu exemplo de pessoa, de profissional e de vida.

Às minhas filhas, **Chiara e Valentina**, meus maiores presentes, por quem busco ser melhor a cada dia de minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida, pela oportunidade de existir, e de algum modo, mesmo que simples e inexpressivo, para melhoria de algo que contribui para o avanço da nossa sociedade e das condições mínimas das pessoas que nela vivem.

À minha família, fonte de apoio constante, sem a qual qualquer esforço seria inútil e em vão. Em especial à minha esposa Fabíola, que está presente ao meu lado em todos os momentos, sendo o “pilar” de sustentação que não me deixa desabar nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Rafael Pio, pelo direcionamento durante o trabalho, oferecendo todo o seu conhecimento e disposição para que este trabalho se tornasse bem sucedido, além do companheirismo, compreensão e humanidade em todos os momentos.

A todos profissionais da Università degli Studi di Perugia (Unipg), em especial aos professores Franco Famiani, Maurizio Micheli e Daniela Farinelli, que não mediram esforços para passar seus conhecimentos e me receberam de forma sem igual em seu país, tornando-se grandes amigos.

À toda a equipe do laboratório de cultura *in vitro* da Unipg, que com seus técnicos Francesco Prospero e Georgio Sisani, sempre prestativos e divertidos, garantiram momentos únicos e o sucesso dos trabalhos ao longo do período na Itália. Também aos estudantes tesistas Graziana Agate, Michela Aliegro, Vittorio Fusilo, Michelangelo Morbidini e Simona Facchin, que confiaram no meu trabalho e me permitiram fazer parte de sua vida acadêmica.

Ao amigos, Maia e Dona Nilda, juntamente com seus filhos Rodrigo e Thaís, que com sua alegria, sempre tornaram a caminhada do doutorado mais leve e atenuada.

Aos técnicos do Pomar da UFLA, Evaldo e Arnaldo, por toda a ajuda para a realização do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, com todos os seus professores e funcionários, pela oportunidade de desenvolvimento das pesquisas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Aos amigos de sempre, Luiz Fernando Berti, Gonzaga e Michender, pelo apoio ao longo de mais esta etapa. Aos amigos conquistados ao longo da vida acadêmica, Jolana, Miriã, Adalvan, Juliana, Cassiana e Paulyene, que têm seu lugar especial guardado em me coração.

Por último, não menos importante, gostaria de agradecer imensamente a todos os amigos do pomar, da UFLA e da Unipg, que sem dúvida, tornaram os momentos de trabalho muito mais alegres, bem como me apoiaram nas horas de estudo. Vocês são muito especiais.

A todos, foi por vocês, com vocês e para vocês, que este trabalho foi desenvolvido.

MUITO OBRIGADO!

“A vida é pra quem sabe viver
Procure aprender a arte
Pra quando apanhar não se abater
Ganhar e perder faz parte
Levante a cabeça, amigo, a vida não é tão ruim
No mundo a gente perde
Mas nem sempre o jogo é assim
Pra tudo tem um jeito
E se não teve jeito, ainda não chegou ao fim
Mantenha a fé na crença, se a ciência não curar
Pois se não tem remédio, então remediado está
Não é um perdedor quem sabe a dor de uma derrota enfrentar”.

(Paula Lima)

RESUMO GERAL

A oliveira é uma espécie mediterrânea de grande importância e sua história se confunde com as de antigas civilizações. Conhecida pelo consumo de azeitonas e azeite, o cultivo de oliveiras ainda apresenta alguns entraves a serem resolvidos, dentre estes, os problemas propagativos, pois, entre as centenas de cultivares não se pode estabelecer um padrão para propagação em função do comportamento diferenciado entre as mesmas. Assim, a micropropagação, apresenta vantagens em relação a estaquia e a enxertia, e propõe-se como uma possibilidade interessante, embora ainda tenha custo elevado, devido a demanda de zeatina e também a baixa taxa de multiplicação causada pela forte dominância apical, problemas que atualmente permanecem como foco de pesquisa como desafios a serem superados. Conhecendo esta situação, o presente estudo, objetivou avaliar o efeito da inserção de óleo de neem na multiplicação *in vitro* de oliveira cultivar Moraiolo e, também, estudar a interação de fatores que influenciam no enraizamento melhorando o enraizamento *in vitro* de brotações regeneradas da mesma cultivar. Foram realizados dois estudos no qual, no primeiro, foram adicionadas quatro concentrações de óleo de neem (0; 0,1; 0,5 e 1 ml L⁻¹) ao meio de cultura OM, sendo os explantes regenerados cultivados por três sucessivas subculturas, nas mesmas condições, para comprovar os resultados. No segundo estudo, três experimentos foram estabelecidos: o experimento 1 objetivou avaliar a interação entre a concentração de sais do meio de cultura, a concentração de AIB e a realização de indução com escuro nos explantes; o experimento dois, analisou a utilização de AIB, o escurecimento do meio de enraizamento e a indução dos explantes com escuro e; o experimento 3, buscou a redução no tempo e custo de mudas micropropagadas de oliveira por meio de um enraizamento *in vitro* em substrato semelhante ao utilizado na aclimatização de mudas micropropagadas de oliveira, juntamente com a indução dos explantes ao enraizamento. Concluiu-se que a adição de 0,1 ml L⁻¹ de óleo de neem, permite obter explantes de oliveira com maior vigor e qualidade. Concluiu-se também, que a concentração ideal de AIB para enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo é 2 mg L⁻¹ e, a indução dos explantes com 72 horas de escuro, aliada a 2 mg L⁻¹ de AIB, melhora a qualidade das raízes formadas. O meio OM com metade da concentração de sais aumenta a massa das raízes formadas e é suficiente para o enraizamento dos explantes de oliveira Moraiolo. O escurecimento do meio de cultura com 150 mg L⁻¹ de Brilliant Black[®] aumenta o número de raízes formadas e, o substrato composto por turfa e areia na proporção 3:1 (v:v) não foi eficiente para o enraizamento direto *in vitro*.

Palavras-chave: Meio de cultura. Fitormônios. Substâncias orgânicas. Rizogênese. Óleo de neem.

GENERAL ABSTRACT

The olive tree is a Mediterranean species of great importance whose your history is confused with that of ancient civilizations. Known for the consumption of table olives and olive oil, the cultivation of olive trees still presents some obstacles to be resolved, among them propagation problems, since among the hundreds of olive cultivars it is not possible to establish a standard for propagation due to the differentiated behavior between them. Micropropagation presents advantages in relation to cutting and grafting, proposing itself as an interesting possibility, although it still has a high cost due to the demand of zeatin and also low multiplication rate caused by the strong apical dominance, problems that currently remain the focus of research as challenges to be overcome. Knowing this situation, the objective of this study was to evaluate the effect of neem oil insertion on *in vitro* multiplication of olive cultivar Moraiolo and also to study the interaction of factors which influencing rooting through the *in vitro* rooting of regenerated shoots of the same cultivar. Two studies were carried out: in the first study four concentrations of neem oil (0, 0.1, 0.5 and 1 ml L⁻¹) were added to the OM culture medium, being the regenerated explants cultivated by three successive subcultures in the same conditions to prove the results. In the second study three experiments were established: the experiment 1 aimed to evaluate the interaction between the concentration of salts of the culture medium, the concentration of IBA and the performance of dark induction in the explants; the experiment two analyzed the use of AIB, the darkening of the rooting medium and the induction of explants with light absence; and experiment 3 sought to reduce the time and cost of micropropagated olive seedlings by *in vitro* substrate rooting similar to that used in the acclimatization of micropropagated olive seedlings, together with the induction of explants to rooting. We concluded that the addition of 0.1 ml L⁻¹ of neem oil allows to obtain olive explants with greater vigor and quality. It is also concluded that the ideal concentration of AIB for rooting of olive explants cultivar Moraiolo is 2 mg L⁻¹ and the induction of explants with 72 hours of dark allied to 2 mg L⁻¹ of IBA improves the quality of the roots formed. The OM medium with half of the salt concentration increases the mass of the roots formed and is sufficient for the rooting of Moraiolo olive explants. Darkening of the culture medium with 150 mg L⁻¹ of Brilliant Black[®] increases the number of roots formed and the substrate composed of turf and sand in the ratio 3:1 (v:v) was not efficient for direct *in vitro* rooting.

Keywords: Culture medium. Phytohormones. Organic substances. Rhizogenesis. Neem oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Table 1 - Vitality, shoot number, shoot length, multiplication rate, leaves number, fresh and dry mass of the seedling of olive cultivar Moraiolo multiplied in three successive subcultured in culture medium added with different concentrations of neem oil.51
- Figure 1- Olive cultivar Moraiolo explants with 45 days cultivated in culture medium without addition of neem oil (A) e culture medium added 0.1 ml L-1 of neem oil (B); Comparison between explants grown without neem oil added to the culture medium (left) and with addition of 0.1 ml L-1 neem oil (right) (C); detail of the secondary aprounts of shoots (D); vessel containing the explants grown with the addition of 0.1 ml L-1 neem oil (left) and without neem oil (right)(E) 58

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Constituição dos tratamentos do experimento1. 71
- Tabela 2 - Constituição dos tratamentos do experimento 2. 73
- Tabela 3 - Porcentagem de enraizamento, número de explantes por raiz. 75
- Tabela 4 - Comprimento de raízes de explantes de oliveira cultivar Moraiolo enraizados em meio de cultura com diversas concentrações de AIB e submetidos a tratamento indutivo com 72 horas de escuro após inoculação..... 77
- Tabela 5 - Massa fresca e massa seca de raiz de plântulas de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas in vitro em função da concentração de AIB e de sais no meio de cultura. 78

- Tabela 6 - Percentagem de enraizamento, número, comprimento e massa fresca e massa seca de raízes de plântulas de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas em meio de cultura com e sem AIB e diferentes formas de escurecimento.81
- Tabela 7 - Porcentagem de enraizamento (PE), número, comprimento (CR), massa fresca (MFR) e massa seca (MS) de raízes de explantes de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas em diferentes meios de cultura/substratos e com diferentes formas de aplicação de AIB...87

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Aspectos botânicos.....	16
2.2	História da olivicultura.....	21
2.3	Importância econômica da oliveira.....	23
2.4	Propagação da oliveira.....	25
2.4.1	Propagação por estaquia	26
2.4.2	Propagação por enxertia.....	27
2.4.3	Micropropagação da oliveira	29
2.4.3.1	Meios de cultura para a micropropagação de oliveira.....	31
2.4.3.2	Substâncias orgânicas adicionadas ao meio de cultura.....	33
2.4.3.3	Fitorreguladores na micropropagação de oliveira	34
2.4.3.4	Perspectivas para a propagação de oliveira.....	36
	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 2 Neem oil added at the culture medium as a booster of the vigor increase in micro-propagated olive plants	45
1	INTRODUCTION.....	46
2	MATERIAL AND METHODS.....	48
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	50
4	CONCLUSION.....	62
	REFERENCES	63
	CAPÍTULO 3 Novas abordagens para o enraizamento <i>in vitro</i> de oliveira interagindo fatores abióticos	67
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69

2.1	Experimento 1: Interação entre concentração de sais do meio de cultivo, concentração de AIB e indução inicial de explantes	70
2.2	Experimento 2: Interação entre AIB, indução de explantes e escurecimento do meio de cultura.....	72
2.3	Experimento 3: Efeito do meio de cultura/substrato e do modo de aplicação do AIB sobre o enraizamento de oliveiras <i>in vitro</i>	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1	Primeiro experimento	74
3.2	Segundo experimento.....	80
3.3	Terceiro experimento.....	86
4	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.), árvore sempre verde de grande simbolismo entre os povos, e mundialmente conhecida pelo consumo de azeitonas de mesa e azeite, pertence a família Oleacea e é um dos mais importantes cultivos arbóreos da região do mediterrâneo, o que desperta um grande interesse no desenvolvimento ou aperfeiçoamento de novas técnicas para a propagação (MICHELI et al., 2010).

A maior produção mundial de azeite e de azeitonas e também maior consumo desses produtos é encabeçada pelos países do mediterrâneo (COI, 2016), contudo, o Brasil é um mercado com grande potencial, no entanto, a olivicultura é recente no país e a produção é incipiente tornando o país totalmente dependente da produção internacional.

Sabe-se que o país tem potencial para produção desse fruto, assim, as plantações e interesses do produtor rural crescem e se alastram por diversos estados onde as condições climáticas favorecem o cultivo da espécie (OLIVEIRA et al., 2010) e, com isso, cresce também a demanda pela produção de mudas de qualidade e, conseqüentemente, vem a tona os problemas inerentes a propagação e formação de mudas (GYVES et al., 2008).

A estaquia e a enxertia são os principais métodos de propagação da oliveira (MANGAL et al., 2014), todavia, independente do método, a propagação da espécie por métodos convencionais permanece deficiente e onerosa (GYVES et al., 2008; LAMBARDI; OZUDOGR; RONCASAGLIA, 2013).

Na propagação por enxertia, a escassez de porta-enxertos selecionados e a utilização de sementes na obtenção dos mesmos, provocam diferença no vigor

e características agronômicas das plantas (TOUS, 2011). Já na estaquia, as principais dificuldades são a grande diferença na capacidade rizógena entre as cultivares, apresentando baixas taxas de enraizamento, e a demanda de grande volume de material com qualidade fisiológica, genética e sanitária para preparação das estacas (ASLMOSHTAGHI et al., 2014).

Nesse sentido, a micropropagação aparece como uma técnica biotecnológica promissora. Os recentes avanços da micropropagação da oliveira ainda não colocaram a técnica num posto de destaque na atividade viveirística comercial (PETRUCCELLI et al., 2012). Tal situação se deve principalmente a três principais fatores: a forte dominância apical que limita a taxa de proliferação da espécie (LEVA; SADEGHI; PETRUCCELLI, 2012), a resposta diferenciada dos genótipos *in vitro* (ALI et al., 2009) e; a dependência de zeatina, uma citocinina de alto custo (MICHELI et al., 2010).

Outro ponto crítico da micropropagação da oliveira é o enraizamento dos explantes, que muitas vezes é limitado e leva muitas plantulas à morte durante a fase de aclimatização, em função de um aparato radicial inicialmente mal formado (ROSTAMI; SHASAVAR, 2012).

Frente as dificuldades encontradas nos métodos de propagação convencionais, o presente estudo propõe avaliar o efeito da inserção de óleo de neem na multiplicação *in vitro* de explantes de oliveira cultivar Moraiolo e, também, estudar a interação de fatores que influenciam no enraizamento melhorando o enraizamento *in vitro* de brotações regeneradas da mesma cultivar, esperando-se com os resultados obtidos neste trabalho avançar na tecnologia para produção de mudas de oliveira pela micropropagação, e abrir novos caminhos para a pesquisa no setor.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos

A oliveira (*Olea europaea* L.) é considerada uma planta perene, de crescimento lento, tipicamente mediterrânea, particularmente adaptada a regiões com temperaturas elevadas, caracterizadas por estação quente, longa e seca, tolerante ao estresse hídrico e com expectativa de vida de 500 anos (LAVEE, 1992; RHIZOPOULOU, 2007).

De acordo com a atual classificação botânica, a oliveira é a única espécie a apresentar frutos comestíveis entre as quase 600 que compõem a família Oleaceae. Enquadrada no gênero *Olea*, ainda se discute sua classificação botânica, sendo a hipótese aceita, a que indica a formação de *Olea europaea* a partir de três outras espécies: *O. laperrinii*, *O. chrysophylla* e *O. ferruginea* (BARONE; DI MARCO, 2007).

Dentro da espécie existem seis subespécies: *cuspidata*, *lamperrinei*, *marrocana*, *cerasiformis*, *guanchica* e *europaea*. Esta última, por sua vez, corresponde à forma mediterrânea atual, possuindo exemplares silvestres denominados *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* e exemplares cultivados conhecidos por *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* (CHIAPPETTA; MUZZALUPO, 2012).

Em relação ao aspecto visual, a oliveira é constituída por tronco, ramos e brotações mais jovens. Possui ainda o sistema radicular abaixo do solo. As oliveiras apresentam raízes principais e condutoras, que correspondem a 20% da área abrangida pelas raízes. Apresenta ainda raízes de transição e absortivas que correspondem aos demais 80% da área de cobertura do sistema radicular. Na primeira fase de desenvolvimento o aparato radicial pode estar condicionado ao método de propagação utilizado, adotando, posteriormente, com o passar dos

anos um caráter pivotante (BARONE; DI MARCO, 2007). Em geral, o sistema radicular da oliveira é superficial, estendendo-se entre 0,9 a 1,2 m de profundidade, mesmo em solos profundos. Em uma planta adulta, a partir de doze anos em média, torna-se praticamente impossível distinguir a forma propagativa da planta com base no sistema radicular (BARGIONI, 2006; CHIAPPETTA; MUZZALUPO, 2012).

A altura das oliveiras varia até 20 metros de altura, sendo toda parte vegetativa sustentada pelo tronco, sendo este com mais volume perto do solo, bastante visível em oliveiras mais velhas. Na base do tronco encontram-se os ‘óvolos’ e a formação de ramos vigorosos denominados ‘poloni’. Em árvores adultas o tronco é grosso, esferoidal e se prolonga do chão até o início da ramificação, sendo a região de maior atividade cambial (BARGIONI, 2006). Oliveiras mais antigas, sem interferência, adquirem um formato mais volumoso, com mais de um tronco partindo diretamente da região do coleto, não apresentando o formato característico de tronco que sai do chão, crescendo de forma ereta, passando a ramificar-se somente na parte superior (BARONE; DI MARCO, 2007).

O crescimento do tronco não é regular, estando associado às condições ambientais e também à presença de ramos, o que leva a formação de regiões ‘privilegiadas’ quanto a ocorrência de feixes condutores, que futuramente, serão responsáveis pelas alterações da forma do tronco, formando relevos longitudinais chamados ‘cordões’ e, distanciando-o do formato circular. Outra característica marcante no crescimento de oliveiras é a contorção predominantemente no sentido horário e a alteração de regiões mais velhas do lenho, levando algumas vezes ao esvaziamento/perfuração total do tronco (BARONE; DI MARCO, 2007).

Outra parte importante da estrutura da oliveira são os ramos, que são formações lenhosas e podem ser identificados em plantas a partir de três anos. O

conjunto denso dos ramos, com entrenós curtos, dá a oliveira uma natureza compacta da folhagem, impedindo que a luz penetre rapidamente em seu interior, e, portanto, a formação de inúmeros ramos em cascata, caso a oliveira não seja podada, o que releva a importância da poda de qualidade na gestão racional do olival (CHIAPPETTA; MUZZALUPO, 2012).

Os ramos podem ser divididos em ramos primários ou principais, que formarão a estrutura principal da planta, inseridos diretamente no tronco e, ramos secundários, inseridos nos ramos primários, constituindo a copa da árvore (BACELAR et al., 2009; BARGIONI, 2006).

Em função do polimorfismo verificado em oliveiras, os ramos encontrados num mesmo indivíduo podem ter comportamento diferenciado quanto à intensidade de crescimento, diâmetro, comprimento de entrenós, características de folhas e gemas que possuem (BARONE; DI MARCO, 2007), podendo ser classificados em: ramos vegetativos - que não apresentam gemas floríferas, sendo muito vigorosos e mais retilíneos; ramos frutíferos - aqueles que possuem gemas floríferas e geralmente com vigor reduzido; e ramos mistos - que com seu vigor moderado possuem gemas floríferas e vegetativas. Destes ramos, provém a maior parte da produção na maioria das cultivares, localizando-se na parte média ou terminal dos ramos primários e secundários (BARGIONI, 2006; BARONE; DI MARCO, 2007).

As folhas são simples, coriáceas, nervura central marcada, filotaxia oposta cruzada, persistentes, desenvolvendo-se durante todo o ciclo vegetativo da planta, que vai da primavera ao outono, e com duração de um a três anos (BARGIONI, 2006; BARONE; DI MARCO, 2007). Seus pecíolos são considerados curtos. O formato das folhas varia de elíptica a lanceolada, com comprimento entre 30-80 mm e largura entre 7,5-20 mm, o que provoca uma variação na área foliar de 2-3 cm² a 7-10 cm², respectivamente.

A coloração da superfície adaxial das folhas é verde escura e brilhante, em função da presença de cera. A superfície abaxial é recoberta por estruturas pluricelulares privadas de clorofila, denominadas tricomas peltados, que exibem formato de guarda-chuva, com 3-4 estratos, as quais se deve a coloração tendente ao cinza opaco ou prateado. Estes tricomas atuam como protetores dos estômatos e do mesofilo contra a radiação UV, sobretudo, nas fases iniciais do desenvolvimento foliar, e também reduzem o efeito do vento sobre a transpiração da folha (BARGIONI, 2006; BARONE; DI MARCO, 2007).

A anatomia das folhas de oliveira merece especial atenção, pois atribui à espécie, caráter xenofítico. A parte superior das folhas apresenta espessa cutícula (15-20 μm). No mesofilo, a elevada compactação do parênquima clorofiliano, juntamente com o tamanho reduzido da folha e sua disposição para-heliotrópica auxiliam na redução da interceptação. Além disso, o reduzido espaço intracelular quer seja no parênquima paliçádico, quer seja no esponjoso, demonstra elevada resistência a difusão dos gases no interior da folha. Abaixo da epiderme abaxial verifica-se a presença de esclereídes, que conferem a característica rigidez das folhas (BACELAR et al., 2009; BARONE; DI MARCO, 2007).

A formação das flores e dos frutos tem início com o desenvolvimento das gemas. Estas podem ser gemas vegetativas, gemas floríferas ou ainda gemas mistas. A primeira dá origem apenas a ramos vegetativos, e pode ser encontrada ao longo de toda planta, sendo inclusive desenvolvida em partes bastante lenhosas, como o tronco, por exemplo. A segunda deriva de uma gema vegetativa que ao final do processo de indução e diferenciação, contendo os primórdios floríferos formados e prontos para crescerem no momento exato. Estas se encontram nas axilas foliares dos ramos crescidos no ano, que precede a sua floração e desenvolvem a inflorescência tipo racimo. As gemas mistas desenvolvem uma estrutura vegetativa que emitem na sequência uma inflorescência (BARGIONI, 2006; BARONE; DI MARCO, 2007).

As inflorescências da oliveira iniciam seu desenvolvimento com coloração esverdeada, assumindo com o tempo aspecto esbranquiçado, necessitando para seu completo desenvolvimento, de 30 a 45 dias, em função de fatores ambientais e nutricionais. São formadas por uma haste central com diversos níveis de ramificações, nos quais o ápice termina sempre com uma ou mais flores. Seus comprimentos variam de 1-7 cm e o número médio de flores por inflorescências pode variar de 10-40 (BACELAR et al., 2009; BARONE; DI MARCO, 2007).

As flores são inseridas no rácimo por um curto pedicelo. São pequenas, de cor branco-amarelada, actinomorfas, formadas por quatro sépalas fundidas (gamosépalas), quatro pétalas (gamopétalas) e um ovário súpero com quatro óvulos, sendo dois em cada um dos dois lóculos, onde somente um será fecundado, dando origem ao fruto (BARONE; DI MARCO, 2007). Existem dois tipos de flores nas oliveiras: as chamadas flores perfeitas, que possuem estame e pistilo desenvolvidos normalmente e as flores imperfeitas, também chamadas flores estaminíferas, com ovário parcial ou totalmente abortado e incapazes de desenvolver o fruto (BACELAR et al., 2009).

O pólen possui coloração amarelada com tamanho médio de 25 μm e um total de 4-8 milhões de grãos por inflorescência, que são transportados quase que unicamente pelo vento. Do total de flores presentes em uma planta, que pode chegar a meio milhão, a maior parte será abortada, restando apenas 1-2% que se transformarão em fruto (BARONE; DI MARCO, 2007).

O fruto, o mais importante órgão do ponto de vista econômico, é tipo drupa, composto por epicarpo, mesocarpo e endocarpo, variando a forma, cor e dimensão, de acordo com fatores genéticos, podendo variar ainda fatores que interferem nas características agrônômicas desejáveis como força de destaque, época de maturação rendimento em óleo e composição química (BARGIONI, 2006; BARONE; DI MARCO, 2007).

2.2 História da olivicultura

Embora o vestígio fóssil mais antigo de oliveiras, encontrado em Santorini, ilha grega no arquipélago Egeu, tenha entre 50-60 mil anos, o cultivo da oliveira teve início em um vale do Rio Jordão, no mediterrâneo oriental (RHIZOPOULOU, 2007). Dividida entre mitologia e realidade, o momento exato da domesticação da oliveira não se conhece, porém, esta planta vem acompanhando por milênios a vida e a agricultura do homem (BARGIONI, 2006).

Em condição unânime, a origem da oliveira é fixada na região geográfica que vai do sul do Cáucaso (Iran), alta Mesopotâmia e Palestina. Dessa região, expandiu-se para o ocidente, pelo Mediterrâneo (LOMBARDO, 2007). Relatos dizem que o início do cultivo olivícola se deu entre quatro e cinco mil anos a.C. no norte do Mar Morto. Mais exatamente, o primeiro cultivo de que se tem relato ocorreu na Síria e Creta, de onde a oliveira foi difundida pelos fenícios para toda bacia do Mediterrâneo, compreendendo o norte da África e sul da Europa, sendo cultivada pela primeira vez na Itália e na Península Ibérica por volta de 1000 a.C (BARBARISI, 2015; VIEIRA NETO et al., 2011).

Antigamente, a importância da oliveira era em grande parte relacionada ao papel que ela ocupava na mitologia grega e no velho testamento do cristianismo. Um dos mitos mais conhecidos relata que em um conflito pela disputa de uma área entre Poseidon, o Deus do mar e dos terremotos e Atenas, Deusa da sabedoria, a deusa venceu, pois, seu presente, uma oliveira, foi considerado mais precioso e útil à civilização, que o presente de Poseidon, um cavalo. Dessa forma a cidade de Atenas, atualmente capital da Grécia, teria recebido este nome em homenagem a deusa. Segundo o antigo testamento, a aparição da pomba lançada por Noé, segurando um ramo de oliva, representava

o fim do dilúvio e o restabelecimento da paz entre Deus e os homens, passagem esta considerada uma entre muitas citações da planta na bíblia (KAPELLAKIS et al., 2008; TERAMOTO et al., 2010).

Com a descoberta da América os colonizadores trouxeram a oliveira para o sul do novo continente (Argentina, Chile e Peru) e para o centro norte (México e Estados Unidos). Após ser trazida para as Américas, foi levada também para a África do Sul, Austrália e China, sendo cultivada em todos os continentes (LOMBARDO, 2007).

No Brasil, a introdução das oliveiras se deu por intermédio dos portugueses há muitos séculos, difundindo-se em todas as regiões brasileiras, no entanto, em decorrência de forças políticas não se desenvolveu no território. Pelo simbolismo contido em uma oliveira, era muito comum encontrá-las próximas a igrejas e capelas durante o período do Brasil Colônia. Porém, quando o país começou a apresentar uma pequena produção, a família real ordenou o corte das árvores, com medo de que tivesse início uma concorrência entre o produto da colônia com o da metrópole, dando mais autonomia ao Brasil (GOMES, 1979). Após este fato, o cultivo da oliveira permaneceu esquecido por um grande período, reaparecendo somente na década de 40, com o aumento da imigração europeia para o Brasil, decorrente da segunda guerra mundial (TERAMOTO et al., 2010).

Por muitos anos, acreditou-se que o Brasil não possuía condições climáticas para a produção de oliveiras (TERAMOTO et al., 2010). A partir da década de 50, as pesquisas iniciadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) mostraram o contrário (OLIVEIRA et al., 2015), fazendo com que os avanços na olivicultura brasileira dessem resultados positivos. Atualmente, existem cultivos em diversos estados, com destaque para Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (VILLA; OLIVEIRA, 2012).

Em 2013, com a retomada da olivicultura pelos estados da região sul, a olivicultura passou a ser vista como um cultivo comercial, e a partir da comprovação da qualidade do azeite extraído no Rio Grande do Sul, por laboratórios nacionais e italianos, começou a se expandir para vários municípios. Cerca de 700 mil plantas podem ser encontradas no Rio Grande do Sul. Também nos estados de Santa Catarina e Paraná podem ser encontradas oliveiras em fase de produção, embora em menor volume quando comparadas ao Rio Grande do Sul (TERAMOTO; BERTONCINI; PRELA-PANTANO, 2013).

Em Minas Gerais, encontram-se cerca de 400 mil plantas distribuídas pela Serra da Mantiqueira, em aproximadamente 55 municípios. Na safra de 2011 a produção foi de 500 L de azeite no estado; em 2012, o volume saltou para 3.200 L e, em 2013, a produção registrada foi de 5.000 L. O estado conta com auxílio da EPAMIG, que registrou 33 cultivares de oliveira junto ao MAPA, em 2008, e, atualmente, além de produzir mudas, realiza pesquisa e disponibiliza os resultados por meio de publicações técnico-científicas, aproximando o produtor rural ao cultivo de oliveiras no Brasil, em especial no estado mineiro.

2.3 Importância econômica da oliveira

Apesar do cultivo de oliveiras, produção de azeite e azeitonas de mesa, serem tradicionalmente associados à região mediterrânea, o mercado desses produtos apresenta uma tendência de globalização há muitos anos, atingindo todas as partes do mundo.

A produção mundial de azeite na safra 2015/2016 foi de 3.159,5 ton., com previsão para a safra 2016/2017 de 2.713,5 mil ton. de azeite. Entre os maiores produtores do setor destacaram-se a Espanha, Itália e Grécia que somaram juntas 2.196,2 ton. de azeite. Os maiores exportadores foram Espanha,

Itália e Tunísia. A lista de grandes importadores de azeite nesta mesma safra é encabeçada pelos Estados Unidos, Japão e Brasil (COI, 2016).

Diferentemente do cenário para a produção de azeite, a produção de azeitonas de mesa apresenta uma tendência de aumento para a safra 2016/2017, saltando de 2.650 ton. na safra 2015/2016 para 2.700 ton. na safra 2016/2017. A produção mundial de azeitonas de mesa foi liderada pela Espanha, seguida pelo Egito e Turquia, totalizando 1.468,8 ton. de frutos processados. A exportação neste setor foi majoritariamente realizada pela Espanha, Marrocos e Turquia, e a importação feita em maior volume pelos Estados Unidos, Brasil, Canadá e Arábia Saudita (COI, 2016).

Em relação ao consumo, o maior volume de azeite é consumido também pelos dois maiores produtores, sendo Itália e Espanha, seguidas dos Estados Unidos. A ingestão de azeitonas de mesa é mais acentuada no Egito, Turquia e Argélia.

O Brasil é hoje, um mercado com grande potencial, apresentando-se como o oitavo maior consumidor de azeitonas de mesa e décimo segundo maior consumidor mundial de azeite em 2016. Todo este volume é importado, devido a produção ainda incipiente no país. Apesar da sua expressividade como potencial mercado para azeite e azeitona de mesa, Teramoto, Bertoncini e Praela-Pantano (2013) relatam que ainda existem muitos e difíceis desafios a serem superados, como estabelecer a olivicultura como um cultivo também brasileiro; acessibilidade do consumidor a produtos de qualidade e preços compatíveis com a renda; conscientização do consumidor quanto a importância da qualidade do azeite ingerido e; criação de legislação própria para os produtos, libertando-se das normas embasadas na legislação europeia.

2.4 Propagação da oliveira

O cultivo de oliveira no Brasil é uma atividade agrícola em expansão (OLIVEIRA et al., 2009a). Com base no volume médio de azeitonas importadas pelo país, anualmente, estima-se um mercado potencial de mudas de aproximadamente 11 milhões de unidades, para suprir o mercado interno (VIEIRA NETO et al., 2011).

Apesar dos frutos da oliveira possuírem sementes viáveis, a reprodução sexual não é desejada no estabelecimento de plantios comerciais, porque as plantas obtidas por este método distinguem-se da planta-mãe na fase adulta e apresentam longo período juvenil (OLIVEIRA et al., 2009b). Diante das desvantagens apresentadas pela propagação sexuada da oliveira, a forma recomendada para a obtenção de olivais homogêneos e de alta qualidade é a propagação assexuada.

Assim como para outras espécies frutíferas, a propagação vegetativa apresenta-se como a técnica mais viável para o processo de formação de mudas, mantendo as características genéticas das plantas-matrizes, uniformidade fenológica, porte reduzido das plantas e precocidade de produção (FRANZON et al., 2010).

Dentro da propagação assexuada da oliveira, destacam-se a estaquia e a enxertia (MANGAL et al., 2014), havendo ainda, métodos arcaicos de propagação, como a utilização de brotações de raízes e estruturas denominadas ‘óvulos’ (BARGIONI, 2006; RKHIS et al., 2011). Outra forma de propagação assexuada viável que tem sido testada é a micropropagação, no entanto, devido a restrições peculiares da espécie, este método ainda não é comercialmente empregado, como em outras espécies frutíferas, demandando aperfeiçoamento da técnica (ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012).

2.4.1 Propagação por estaquia

A propagação da oliveira por estaquia tem uma longa história. Inicialmente, as estacas utilizadas na propagação da espécie apresentavam grandes dimensões, medindo em média de 50-60 cm de comprimento e até 5 cm de diâmetro, sendo enterradas diretamente na área de plantio onde o pomar se estabelecerá definitivamente. Posteriormente, o tamanho das estacas tornou-se um pouco menor, reduzido para 25-30 cm de comprimento, com diâmetro médio mantido de 5 cm. Estas passaram a ser enraizadas em sacolas plásticas, em ambiente climatizado, contudo, independente do tamanho da estaca, desvantagens neste processo foram observadas, como a necessidade de grande quantidade de material vegetativo e maior tempo para a formação das mudas (CABALLERO, 1981).

Atualmente, a propagação pelo método de estaquia em oliveiras é feita utilizando estacas semi-lenhosas submetidas a nebulização intermitente em casa de vegetação (ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012). Segundo a literatura corrente, os ramos para a produção de estacas devem ser retirados de plantas matrizes, cultivadas em jardins clonais destinados a essa finalidade, o que proporciona uma maior rentabilidade no número de estacas e também maior percentagem de estacas enraizadas, devido ao vigor e juvenilidade do material propagativo (OLIVEIRA et al., 2010).

As estacas devem ter de 10-12 cm de comprimento, retiradas da porção mediana de ramos, com 4-6 entrenós e dois pares de folhas. Após preparadas, as estacas devem ser tratadas com imersão da base em solução hidroalcolica contendo de 2000-3000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) por alguns segundos e, posteriormente, levadas ao leito de enraizamento preenchido com substrato, a uma profundidade mínima de 20 cm, que deve apresentar algumas características desejáveis, dentre elas uma boa drenagem e aeração à base da

estaca, bem como facilidade na esterilização (FIORINO; MANCUSO, 2007). Alguns dos substratos que atendem estas exigências e utilizados no enraizamento de estacas são a areia lavada de granulometria fina, vermiculita ou perlita (SILVA et al., 2012).

Outro fator de grande importância durante o enraizamento é a manutenção das folhas das estacas, visto que nesses órgãos são sintetizadas as auxinas necessárias ao enraizamento (VIGNOLO et al., 2014). Este problema teve forte regressão a partir do emprego do sistema de nebulização intermitente em casa de vegetação, utilizada para o enraizamento de estacas. O emprego deste sistema permite fornecimento de água, bem como manutenção da umidade relativa alta e, conseqüente redução da transpiração, garantindo a sobrevivência das estacas por um período maior de tempo (FIORINO; MARCUSO, 2007).

As estacas enraizadas devem ser retiradas do leito de enraizamento após 60 dias. O percentual de estacas enraizadas varia de acordo com alguns fatores, como época de enraizamento, cultivar utilizada e condição da planta matriz (PENSO et al., 2016; SILVA et al., 2012).

2.4.2 Propagação por enxertia

A propagação de oliveiras por enxertia adquiriu importância a partir de 1800, com o surgimento do ‘viveirismo olivícola industrial’, na Toscana, Itália. Esta técnica tem como principal ponto positivo a capacidade de propagação de cultivares com baixo potencial rizogênico, porém, é uma técnica onerosa, em função do comprimento do ciclo para produção de uma nova planta e pela necessidade de mão de obra qualificada, devido a laboriosidade da técnica (PETRUCCELLI et al., 2012).

A enxertia é utilizada rotineiramente para a propagação vegetativa de plantas com fenótipo desejável em várias espécies. Algumas vezes, é a única

forma prática de propagação de cultivares com difícil capacidade de enraizamento e, outras vezes, porta-enxertos podem adicionar algumas características desejáveis, tais como melhoria da qualidade do fruto, resistência a doenças e a estresses ambientais. Olivicultores têm utilizado a copa para reduzir a suscetibilidade a doenças fúngicas, minimizar danos causados por geadas, alterar a forma da copa das plantas, aumentar a produção da planta e o teor de óleo nos frutos (HUSSAIN et al., 2016; MALIK; BRADFORD, 2004).

Verifica-se ainda, que para a oliveira existe forte interação entre porta-enxerto e copa, o que determina as características agronômicas e pomológicas das plantas oriundas deste método de propagação (CABALLERO; DEL RIO, 1997).

A propagação por enxertia de oliveira, do mesmo modo que para outras espécies, consiste na junção de parte de uma planta à parte de outra planta, de modo que a regeneração dos tecidos proporciona a soldadura de ambas, dando origem a uma nova e única planta (BARGIONI, 2006).

Um dos fatores que podem inviabilizar a enxertia é a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, sejam eles de gêneros distintos, como no caso de oliveira (*Olea*) e *Ligustrum* ou do mesmo gênero, a exemplo de espécies diferentes de *Olea* (DUTRA et al., 2004).

O porta-enxerto utilizado na propagação por este método é a própria oliveira, obtida a partir de sementes. Tal escolha se deve a boa qualidade do aparato radicial apresentado por estes, o que oferece excelente suporte as plantas. A parte superior, que constituirá a copa é retirada de parte de um ramo de um ano de plantas de comprovado valor produtivo e sanidade elevada. Esta deve conter dois nós sendo o inferior desfolhado (FIORINO; MANCUZO, 2007).

Com a disponibilidade do porta-enxerto e da copa, a união entre os dois se dá pelo corte transversal do porta-enxerto a 10 cm do solo e realização de

outro corte vertical de mais ou menos 1,5-2 cm no mesmo. Na base desfolhada do ramo que servirá como cavaleiro se realiza dois cortes oblíquos, dando formato de ‘caneta’ ou ‘cunha’, que devem ter o mesmo comprimento do corte vertical do porta-enxerto. O porta-enxerto deve então, ser inserido no corte vertical e a copa, fechado com uma fita plástica para evitar a soltura e comprimir a parte lesionada de ambas as partes, facilitando a regeneração dos tecidos, ligação entre ambas as partes e reestabelecimento da circulação da seiva (FIORINO; MANCUZO, 2007).

2.4.3 Micropropagação da oliveira

A propagação *in vitro* objetiva a produção de novas plantas com alta qualidade em curto espaço de tempo (MANGAL et al., 2014). O primeiro estudo a respeito da micropropagação de oliveira foi realizado na década de 70, onde os pesquisadores buscaram estabelecer uma formulação de meio de cultura que atendesse a todas as cultivares, porém, nenhum dos meios obteve êxito em relação ao objetivo proposto (PEIXE et al., 2007).

Rugini (1984) estabeleceu uma formulação de meio de cultura para a espécie, o qual ficou conhecido por OM (*Olive Medium*). Do primeiro estudo até os dias atuais, o estabelecimento e a regeneração *in vitro* de oliveira foram abordados por algumas técnicas não convencionais, como o cultivo de protoplastos e culturas haplóides. Além disso, técnicas de cultura de tecidos e células, como embriogênese somática e cultura de calos são aplicados na micropropagação de cultivares de oliveira selecionadas, que apresentem dificuldade de enraizamento (MANGAL et al., 2014).

Assim como para as outras espécies vegetais, a eficiência da multiplicação *in vitro* de oliveira depende do meio de cultura, reguladores de crescimento, genótipo propagado, entre outros (ALI et al., 2009). No entanto,

diferentemente da maioria das demais espécies lenhosas, a oliveira possui forte dominância apical, o que não permite a produção de muitas brotações por explante subcultivado, limitando-se a uma ou duas novas brotações, reduzindo significativamente o coeficiente de multiplicação da espécie (LEVA et al., 2012).

Atualmente o meio de cultura OM ainda é o principal meio utilizado, servindo para a produção de mudas com alta qualidade de mais de 50 cultivares de forma rápida (RUGINI; GUTIEÉRREZ-PESCE; MULEO, 2006). Porém, a micropropagação da oliveira tem outros desafios a serem superados. Além da baixa taxa de multiplicação, a oliveira apresenta variação intraespecífica com diferentes respostas *in vitro* entre as cultivares, impedindo o estabelecimento de protocolo de propagação para a espécie (SGHIR et al., 2005). A exemplo disso, algumas cultivares não respondem as condições *in vitro*, a taxa de proliferação é ainda menor em comparação a outras cultivares da espécie, o enraizamento de alguns genótipos é limitado e, por fim, muitas plantas morrem na fase de aclimação em alguns casos (ALI et al., 2009).

Há ainda, um terceiro problema de ordem econômica para a micropropagação da oliveira: para o alcance de taxas de proliferação aceitáveis, a espécie necessita da utilização de uma citocinina específica, a zeatina, apresentando, porém, elevado custo e demanda em altas concentrações, encarecendo assim, o processo produtivo (GYVES et al., 2008; MICHELI et al., 2010).

Diante do exposto, hoje, a micropropagação da oliveira é uma realidade, principalmente em centros de pesquisas e grandes empresas do setor, que atuam produzindo também mudas de outras espécies, não sendo a oliveira o carro chefe em nenhuma delas, sendo estas mudas, produzidas apenas em condições especiais.

2.4.3.1 Meios de cultura para a micropropagação de oliveira

Um dos principais problemas da micropropagação de oliveira é a sua forte dominância apical e baixa taxa de brotações laterais. Nesse sentido, pesquisadores têm procurado formas que permitam a quebra dessa dominância (LEVA et al., 2012), sendo a principal ferramenta utilizada para esta finalidade, a modificação do meio de cultura OM (*Olive Medium*) (RUGINI, 1984).

Em geral, a maioria dos pesquisadores desenvolveram seus trabalhos baseados na ação de fitorreguladores adicionados ao meio de cultivo (GRIGORIADOU; VASILAKAKIS; ELEFThERIOU, 2002; GYVES et al., 2008; ROUSSOS; PONTIKIS, 2002). Entretanto, nenhuma destas pesquisas permitiu um número de brotações elevadas e, conseqüente aumento da taxa de multiplicação de explantes.

Outra alternativa é a modificação da fonte de carbono oferecida aos explantes no meio de crescimento. Segundo Pruski et al. (2000), a fonte de carbono pode afetar o crescimento e a fisiologia dos explantes. Assim, o fornecimento de diferentes fontes de carbono também foi analisado por pesquisadores, que comprovaram que algumas fontes de carbono atuam na proteção das estruturas internas das plantas, melhorando a qualidade dos novos explantes, porém, não aumentando a sua taxa de multiplicação (LEVA; SADEGHI; PETRUCCELLI, 2012).

Também a composição mineral do meio de cultura, tem importante papel nas diferentes fases da micropropagação de oliveira. Durante o estabelecimento de quatro meios testados, a utilização do meio $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1973), enriquecido com 3% de sacarose e 2 mg L⁻¹ de BAP, proporcionaram maior sobrevivência e percentagem de gemas desenvolvidas após 10 dias (MANGAL et al., 2014).

Na regeneração de explantes de oliveira cultivar Oueslati, a variação do meio de cultura propiciou uma elevação do comprimento final do explante de 2,9 cm no meio MS, de 8,1 cm no meio MM e de 5,1 cm no meio OM. Também o número de entrenós por explante cresceu de 4,1 para 10,2, ressaltando a interferência da composição dos diferentes meios de cultivo utilizados (RKHIS et al., 2011). De forma semelhante, Ali et al. (2009), observaram melhor regeneração de explantes em meio OM em relação a explantes multiplicados em meio WPM (DRIVER; KUNIYUKI, 1984). Peyvand et al. (2009) encontraram maior número de brotações e entrenós por explante de oliveira cultivar Rowghani regenerados em meio DKW (MCCOWN; LLOYD, 1981) quando comparado aos explantes regenerados em meio de cultivo OM.

Também durante a fase de enraizamento, a composição do meio de cultivo é um fator determinante. Em oliveiras, o enraizamento geralmente ocorre em meio de cultivo com baixa concentração de sais (ALI et al., 2009).

A luz é, sem dúvida, um fator exógeno de grande importância que interfere diretamente na micropropagação, seja no crescimento da parte vegetativa, seja na formação de raízes. A ausência de luz pode estimular a formação de raízes adventícias, além de auxiliar no desenvolvimento destas (MENCUCINI, 2003).

A indução de explantes antes ou logo após a sua transferência é uma prática que pode aumentar a percentagem de explantes enraizados. Pode ser realizada por meio da manutenção da base ou do explante inteiro, no escuro, por alguns dias, com cobertura do recipiente com material escuro, adição de corantes ou carvão ativado ao meio (RKIS et al., 2011). Mencuccini (2003) comprovou o efeito benéfico do escurecimento do meio no enraizamento de oliveiras Moraiolo *in vitro*, sendo corroborado por Mangal et al. (2014) com resultado semelhante para a cultivar Frontio.

2.4.3.2 Substâncias orgânicas adicionadas ao meio de cultura

No meio de cultura podem estar presentes, junto aos componentes essenciais, algumas substâncias opcionais, dentre as quais com ações diversas. Uma dessas é o carvão ativado, material de origem vegetal com propriedade de adsorção de substâncias particulares produzidas pelos tecidos, podendo ter ação tóxica, como os fenóis. Podem ainda ser adicionados ao meio de cultura antioxidantes como o ácido cítrico, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP) e glutationa.

Entre os componentes adicionados em tecidos ou espécies particulares que necessitam desses elementos, pode-se citar as substâncias nitrogenadas orgânicas, ácidos orgânicos e uma ampla variedade de extratos naturais, aos quais se reporta efeito benéfico. Segundo Ubalua, Ikpeama e Okeagu (2015), o uso de produtos vegetais naturais, tais como sucos de frutas, pode aumentar a utilidade das plantas como recursos renováveis alternativos a produtos químicos valiosos, e desempenhar um papel cada vez mais importante no desenvolvimento comercial de novos produtos atuantes sobre o metabolismo vegetal.

Outros produtos naturais adicionados ao meio são a água e leite de coco, fluidos endospermicos, caseína hidrolisada, extrato de malte, tomate, suco de laranja e extrato de levedura (MOLNÀR; VIRÁG; ÖRDÖG, 2011). O leite de coco, em particular, quando é inserido no substrato parece induzir as células vegetais a se dividir e crescer rapidamente (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009). Em um estudo com kiwizeiro (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*), a adição de 10% de leite de coco determinou um aumento dos tecidos vegetais. A água de coco é uma substância natural com alto nível de zeatina em sua composição, com um aumento nos últimos anos na utilização em protocolos de propagação de oliveira (MICHELI et al., 2016).

Özkaynak ,Yüksel e Erüst (2014) avaliaram o feito da adição de extratos de melão e melancia como fonte de carbono na micropropagação de batata, e com função de geleificação. Estes autores concluíram que o uso de baixas concentrações de ágar, juntamente com o extrato de melão, na forma sólida, pode oferecer boa superfície de suporte para a micropropagação do tubérculo.

Alguns sucos de frutas tiveram respostas positivas em frutíferas propagadas *in vitro*. A exemplo, o suco de limão, que foi considerado eficiente para substituir a citocinina (mais cara), na micropropagação de bananeira (VORA; JASRAI, 2012). Na propagação *in vitro* de plantas de inhame, a adição de 10% de suco de laranja permitiu a regeneração de explantes, concluindo que esta substância no meio pode substituir eficazmente o uso de fitormônios tradicionais na micropropagação desta espécie como BAP e ANA (UBALUA; IKPEAMA; OKEAGU, 2015).

Por fim, como exemplo da possibilidade da adição de componentes orgânicos no meio de cultura, para micropropagação de diferentes espécies, buscando o aperfeiçoamento da técnica, o uso de sucos de frutas, dentre os quais coco maduro e jovem, mamão e tomate, demonstraram ter respostas positivas para o número de brotações regeneradas de celósia, demandando maiores estudos a respeito de sua utilização (DAUD et al., 2011).

2.4.3.3 Fitorreguladores na micropropagação de oliveira

Na cultura de tecidos, os reguladores de crescimento representam um dos principais fatores de proliferação, não sendo diferente para a micropropagação da oliveira em que a utilização de fitohormônios é indispensável em todas as fases do processo (ALI et al., 2009; MICHELI et al., 2010).

Durante o estabelecimento *in vitro*, a adição de fitorreguladores tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos hormonais nos explantes. Simultaneamente, a adição desses reguladores estimula certas respostas, como alongamento ou multiplicação da parte aérea (VILLA; PASQUAL; FREITAS, 2010).

Nesta fase, pode-se utilizar diferentes fitohormônios, sendo o mais comum, a citocinina, em função da necessidade prioritária de crescimento e multiplicação dos explantes inoculados. Às vezes a combinação de dois ou mais fitormônios, sejam eles citocininas ou citocinina + auxina promovem resultados superiores. Peyvand et al. (2009) utilizaram 4 mg L⁻¹ de isopenteniladenina (2ip) no estabelecimento *in vitro* de oliveira da cultivar Rowghani. Roussos e Pontikis (2002) utilizaram zeatina (Z), isopenteniladenina (2ip), 6-benzilaminopurina (BAP) ou thidiazuron (TDZ), em diferentes concentrações, todos de forma isolada no estabelecimento *in vitro* da cultivar Koroneiki.

Uma vez estabelecidos, livres de contaminação aparente, e com os tecidos ainda vivos, os explantes precisam começar a crescer e multiplicar seu número de entrenós, visando o aumento da taxa de multiplicação. Neste ponto então tem-se o maior entrave da micropropagação comercial da oliveira: a dependência de zeatina em altas concentrações, um fitormônio relativamente caro (GYVES et al., 2008; MICHELI et al. 2010) Micheli et al. (2010) obtiveram maior taxa de multiplicação com o uso de 4 mg L⁻¹ de zeatina, quando comparada a cinetina. Ali et al. (2009) constataram que a cultivar Moraiolo necessita de 0,5 mg L⁻¹ de BAP associada a 3 mg L⁻¹ de zeatina.

Devido ao elevado custo da zeatina, o desafio dos pesquisadores é descobrir substâncias ou processos que permitam a substituição, ou ao menos a redução da concentração utilizada de zeatina. Entre as estratégias para alcançar este objetivo, Peixe et al. (2007) afirmam que a utilização de água de coco associada ao BAP pode substituir a zeatina, o que pode ser explicado pelos altos

teores de zeatina endógena presentes na água de coco. Gyves et al. (2008) alcançaram elevada taxa de multiplicação em cultivares de oliveira, com o uso de dikegulak, um retardante de crescimento.

Por fim, na última etapa *in vitro*, a rizogênese dos explantes também é dependente do uso de fitoreguladores, as auxinas. Nessa classe, a auxina mais comumente utilizada é o ácido indolbutírico (AIB), por sua baixa toxicidade e grande estabilidade (HARTMANN et al., 2011), porém, o ácido naftaleno acético (ANA) também pode ser utilizado, ou ainda a combinação entre auxinas. Como o genótipo a ser enraizado também é um fator que exerce influência sobre o processo de formação de raízes adventícias, diferentes estudos demonstram variação na concentração de AIB para o enraizamento de oliveira, como por exemplo, 1,25 mg L⁻¹ no enraizamento de explantes da cultivar Dolce Agogia (HAQ et al., 2009) e 6 mg L⁻¹ para a cultivar Arbequina (ROSTAMI; SHASAVAR, 2012). Outras vezes a combinação de AIB e ANA são ainda mais eficientes que a utilização destes fitoreguladores individualmente, como relatam Mangal et al. (2014) para a cultivar Frontio.

De modo geral, para o enraizamento de oliveira *in vitro*, é preconizado o uso de auxinas, porém, algumas outras técnicas podem potencializar este enraizamento (MENCUCCINI, 2003), mas, de modo algum, podem substituir o uso dessas substâncias completamente.

2.4.3.4 Perspectivas para a propagação de oliveira

Dada a importância da espécie a nível mundial e às dificuldades de propagação, independente da forma em que seja realizada, novos horizontes têm guiado pesquisadores em todos os continentes para o aprimoramento da propagação da oliveira.

No âmbito da germinação, o principal desafio é acelerar e uniformizar a germinação de sementes de oliveiras para serem utilizadas como porta-enxertos. Na propagação por estaquia novas formas de aplicação de citocininas têm sido estudadas, sobretudo, associadas a materiais que permitem a liberação lenta dos fitormônios. Outra linha de pesquisa é a aplicação de redutores de transpiração nas folhas remanescentes em estacas, buscando reduzir a transpiração e a consequente perda de constituintes, que podem ser destinados à formação das raízes adventícias; ambas objetivam aumentar a porcentagem de estacas enraizadas nos diferentes genótipos estudados.

Na enxertia, os esforços se concentram na estipulação de porta-enxertos e sua influência nos aspectos pomológicos. Estudos de compatibilidade inter e intraespecíficos têm sido realizados, contudo, por ser uma espécie de grande longevidade, formas de determinar essa compatibilidade e reduzir os riscos de incompatibilidade após poucos anos são o alvo dos pesquisadores.

A micropropagação é, entre todos os métodos conhecidos, o mais avançado e ao mesmo tempo o mais desafiador. Nesta área, as buscas se concentram na descoberta de novas citocininas, combinações entre as citocininas existentes ou ainda substâncias ou processos que possam substituir ou ao menos reduzir a utilização da citocinina. Também o enraizamento de explantes *in vitro* tem sido abordado por ser o enraizamento uma fase crítica neste modo de micropropagação.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. et al. Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar ‘Moraiolo’. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 2, p. 783-795, 2009.
- ASLMOSHTAGHI, E. et al. Effects of IBA and putrescine on root formation of olive cuttings, **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 79, n. 3, p. 191-194, 2014.
- BACELAR, E. et al. Botânica e Morfologia da Oliveira. In: RODRIGUES, M. A.; CORREIA, C. M. (Ed.). **Manual da safra e contra safra do olival**. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2009. p. 9-16.
- BARBARISI, C. **Relazione tra qualità del suolo, caratteristiche fogliari e qualità dell’olio in differenti cultivar di *Olea europaea* L.** 2015. 220 p. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada) – Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Napoli, 2015.
- BARGIONI, G. **L’olivo e la sua coltivazione**. 2 ed. Verona: Edizioni L’Informatore Agrario, 2006. 156 p.
- BARONE, E.; DI MARCO, L. Morfologia e ciclo di sviluppo. In: FIORINO, P. (Ed.). **Olea Trattato di olivicoltura**. Bolonha: Edagricole, 2007. p. 13-33.
- CABALLERO, J. M. **Multiplicación del olivo por estaquillado semileñoso bajo nebulización**. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 1981. 39 p. (Serie Producción Vegetal, 31).
- CABALLERO, J. M.; DEL RIO, C. **Relaciones reciprocas patrón-injerto en olivo**. Barcelona: Fruticultura professional, 1997. p. 6-13 (Número 88, Especial Olivicultura II).
- CHIAPPETTA, A.; MEZZALUPPO, I. Botanical description. In: MEZZALUPPO, I. (Ed.). **Olive germoplasm - The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy**. Rijeka: InTech, 2012. 383 p.
- COI. International Olive Council. **Oleos de olive** – Produção. 2016. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>. Acesso em: 16 jan. 2017a.

COI. International Olive Council. **Olives de table** – Produção. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>>. Acesso em: 16 jan. 2017b.

DAUD, N. et al. Effects of different organic additives on *in vitro* shoot regeneration of *Celosia* sp. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 14, n. 9, p. 546-551, 2011.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* X *Juglans regia* rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 19, p. 507-509, 1984.

DUTRA, L. F. et al. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 220-223, 2004.

FIORINO, P.; MANCUSO, S. Tecniche di propagazione e vivaismo. In: FIORINO, P. (Ed.). **Olea Trattato di olivicoltura**. Bolonha: Edagricole, 2007. p. 307-329.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. **Produção de mudas:** principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. Planaltina DF: Embrapa Cerrados, 2010. 56 p. (Documentos, 283).

GOMES, P. A. **Olivicoltura no Brasil**. São Paulo: Melhoramentos, 1979. 208 p.

GRIGORIADOU, K.; VASILAKAKIS, M.; ELEFThERIOU, E. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 47-54, 2002.

GYVES, E. M. et al. Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 233-238, 2008.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HUSSAIN, I. et al. Effect of Grafting Time and Cultivar on Successful Propagation of Italian Olive in Hot Summer of Peshawar-Pakistan. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. Deira, v. 16, n. 2, p. 382-387, 2016.

KAPELLAKIS, I. E.; TSAGARAKIS, K. P.; CROWTHER, J. C. Olive oil history, production and by-product management. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Dordrecht, v. 7, n. 1, p. 1-26, 2008.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; RONCASAGLIA, R. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) by nodal segmentation of elongated shoots. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 11013, p. 33-44, 2013.

LAVEE, S. Evolution of Cultivation Techniques in Olive Growing. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE OLIVE OIL QUALITY. 1992, Firenze. **Anais...** Firenze: International Olive Council, 1992. p. 37-44.

LEVA, A.; SADEGHI, H.; PETRUCCELLI, R. Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots I. The analysis of shoot growth and branching patterns. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 53-60. 2012.

LOMBARDO, N. Aspetti generali dell'olivicultura. In: FIORINO, P. (Ed.). **Olea Trattato di olivicultura**. Bologna: Edagricole, 2007. p. 13-33.

MALIK, N. S. A.; BRADFORD, J. M. Reciprocal grafting between early maturing and normal maturing olive varieties: Preliminary effects on the nature of juvenility and flowering. **Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 2, n. 2, p. 197-200, 2004.

MANGAL, M. et al. *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, 'Frontio' from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 52, n. 9, p. 912-916, 2014.

MCCOWN, B. H.; G. LLOYD. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 453-453, 1981.

MENCUCCINI, M. Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 129-139, 2003.

MICHELI, M. et al. *In vitro* proliferation of olive ('Dolce Agogia' and 'Moraiolo'): effect of different cytokinins. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 884, p. 587-590, 2010.

MICHELI, M.; BERENATO, E.; SILVA, D. F. da. Studies of nutritional components effect on the olive micropropagation. In: GIORNATE SCIENTIFICHE SOI. 11. , 2016. Bolzano. **Anais...** Bolzano: Libera Università di Bolzano, 2016. p. 89.

MOLNÁR, Z.; VIRÁG, E.; ÖRDÖG, V. Natural substances in tissue culture media of higher plants. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 55, n. 1, p. 123-127, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture - A tool in biotechnology, basics and applications**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 333 p.

OLIVEIRA, A. F.; SILVA, L. F. O; PIO, R. Cultivo da oliveira. In: PIO, R. (Ed.). **Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões de clima subtropical e tropical**. Lavras: UFLA, 2015. p. 336-377.

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

_____. Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluído em NaOH e álcool. **Ciência & agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.1, p.79-85, 2009a.

_____. **Pioneirismo marca pesquisa sobre oliveira em Minas Gerais. Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, p. 7-15, 2009b. (Edição Especial).

ÖZKAYNAK, E.; YÜKSEL, F.; ERÜST, N. Use of different melon and watermelon fruit extracts as a carbon source and gelling agents in potato micropropagation. **International Journal of Plant Biology & Research**, Henderson, v. 2, n. 3, p. 1018, 2014.

- PEIXE, A. et al. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-7, 2007.
- PENSO, G. A. et al. Propagação de oliveira 'Koroneiki' pelo método de estaquia em diferentes épocas, concentrações de AIB e presença de folhas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 3, p. 355-360, 2016.
- PETRUCCELLI, R. et al. Moltiplicazione dell'olivo e vivaismo olivicolo in Italia. **Italus Hortus**, Florença, v. 19, n. 1, p. 3-22, 2012.
- PEYVANDI, M. et al. Mass production of *Olea europaea* L. (cv. Rowghani) through micropropagation. **General and Applied physiology**, Sofia, v. 35, n. 1-2, p. 35-43, 2009.
- PRUSKI, K. et al. Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato (*Solanum tuberosum* L.), chokecherry (*Prunus virginiana* L.) and Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) during low temperature storage. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 215-221, 2000.
- RHIZOPOULOU, S. *Olea europaea* L. A Botanical contribution to culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Deira, v. 2, n. 4, p. 382-387, 2007.
- RKHIS, A. C. et al. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. **Turkish Journal of Agricultural and Forestry**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 403-412, 2011.
- ROSTAMI, A. A.; SHAHSAVAR, A. R. *In vitro* Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.) 'Mission' by Nodal Segments. **Journal of Biological and Environmental Science**, Bursa, v. 6, n. 17, p. 155-159, 2012.
- ROUSSOS, P. A.; PONTIKIS, C. A. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 295-304, 2002.
- RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, p. 123-134, 1984.

RUGINI, E.; GUTIEÉRREZ-PESCE, P.; MULEO, R. Overview in the olive biotechnologies. In: CARUSO, T.; MOTISI, A.; SEBASTIANI, L. (Eds.). **Recent Advances in olive industry**. 2006, Marsala: Casa Editrice Marsala. 2006. 317-329 p.

SGHIR, S.; CHATELET, F.; OUAZZANI, N.; DOSBA, F.; BELKOURA, I. Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 1, p. 193-196, 2005.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R., ZAMBON, C. R.; OLIVEIRA, D. L. Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p. 488-492, 2012.

TERAMOTO, J. R. S.; BERTONCINI, E. I.; PRELA-PANTANO, A. **P. Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil**. 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm>. Acesso em: 18 maio 2017.

_____. Mercado dos produtos da oliveira e os desafios brasileiros. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 24-32, 2013.

TOUS, J. Influence of different olive rootstocks on growth and yield of the 'Arbequina IRTA-i-18[®]' Clone. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 924, p. 315-320, 2011.

UBALUA, A. O.; IKPEAMA, A. I.; OKEAGU, O. D. Effect of Different Concentrations of Orange Juice for *in vitro* Regeneration and Multiplication of Cocoyam (Taro). **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, n. 16, p. 2569-2575, 2015.

VIEIRA NETO, J. et al. Desempenho de jardins clonais de oliveira (*Olea europaea*) em cortes sucessivos visando a sua propagação por estaquia. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 117-122, 2011.

VIGNOLO, G. K. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta Presence of leaves on rooting of blackberry **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 467-472, 2014.

VILLA, F.; OLIVEIRA A. F. Origem e expansão da oliveira na América Latina. In: OLIVEIRA, A. F. (Ed.). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. p. 21-38.

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

VORA, N. C.; JASRAI, Y. T. Natural and low-cost substitutes of synthetic PGR for micropropagation of banana. **CIBTech Journal of Biotechnology**, Jaipur, v. 2, n. 1, p. 9-13, 2012.

CAPÍTULO 2 Neem oil added at the culture medium as a booster of the vigor increase in micro-propagated olive plants

Daniel Fernandes da Silva¹, Maurizio Micheli², Franco Famiani², Rafael Pio³,
Daniela Farinelli², Graziana Agate²

ABSTRACT

The olive micropropagation (*Olea europaea* L.) is a traditional propagation alternative through stakes, which presents the obstacle of many cultivars to have a low rooting capacity. The micropropagation isn't used, yet, in a commercial scale due the specificity presented by the species on this kind of propagation. Among the obstacles for the olive micropropagation is the high cost in function of the zeatin need, the protocol specificity for different genotypes and the low multiplication coefficient *in vitro*. An alternative that can improve the known results until the present moment is to modify the culture medium, using new components capable to interact with the vegetal metabolism, leading to the regeneration of more vigorous seedlings, capable to provide a higher number of explants in successive subculture or to present a higher success rate in posterior stages, on the transition for the ex vitro cultivation. A substance rich in several components and widely known for its benefits on agriculture is the neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss); however, its use on the *in vitro* cultivation has not been reported until the present moment. In face of this fact, the present study aimed the evaluation of the use of different neem oil concentrations added at the culture medium on the *in vitro* proliferation stage of olive cultivar Moraiolo. The vegetal material used was uninodal explants, about 1cm long, taken from olive seedlings that were kept on the laboratory collection. The culture medium used was OM, added with 4 mg L⁻¹ of zeatin, 30 g L⁻¹ of sucrose and hardened with 7 g L⁻¹ of agar. The culture medium contained, yet, 4 neem oil concentrations, established with basis in previous observations: 0,1, 0,5 e 1 ml L⁻¹, besides a control treatment without the addition of neem oil. The explants were inoculated and kept in growing chambers for 45 days, with a photoperiod of 16 hours of light at a luminous frequency of 40 μE m⁻² sec⁻¹ and average temperature of 23±1

¹Departimento de Biologia (DBI) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brazil. Bol. Capes-prot. n°99999. 006582/2015-00

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali - Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy.

³Departimento de Agricultura (DAG) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brazil.

°C. After the subculture period, it was analyzed the explants survival percentage, quantity and length of the shoots, multiplication coefficient, quantity of leaves and fresh and dry mass of the seedlings. Explants obtained through the multiplied material were transferred to a new substrate on the same conditions, from which were originated for two more times, creating, this way, three subculture at the end of the experiment. The used outlining was entirely randomized in a factorial scheme 4x3 (neem oil concentrations x subculture) with three repetitions of three vessels with 10 explants each. It was concluded that the addition of 0,1 ml L⁻¹ of neem oil to the substrate provided the Moraiolo olive seedlings regeneration, with a higher mass and vigor with an increase tendency on the multiplication coefficient raise, including the neem on the list of substances to be investigated with intended use on the olive micropropagation.

Keywords: *Olea europaea* L.. *Azadirachta indica* A. Juss.. Complex mixture. Organic substances.

1 INTRODUCTION

The micropropagation is a technique used worldwide, which presents a series of advantages in relation to the conventional propagation systems. Among its advantages, it's included the genetic and sanitary quality management of the propagated material, besides the great quantity of plants produced in a small area in a short period of time (KAVAND et al., 2011).

Currently, the micropropagation is applied in numerous fruitful species, among pears, kiwi, bananas, pineapples and others, being the main form of rootstock production of species such as apple and stone fruits (BALLA; MANSVELT, 2013; DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010) however, the micropropagation of woody plants for some species still presents difficulties that demands studies and improvement of techniques that turns this technology viable through the biological and economic point of view.

The olive is propagated through conventional asexual methods, such as cutting and grafting; however, these methods, besides the already quoted

disadvantages, has been criticized due the fact they're too slow and because they present a low efficiency for some cultivars with a high commercial value (RKHIS et al., 2011; SILVA et al., 2012). Aiming to overcome these difficulties imposed by the conventional propagation systems, the tissues and cells culture has also being applied the olive through techniques such as micropropagation, somatic embryogenesis and calluses culture, aiming to propagate mainly genotypes with a low rizogenic potential (MANGAL et al., 2014).

Although it had advanced a lot over the past years for some cultivars, the cultivation *in vitro*, in general, has not been well succeeded, nor used in commercial laboratories. Such failure occurs due the fact of the existence of a differentiated behavior among the *in vitro* olive cultivars (ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012), demanding the establishment of a specific protocol for each cultivation and, especially, the zeatin use, a used cytokinins in high concentrations, which allows the regeneration of olive explants with multiplication rates considered viable for the commercial production of the species, but that, due its high cots, turns the cultivation of micropropagated plants more expansive (GYVES et al., 2008).

In face of this difficulty, the researchers efforts turned for the search of a component that can be added to the culture medium, replacing, or at least allowing, the reduction of the zeatin concentration used on the current olive micropropagation system, in a way to generate plants with vigor and satisfactory quality, turning the technique economically viable and allowing that it disseminate itself among the commercial producers.

For that matter, the use of natural substances is gaining increasingly visibility. Those natural substances are denominated as “complex mixture”, in function of the variation of the composition of its nutrients (SOUZA et al., 2013). There is a series of organic supplements that can be added to the culture medium, enriching it for providing the most diverse components, such as

aminoacids, peptides, fatty acids, carbohydrates, vitamins, phytohormones, among others; however, the quantity of these required substances for the success of the *in vitro* cultivation vary according to the species and genotype to be cultivated (MOLNÁR; VIRÁG; ÖRDÖG, 2011; THORPE et al., 2008).

Among the most used organic components on the *in vitro* cultivation is the coconut water, malt extract, potato extract, yeast extract, homogenized banana, seaweed compound and hydrolyzed casein (MOLNÁR; VIRÁG; ÖRDÖG, 2011; SOUZA et al., 2013), and there's a growing number of new substances tested. A natural substance that presents potential for the use as an added component to the culture medium is the neem oil. It's extracted from the seeds of a plant (*Azadirachta indica* A. Juss.), known and used for a long time due its medicinal and pesticide properties (LOKANADHAN; MUTHUKRISHNAN; JEYARAMAN, 2012). More than 135 compounds can be isolated from different parts of the neem plant and a lot of reviews have been published regarding the chemical and structural diversity of these compounds (DEVI; MAJI, 2011). The neem presents a series of use on agriculture, such as on fertilizers, soil conditioner and, specially, the oil extracted from the plants is used as a pesticide, assuring protection against pests (LOKANADHAN; MUTHUKRISHNAN; JEYARAMAN, 2012) and, in a certain way, increasing the vigor of the plants; however, there are no reports about its utilization on the *in vitro* cultivation.

In face of what is exposed, the present work aimed to evaluate the effect of the neem use combined with zeatin, as a compound of the culture medium on the olive cultivar 'Moraiolo'.

2 MATERIAL AND METHODS

The work was performed on the Laboratory of *in vitro* culture of DSA3 of Università degli Studi di Perugia, Italy, between November, 2015 and July, 2016. The vegetal material used was olive seedlings nodal segments (*Olea europaea* L.) of the olive cultivar 'Moraiolo', kept on the laboratory collection.

The present study was composed by an experimental proof, with the goal to identify the possibility of the neem oil use added at the culture medium, combined with zeatin, aiming the replacement or reduction of the phytohormone quantity on the culture medium, and improvement of quality regarding the olive plants obtained through micropropagation.

The experiment consisted in the verification of the neem oil use effect, added to the proliferation culture medium and use concentration of it. For this purpose, it was defined three initial concentrations with basis on previous tests, being them 0,1 ml L⁻¹, 0,5 ml L⁻¹ and 1 ml L⁻¹ of neem oil and a control treatment without the addition of neem oil to the culture medium.

The neem oil was added on the form of commercial product Neem Italia[®], obtained through an organic production, without any previous treatment. The product was added on the adequate concentrations of the OM olive culture medium, added of 3% of sucrose, 7 g L⁻¹ of agar and enriched with 4 mg L⁻¹ of zeatin. After the junction of all compounds, the culture medium had its pH adjusted for 5,6 and, next, autoclaved at 115 °C per 20 min.

The explants inoculated on the experiment were obtained through seedlings with 45 days of growing in OM medium, added with 3% of sucrose, 7g L⁻¹ of agar and 4mg L⁻¹ of zeatin according with the Mencuccini, Micheli e Standardi (1997) methodology. These uninodal explants with two buds of approximately 1cm long were inoculated in aseptic conditions in the quantity of ten per vessel, according to the experimental treatments, and each vessel with the capacity for 500ml contained 100ml of the culture medium.

After the inoculation, the vessels were closed with a transparent plastic film and transferred for the growing chamber with a temperature of $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ and a photoperiod of 16 hours of light, with a luminous intensity of $40\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$, remaining in such conditions for 45 days.

Over the course of the growing period, it was evaluated the explants survival, the quantity of shoots, quantity of nods (multiplication rate), leaves number, length of the shoots, fresh mass of the seedling and total dry mass of the seedling.

From the obtained material of the first subculture it was made another two successive subculture, in identic conditions, totalizing three subculture to verify the neem oil effect over time.

The used experimental outlining was made with blocks entirely designed, with simple factorial 4x3 (four concentrations of neem oil interacted with three subculture), with three repetitions represented by a vessel with ten explants each one.

The data obtained at the end of the third subculture were analyzed with the Tukey test, analyzed by the statistical program SISVAR, with a significance level $\alpha < 0,05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The addition of different neem oil concentrations to the OM substrate used on the multiplication stage of Moraiolo by three successive subculture demonstrated a significant interaction among these two factors for all analyzed parameters (Table 1).

Table 1 - Vitality, shoot number, shoot length, multiplication rate, leaves number, fresh and dry mass of the seedling of olive cultivar Moraiolo multiplied in three successive subcultured in culture medium added with different concentrations of neem oil.

	Neem oil concentration (mL L ⁻¹)			
	0	0,1	0,5	1
Vitality				
1° subculture	96,67aA	96,67aA	60bA	0cA
2° subculture	100aA	100aA	0bB	0bA
3° subculture	100aA	93,33aA	0bB	0bA
CV %	20,60			
Shoot number				
1° subculture	1,83aA	1,68bA	1,33bcA	0cA
2° subculture	1,50aB	1,47aA	0bB	0bA
3° subculture	1,90aA	1,71aA	0bB	0bA
CV %	16,48			
Shoot Length (mm)				
1° subculture	26,01abA	41,88aA	24,64bA	0cA
2° subculture	24,57bA	40,90aA	0cB	0cA
3° subculture	35,01aA	47,44aA	0bB	0bA
CV %	15,93			
Multiplication rate				
1° subculture	7,53aA	7,40aB	3,98bA	0cA
2° subculture	5,17aA	8,0aAB	0bB	0bA
3° subculture	8,07aA	10,65aA	0bB	0bA
CV %	33,46			
Leaves number				
1° subculture	19,62abA	20,93aB	11,45bA	0cA
2° subculture	14,37aA	20,37aB	0bB	0bA
3° subculture	22,0aA	30,58aA	0bB	0bA
CV %	32,88			
Fresh mass of seedling (mg)				
1° subculture	502,25bA	945,30aA	741,82abA	0,0cA
2° subculture	191,20bB	512,40aB	0,0cB	0,0cA
3° subculture	323,15bAB	703,67aAB	0,0cB	0,0cA
CV %	17,67			
Dry mass of seedling (mg)				
1° subculture	51,48bAB	95,43aA	62,72abA	0,0cA
2° subculture	32,40bB	76,40aA	0,0cB	0,0cA
3° subculture	65,53bA	108,30aA	0,0cB	0,0cA
CV %	21,11			

Averages followed by the same lower case on the line and capital letter on the column don't differ among themselves by the Tukey test up to a 5% mistake probability.

Departing from the found results, it was verified a significant interaction among the neem oil concentration added to the culture medium and the subculture for the vitality of the multiplied explants. The best treatment observed for this parameter was the addition of $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ of neem oil. However, the addition of this oil quantity to the substrate didn't statistically differed from the control treatment, without the presence of neem oil, being both superior to the other treatments in all evaluated subcultures.

In relation to the subcultures on the control treatment and on the $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ concentration, the propagated material reached the third subcultures without present a reduction on the explants vitality, while on the concentrations of $0,5 \text{ ml L}^{-1}$ 60% of explants tolerated only one subculture and on the second subculture there was a total mortality of them. On the higher concentration equivalent to 1 ml L^{-1} on the first subculture, none of the explant was capable to regenerate, occurring total mortality.

Being the used culture medium the same in all treatments, only altering the added neem oil concentration, it's possible to affirm that the inferior result obtained on the $0,5 \text{ e } 1 \text{ ml L}^{-1}$ concentrations are associated to the high neem oil concentration on the medium, causing phyto-toxicity to the inoculated explants.

The low survival rate of olive explants on the higher neem oil concentrations added to the culture medium may be tied with the hydrophobic character of the oils, that, when found in higher concentrations on the culture medium, cause a difficulty of hydric absorption (CYR, 2014) and, consequently, of solubilized minerals by the xylematic tissues, *in vitro* explants on this case, absorption by the basis tissues of the explant directly in contact with the medium.

The neem oil presents, yet, more than one hundred compounds (DJIBRIL et al., 2015) which, when present in ideal concentrations, act over the plant's metabolism conferred to this growing conditions, development and ideal

defense. From these substances, many are common among several vegetal species, which may have favored the survival of the olive explants when presented in lower concentrations and causing toxicity on higher concentrations.

On concentrations that presented the better result there wasn't a vitality reduction over the three subcultures, showing that, when used on the ideal concentration, the neem oil doesn't exercise effect over the olive cultivar Moraiolo explants in three successive subcultures. In a similar way to the one verified for the concentrations, the higher values of neem oil added to the culture medium had as answer a higher explants mortality, which was increasing on the 0,5 ml L⁻¹ concentration, evolving from 40% on the first subculture to 100% on the third subculture.

Differently, the 1 ml L⁻¹ concentration already showed a higher toxicity since the first sub-cultivation, without the explants survival. This mortality growing, according to the neem oil concentration, strengthens the toxicity hypothesis previously quoted and hydric and mineral absorption difficulties.

The number of shoots also suffered influence of the neem oil concentration added to the cultivation substrate over three subcultures (Table 1). On the first subculture, the control treatment without the neem oil addition turned up to be the better treatment regarding the regeneration of 1,83 shoots by explant against 1,68 regenerated explants by inoculated explants in a culture medium that contained 0,1 ml L⁻¹ of neem oil. However, onwards the second subculture explants regenerated in a culture medium enriched with 0,1 ml L⁻¹ of neem oil presented a statistical result similar to the one verified on the control treatment, showing that the explants recovered the shoots buds capacity on the new culture medium, result that can be confirmed on the third subculture. It's possible, yet, to observe that on the cultivation medium added with 0,1 ml L⁻¹ of neem oil, the shoot number by explant kept constant, not having a negative effect from the neem addition on this concentration on the cultivation medium.

The reduced performance for the shoot number in olive explants on the first subculture in substrate containing $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ of neem oil occurred in function of the change on the constitution of the culture medium, considering that, after the second subculture, this condition was already overcome.

Santos et al. (2016) verifies an instability on the answer for the shoot number in *Ettlingera elatior* (Jack) R. M. Smith explants in cultivation mediums with different concentrations of phyto regulators and affirm that this initial instability and reduction of the shoot number after the inoculation in a new culture medium, different from that in which the seedling is already conditioned, is a vegetal answer to this change and it take place in an adaptation period to the new substrate. With basis on this, the authors reveal that the subcultures quantity is of a fundamental importance for the explants adaptation to the new established condition for the detection, recognition and absorption of the exogenous source of growing regulator or new substance and, in a posterior stage, for the answer for the stimulus.

Among the analyzed concentrations, a negative effect can also be visualized for the higher concentrations of neem oil added to the medium. In a similar way to the occurred for the explants vitality parameter on the concentrations $0,5$ e 1 ml L^{-1} of neem oil, at the end of the third subculture all explants had died, proving the product phyto-toxicity on these concentrations.

The interactions among the neem oil concentration added at the cultivation medium and the subculture was also statistically positive for the growing of seedlings of olive cultivar Moraiolo. It doesn't occurred a statistically difference over the subcultures on the treatments control and on the presence of neem oil at $0,1 \text{ mL L}^{-1}$; however, a tendency of an increase on the shoots length can be verified with the addition of this concentration at the culture medium (Table 1).

At the concentration $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil, a small answer of the inoculated explants can be observed on the first subculture, although with inferior results when compared with the control treatment and on the presence of $0,1 \text{ mL L}^{-1}$; nevertheless, through the second subculture, the verified results for the concentration $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ in relation to the explants length is equal to the ones obtained on the concentrations of 1 mL L^{-1} , without any growth and total loss of the explants.

Among the concentrations, differently from the observed on the other variables until the moment where they were presented, since the first subculture, the concentration $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil added at the medium turned up to be superior in relation to the other treatments, although it didn't have differed from the control treatment which, on the other hand, showed an intermediary situation, also not differing from the previous answer verified on the presence of $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil on the same subculture.

In face of the obtained results for this parameter, is verified that the addition of neem to the cultivation medium provide an elongation of the shoots in relation to the control treatment. This elongation can also be verified by the comparison of the obtained values on the present work, with the results being reported by Gyves et al. (2008) on the micropropagation of the same cultivar, where these authors quote the length of 3,8cm in shoots obtained through the regeneration of explants in a OM culture medium, added with $4,5 \mu\text{M}$ of zeatin. The results found here approximate, yet, from the best result quoted by the authors above, when the same obtained a shoots length of 4,8cm, using $33,8 \mu\text{M}$ of dikegulak added to the same OM medium.

In a similar way, the shoots length of the explants cultivated in OM medium, added with $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil, were also superior in all subcultures to the ones found by Micheli et al. (2010), comparing different cytokinins on the micropropagation of olive Moraiolo, and were also superior to the reports length

reported by Ali et al. (2009) for the majority of the studied treatments by these authors, having only one treatment with a culture medium containing 3 mg L^{-1} of zeatin and $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ of BAP, in which the result was equal the one obtained in this study, with shoots from up to 4,7cm.

Sghir et al. (2005) advocate about the importance of the shoots length on the olive micropropagation, affirming that this parameter is directly connected to the multiplication rate, since for this species only nods with a length of 10mm or more can be individualized and subcultivated; soon, a great quantity of nods extremely short cause losses on the quantity of usable nods and reduction of the multiplication rate.

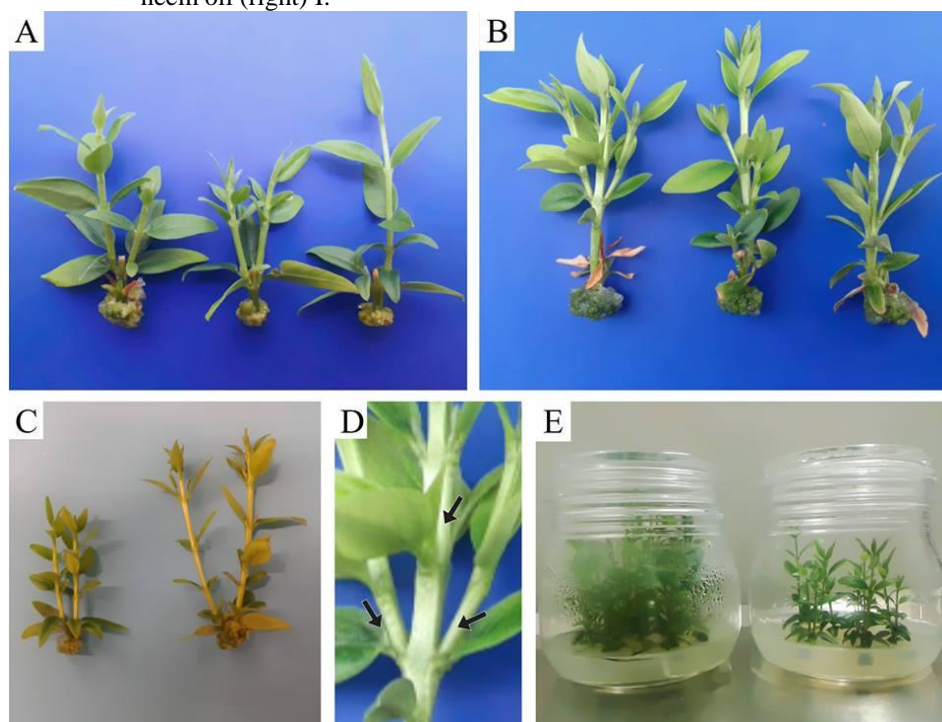
The olive is a characterized species by a strong apical dominance with a low axillar formation of secondary shoots (GYVES et al., 2008). Differently from explants from the majority of other woody species that usually produces a lot shoots after each subculture, olive uninodal explants with two great opposed lateral buds usually develop just one shoot or, occasionally, two, being the multiplication rate during the olive micropropagation determined by the quantity of new nods that are produced by original shoots of the lateral buds of the micro cutting used as explants (LEVA et al., 2013). Thus, a way to increase the multiplication rate, which is one of the main parameters to be considered on the *in vitro* multiplication, is the increase of the quantity of nods by regenerated shoots, since the buds are used as explants in new subcultures of the species.

Therefore, for this variable, occurred an interaction among the neem oil concentration added to the culture medium and subculture (Table 1). Among the concentrations, the highlight was for $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ that didn't differed from the control treatment in any of the three subcultures evaluated and, through the second subculture also presented a higher multiplication coefficient in relation to the control treatment, although this difference wasn't statistically significant.

Among the subcultures, the olive Moraiolo explants demonstrated a good regeneration capacity in three subcultures, not only on the treatment control, but also on the presence of $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil added to the culture medium, reaching the end of the third subculture without statistics differences of the first subculture on the treatment without the addition of neem oil, and with a superior result on the treatment containing $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ of neem oil, which raised the quantity of nods obtained by explants at the end of each subculture of 7,40 to 10,65 for inoculated explant.

Due this low growing of secondary lateral sprouts, one of the confining factors of the *in vitro* olive proliferation rate (LEVA et al., 2013), the neem oil effect over the growth of those sprouts alert a particular attention. Although there's a need for detailed studies for the comprehension about the neem oil action about the regeneration of *in vitro* olive explants, hypothesis points out the richness of compounds about this oil as main reason for the development of the secondary lateral sprouts in the shoots (Figure 1B-D).

Figure 1 - Olive cultivar Moraiolo explants with 45 days cultivated in culture medium without addition of neem oil (A) e culture medium added 0.1 ml L⁻¹ of neem oil (B); Comparison between explants grown without neem oil added to the culture medium (left) and with addition of 0.1 ml L⁻¹ neem oil (right) (C); detail of the secondary aprounts of shoots (D); vessel containing the explants grown with the addition of 0.1 ml L⁻¹ neem oil (left) and without neem oil (right) I.



The neem oil has 17 aminoacids among its constituents, among which all essential aminoacids, which, according to Djibril et al. (2015), can justify its nutritional quality. Among the found aminoacids on the neem oil, the major is the glutamic acid, precursor of the glutamine, which is fundamental on the efficiency of the nitrogen synthesis, being the first compound to be formed on the assimilation of this element and essential on the chlorophyll synthesis and other aminoacids. It also has tryptophan, which is the precursor of the acid indole-3-acetic, important phytohormone related to the plant's growth; glycine,

which is connected to the chlorophyll synthesis; *tyrosine* and *ssépticas ne*, precursors of phenolic acids connected to the plant's defense and lignin production, which is related to the sustentation of the vegetal, among other factors (DJIBRIL et al., 2015).

For the leaves number, the best result was also found on multiplied seedlings in substrate added with 0,1 ml L⁻¹ of neem oil (Table 1). Cultivated seedlings on this condition presented up to 30,58 leaves/seedling on the third subculture, turning this subculture superior compared with the previous two. Although superior to the previous subcultures, the addition of 0,1 ml L⁻¹ of neem oil wasn't statistically superior to the control treatment, only matching to it; however, it was possible to observe an increasing tendency in all treatments. The leaves number verified on this treatment is an answer to the increase of the internode number (multiplication rate), since each internode presents a pair of leaves. The quantity of leaves isn't a widely verified regeneration parameter of micro-propagated olive explants, but the same can offer important indicatives about the quality and vigor of new formed seedlings.

On the current literature, the number of leaves in seedlings of olive cultivar Moraiolo isn't reported; however, other cultivate from which is possible to find registers present a great variation, tied with a series of factors, among which the genotype, subculture duration, explant origin, gas exchanges between the container and the extern environment, and use of phytohormones. As an example it's possible to quote the Mission cultivate with a maximum of 1,26 leaves by explant in different BAP concentrations added to the medium; Ascolano 315 explant approximately 3,5 leaves in culture medium with 25ml L⁻¹ of coconut water; 1,20 leaves in Arbequina olive explants growing at *in vitro* establishment stage and 8,57 leaves on the subculture in different containers and 13,16 leaves for seedlings of Salomé cultivar, prevenient from the germination of embryos (DONINI et al., 2008; DONINI; FIGUEIREDO; SCHUCH, 2011;

ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012; SOUZA et al., 2012; VILLA; PASQUAL; FREITAS, 2010).

It also occurred a significant interaction for the fresh and dry mass of olive Moraiolo micropropagated by three successive subculture in a culture medium with different neem oil concentrations. In both cases, the concentration $0,1 \text{ MI L}^{-1}$ of neem oil proportionated, to the explants, the acquisition of a higher mass during its development in relation to the control treatment; however, the behavior about the mass assimilation was differentiated among the fresh and dry mass (Table 1).

The fresh mass presented a reduction tendency on the third subculture in relation to the first, but they weren't statistically different; the dry mass of the same culture medium maintained constant over the three subcultures, with an increase tendency at the end of the third subculture. Despite the variation on the fresh mass over the subcultures, the results found on the end of the third subculture on the present study were superior to the ones verified by Leva et al. (2013), which reports a 521mg explant, testing different sources and concentrations of carbohydrates for the olive seedlings cultivar Moraiolo in proliferation.

Micheli and Standardi (2005), testing pre-treatments in olive Moraiolo explants for regeneration also reports values of fresh mass inferiors to the ones contained in this study in micro cuttings at three different treatments and for mini cuttings in two of these treatments; however, in mini-cuttings with an inductive treatment combined to an initiation treatment, the authors obtained explants with 1037,7mp, overcoming the results found here.

The fresh mass of the plants can be used as a growth parameter, analyzed by the alteration of fresh weight in individuals at a determined period or diverse conditions (MARTINAZZO et al., 2007); however, the fresh mass can

suffer oscillations in relation to the hydric status of the plant, being, therefore, the most appropriate measure for the dry mass as a growth measure.

The accumulation of dry mass was higher with the addition of $0,1 \text{ ml L}^{-1}$, although it didn't occurred a variation for this parameter over the subcultures on this conditions. The plants growth is a complex process where the absorbed substances are incorporated in an irreversible way, leading to an increase of organs that can be measured by the increase of dry mass (COOL et al., 2001). This way, the raise of dry mass demonstrates the vegetable's real growth which, on the present study, can be verified with the addition of $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ of neem oil on the culture medium.

Despite the addition of neem oil have boosted the dry mass production on the Moraiolo olive explants, the results found are inferior compared with the ones reported by Ozair et al. (2014), which vary among 214,94 and 263,94 mg/seedlings in different concentrations of oryzalin, which presents a superior result of the neem oil due the fact it's a stimulant of the cellular division and elongation (PERES et al., 2001).

For all other analyzed variables, the addition of $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ of neem oil to the culture medium, the difference in relation to the control treatment wasn't statistically significant; however, it occurred an increase tendency in all values, which resulted in a higher vigor of the new produced seedlings. The higher vigor of the micro-propagated seedlings exercise an important role, especially on the moment of transfer for the ex vitro environment, where more vigorous plants are more capable to adapt themselves on the exterior environment (DEMO et al., 2008).

The addition of neem oil to the substrate showed promising initial results regarding the improvement of the micropropagation of olive cultivar Moraiolo; however, new detailed and more complex studies must be performed to obtain a better comprehension about the neem oil compounds, as well as its

mode of action on the physiological and biochemical aspects at a cultivation or species level, at *in vitro* olive explants and so that, in the future, it be allowed to adopt a standardized compound to be added on the culture medium for the production of micro-propagated olive seedlings.

4 CONCLUSION

The addition of 0.1 ml L⁻¹ of neem oil to the culture medium provides for obtaining olive seedlings cultivar Moraiolo with higher quality and vigor.

REFERENCES

ALI, A. et al. Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n.2, p.783-795, 2009.

BALLA, I.; MANSVELT, L. Micropropagation of peach rootstocks and cultivars. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v.11013, p.137-48, 2013.

COOL, J. B. et al. Crecimiento y desarrollo: características general del crecimiento, Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, Etileno y poliaminas, Ácido abscísico y otros inibidores. In: COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S.; TAMÉS, R. S. (Eds.) **Fisiología vegetal**. Madrid: Ediciones Pirámide. 2001. p. 295-376.

CYR, K. Effects of foliar and soil applications of cold-pressed neem oil solutions on vigor and leaf phytotoxicity in cucurbits. **University of Wisconsin Colleges Student Research Journal**, Madison, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2014.

DEMO, P. et al. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micropropagation of potato. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 15, p. 2578-2584, 2008.

DEVI, N.; MAJI, T. K. Neem Seed Oil: Encapsulation and Controlled Release – Search for a Greener Alternative for Pest Control. In: STOYTCHEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management**. Rijeka: InTech, 2011. p. 192-232.

DJIBRIL, D. et al. Physical characteristics, chemical composition and distribution of constituents of the neem seeds (*Azadirachta indica* A. Juss) collected in Senegal. **Research Journal of Chemical Sciences**, Indore, v. 5, n. 7, p. 52-58, 2015.

DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J. A. Micropropagation of apple – a review. **Biotechnology Advances**, Nova York, v. 28, n. 4, p. 462-488, 2010.

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

DONINI, L. P. Et al. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequina” para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, 2008.

GYVES, E. M. et al. Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 233-238, 2008.

KAVAND, S. et al. Micropropagation and medium-term conservation of *Rosa pulverulenta*. **Acta Scientiarum – Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 297-301, 2011.

LEVA, A.; SADEGHI, H.; PETRUCCELLI, R. Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots I. The analysis of shoot growth and branching patterns. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 53-60, 2013.

LOKANADHAN, S.; MUTHUKRISHNAN, P.; JEYARAMAN, S. Neem products and their agricultural applications. **Journal of Biopesticides**, Palayamkottai, v. 5, supplementary, p. 72-76, 2012.

MANGAL, M. et al. *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L., cv ‘Frontio’ from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 52, n. 9, p. 912-916, 2014.

MARTINAZZO, E. G. Et al. Efeito do Sombreamento sobre o Crescimento Inicial e Teor de Clorofila Foliar de *Eugenia uniflora* Linn (Pitanga) – Família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 162-164, 2007 (Suplementar 2).

MENCUCCINI, M.; MICHELI, M.; STANDARDI, A. Micropropagazione dell’olivo: effetto di alcune citochinine sulla proliferazione. **Italus Hortus**, Florença, v. 4, n. 6, p. 32-37, 1997.

MICHELI, M. et al. *In vitro* proliferation of olive (‘Dolce Agogia’ and ‘Moraiolo’): effect of different cytokinins. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 884, p. 587-590, 2010.

MICHELI, M.; STANDARDI, A. Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (cv. Moraiolo). I: Effects of pretreatments, their size and the coating. **Current topics in biotechnology**, Thiruvananthapuram, v. 2, p. 81-86, 2005.

MOLNÁR, Z.; VIRÁG, E.; ÖRDÖG, V. Natural substances in tissue culture media of higher plants. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 55, n. 1, p. 123-127, 2011.

OZAIR, M. et al. Effect of different concentrations of Oryzalin on *In vitro* growth of explants of Olive cv. Moraiolo. **Scholarly Journal of Agricultural Science**, Abuja, v. 4, n. 1, p. 51-59, 2014.

PERES, L. E. P.; MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, E. G. B. Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 185-195, 2001.

RKHIS, A. C. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. **Turkish Journal of Agricultural and Forestry**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 403-412, 2011.

ROSTAMI, A. A.; SHAHSAVAR, A. R. *In vitro* Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.) 'Mission' by Nodal Segments. **Journal of Biological and Environmental Science**, Bursa, v. 6, n. 17, p. 155-159, 2012.

SANTOS, E. O. et al. Multiplicação de bastão-do-imperador em resposta a concentrações de BAP e número de subcultivos. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2016.

SGHIR, S. et al. Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 1, p. 193-196, 2005.

SILVA, L. F. O. et al. Enraizamento de estacas semi-lenhosas de oliveira. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 4, p. 488-492, 2012.

SOUZA, R. A. V. Efeito da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, 2012.

SOUZA, R. A. V. et al. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 290-296, 2013.

THORPE, T. A. et al. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and Ph effects, and support systems. In: GEORGE, E. F.;

HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. Ed. Dordrecht: Springer-Verlag, 2008. v.1. p. 115-173.

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

CAPÍTULO 3 Novas abordagens para o enraizamento *in vitro* de oliveira interagindo fatores abióticos

Daniel Fernandes da Silva¹, Maurizio Micheli², Michela Alliegro², Rafael Pio³

A micropropagação da oliveira ainda não é uma realidade no mercado devido a diversos fatores, dentre os quais, a dificuldade de enraizamento da espécie. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a combinação de diferentes fatores, entre os quais a utilização de AIB, indução na ausência de luz, concentração de sais e diferentes meios de cultura/substratos no enraizamento *in vitro*, para potencializar o enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo. Foram desenvolvidos três experimentos, todos *in vitro*. O experimento 1 objetivou avaliar a interação entre a concentração de sais do meio de cultura, a concentração de AIB e a realização de indução com escuro nos explantes; o experimento 2 analisou a utilização de AIB, o escurecimento do meio de enraizamento e a indução dos explantes com escuro; e o experimento 3, buscou a redução no tempo e custo de mudas micropropagadas de oliveira por meio de um enraizamento *in vitro* em substrato semelhante ao utilizado na aclimatização de mudas micropropagadas de oliveira, juntamente com a indução dos explantes ao enraizamento. Em todos os experimentos brotações regeneradas *in vitro*, foram submetidas ao enraizamento por 45 dias de acordo com o respectivo experimento ao qual pertenciam, sendo mantidas em câmara de crescimento a 23 °C ±1 e fotoperíodo de dezesseis horas de luz. Ao fim de cada experimento foram avaliados a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante, o comprimento médio das raízes, a massa fresca e a massa seca das raízes. Conclui-se que a concentração ideal de AIB para enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo *in vitro* é 2 mg L⁻¹ e a indução dos explantes com 72 horas de escuro aliada a 2 mg L⁻¹ de AIB melhora a qualidade das raízes formadas. O meio OM, com metade da concentração de sais, aumenta a massa das raízes formadas e é suficiente para o enraizamento dos explantes de oliveira Moraiolo. O escurecimento do meio de cultura com 150 mg L⁻¹ de Brilliant Black[®] aumenta o número de raízes formadas e, o substrato composto

¹Departamento de Biologia (DBI) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil. Bol. Capes-prot. n°99999. 006582/2015-00

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali - Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy.

³Departamento de Agricultura (DAG) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil.

por turfa e areia na proporção 3:1 (v:v) não foi eficiente para o enraizamento direto *in vitro*.

Palavras-chave: *Olea europaea* L.. Propagação vegetativa. Meio de cultura. Fitormônio. Substrato.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira pode ser propagada por diferentes métodos, dentre os quais sementes, alporquia, enxertia e estacas caulinares, com destaque para este último método que se apresenta relativamente simples, sendo capaz de preservar o material genético da planta matriz (ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012).

Apesar da simplicidade no método de propagação por estaquia, quando realizado sob nebulização em casas de vegetação, problemas como a alternância na capacidade de enraizamento de estacas coletadas em diferentes períodos do ano; variação no potencial rizógeno de diferentes genótipos; além de dificuldades para encontrar material vegetal com adequada qualidade sanitária, indicam que um método de propagação massivo de oliveiras mais eficiente é necessário (MANGAL et al., 2014).

Visando suprir esta necessidade, a micropropagação apresenta-se como método que permite a produção de plantas com alta qualidade e rápido crescimento (MANGAL et al., 2014), tendo sido largamente utilizada por meio da proliferação de gemas axilares derivadas de brotações laterais ou meristemas, seguidos pelo enraizamento dessas brotações alongadas, todavia, o sucesso da micropropagação aplicada a oliveiras é dependente da cultivar e características genéticas da planta matriz, podendo a técnica apresentar uma série de problemas durante as diferentes fases de execução, entre os quais limitação no enraizamento de explantes (RUGINI; GUTIERREZ-PESCE; SAMPINATO, 1999).

A formação de raízes em explantes *in vitro* é um passo crucial na micropropagação de espécies lenhosas. O enraizamento *in vitro* depende de muitos fatores endógenos e exógenos como o aporte genético, influências fisiológicas, idade e fase ontogenética da planta mãe, condições do ambiente (luz e temperatura) e composição do meio nutritivo (DAG et al., 2012). Em oliveiras o enraizamento geralmente ocorre em meio de cultivo com baixa concentração de sais e contendo auxina, embora o enraizamento também possa ocorrer em meio livre de hormônio ou contendo carvão ativado (ALI et al., 2009), o que demonstra que as condições ideais para o enraizamento *in vitro* podem variar.

Pela boa qualidade do azeite apresentado pela cultivar Moraiolo, novos olivais são implantados e, para tanto, existe uma demanda de novas plantas para constituição dos mesmos, contudo, esta variedade apresenta capacidade rizogena que varia entre baixa e média (LORETI; MORINI, 2012), constituindo um entrave na produção de mudas desta cultivar.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a combinação de diferentes fatores, entre os quais a utilização de AIB, indução na ausência de luz, concentração de sais e diferentes meios de cultura/substratos no enraizamento *in vitro*, para potencializar o enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo micropropagada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no laboratório de cultura *in vitro* do Departamento de Arboricultura da Università degli Studi di Perugia (Itália), no período compreendido entre outubro de 2015 e julho de 2016.

O material vegetal utilizado foi explantes de oliveira cultivar Moraiolo, muito difundida na Itália central, sobretudo na Umbria. Este material é

representado por brotações regeneradas ao final de uma subcultura de proliferação, em meio de cultura denominado Olive Medium (OM) (RUGINI, 1984), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 4 mg L⁻¹ de zeatina e solidificado com 7 g L⁻¹ de agar, crescida em câmara climatizada por 45 dias a uma temperatura de 23°C ± 1, intensidade luminosa de 40 µE m⁻² sec⁻¹ e um fotoperíodo de 16 horas de luz.

O trabalho foi constituído de três experimentos, todos conduzidos inteiramente *in vitro*, com o objetivo de melhorar o processo de enraizamento de plântulas de oliveira. Para a realização de todos os experimentos foram utilizados recipientes de vidro com capacidade de 500 ml, contendo diversos meios de cultura/substratos de acordo com o experimento ao qual pertenciam e 10 explantes iniciais em cada vaso. A manipulação do material ocorreu em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar horizontal, depois que os recipientes contendo os devidos meios de cultura/substratos foram esterilizados em autoclave a 115° por 20 minutos.

Os dados recolhidos foram submetidos a análise de variância pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011) e os resultados apresentados pelo teste de agrupamento de médias Skott-Knott a $\alpha < 0,05$.

2.1 Experimento 1: Interação entre concentração de sais do meio de cultivo, concentração de AIB e indução inicial de explantes

O objetivo desse experimento foi verificar a interação entre três dos principais fatores que podem influenciar o enraizamento de oliveira *in vitro*: a composição do meio de cultura e a concentração de fitoreguladores e tratamentos indutivos dos explantes. Desta forma, buscou-se com este experimento, estabelecer uma combinação exata que permita a redução de custos

e tempo de enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo, por meio da combinação desses três fatores.

Utilizou-se duas concentrações de sais do meio de cultivo OM (OM e OM/2), quatro concentrações de AIB (0, 2, 4 e 5 mg L⁻¹) e presença ou ausência de indução ao enraizamento dos explantes inoculados; a indução consistiu na submissão dos recipientes com as brotações já transferidas há 72 duas horas de escuro, proporcionado pelo envolvimento dos mesmos com uma folha de papel alumínio, mantendo-os em condições de cultivo anteriormente descritas. Transcorrido este período, o papel alumínio foi removido e os recipientes repostos novamente em câmara de crescimento por 42 dias para completar a fase de enraizamento. As distribuições dos tratamentos foram feitas de acordo com o descrito na Tabela 1.

Ao fim do período de enraizamento foram avaliados a porcentagem de explantes enraizados, o número de raízes por explante, o comprimento médio das raízes, massa fresca e massa seca das raízes.

Tabela 1 - Constituição dos tratamentos do experimento1.

Tratamentos	Meio de cultura	AIB (mg L ⁻¹)	Indução
1	OM	0	Com
2	OM	2	Com
3	OM	4	Com
4	OM	5	Com
5	OM/2	0	Com
6	OM/2	2	Com
7	OM/2	4	Com
8	OM/2	5	Com
9	OM	0	Sem
10	OM	2	Sem
11	OM	4	Sem
12	OM	5	Sem
13	OM/2	0	Sem
14	OM/2	2	Sem
15	OM/2	4	Sem
16	OM/2	5	Sem

Fonte: SILVA (2017).

2.2 Experimento 2: Interação entre AIB, indução de explantes e escurecimento do meio de cultura

Com base nos resultados obtidos no primeiro experimento, decidiu-se interagir esses três elementos com particular atenção ao efeito do escurecimento do meio de cultivo.

Para este experimento utilizou-se duas concentrações de AIB (0 e 2 mg L⁻¹), representando a presença e ausência deste fitoregulador; utilização ou não de indução dos explantes por meio do envolvimento dos recipientes que foram submetidos a este tratamento com papel alumínio por 72 horas, com posterior retorno as condições anteriormente descritas de enraizamento; e meios de cultura de enraizamento com três diferentes formas de escurecimento.

Os meios de cultura utilizados foram escurecidos com Brilliant Black BN[®] (SIGMA-ALDRICH) a uma concentração de 150 mg L⁻¹ e com carvão ativado na concentração de 3 g L⁻¹. O terceiro meio de cultura utilizado foi um tratamento controle, sem escurecimento, permanecendo assim, com coloração translúcida. Todos os outros componentes do meio de cultura foram adicionados em concentrações idênticas em todos os tratamentos, sendo eles: OM com metade da concentração de sais, 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar.

Os explantes a serem enraizados foram brotações regeneradas conforme descrito no início desta seção. Essas brotações no momento em que foram utilizadas tiveram sua parte basal removida e, posteriormente, foram transferidas para os devidos tratamentos de acordo com as combinações estabelecidas na Tabela 2, sendo posteriormente levados para condições de crescimento anteriormente citadas.

Depois de 45 dias de crescimento, foram avaliados a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante, o comprimento médio das raízes, a massa fresca e a massa seca das raízes.

Tabela 2 - Constituição dos tratamentos do experimento 2.

Tratamentos	AIB (mg L ⁻¹)	Agentes de escurecimento	Indução
1	0	Carvão ativado	Sem
2	0	Brilliant Black [®]	Sem
3	0	Controle	Sem
4	0	Carvão ativado	Com
5	0	Brilliant Black [®]	Com
6	0	Controle	Com
7	2	Carvão ativado	Sem
8	2	Brilliant Black [®]	Sem
9	2	Controle	Sem
10	2	Carvão ativado	Com
11	2	Brilliant Black [®]	Com
12	2	Controle	Com

Fonte: SILVA (2017).

2.3 Experimento 3: Efeito do meio de cultura/substrato e do modo de aplicação do AIB sobre o enraizamento de oliveiras *in vitro*.

Objetivou-se com o presente experimento reduzir o tempo de produção de mudas, bem como o custo da fase de aclimatização de novas plantas. Para alcançar esse objetivo, pensou-se em possibilitar o enraizamento de explantes com 45 dias de idade, regenerados a partir de segmentos uninodais, diretamente no substrato no qual é feita fase de aclimatização após a transferência do ambiente *in vitro* para *ex vitro*, permitindo uma adaptação ao novo substrato de cultivo mais rápida, bem como a retomada da capacidade de crescimento de forma mais acelerada e, finalmente, chegar à fase de comercialização em tempo mais curto.

Neste experimento, foram comparados quatro modos de aplicação de AIB em dois meios de cultura/substratos. O meio de cultura utilizado foi aquele convencionalmente usado na micropropagação de oliveira durante a fase de enraizamento, constituído de meio de cultura OM com metade da concentração de sais, 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar e, o substrato adotado para o

experimento foi aquele utilizado na aclimatização de plântulas jovens de oliveira micropropagadas composto pela mistura de turfa e areia na proporção 3:1 v:v, esterizado e mantido sempre *in vitro*.

Em particular, para o meio de cultura agarizado, foi feita a escolha de utilização do meio de cultura OM com concentração estabelecida em função dos melhores resultados obtidos nos experimentos precedentes. A indução dos explantes foi feita por meio da imersão da parte basal do explante em solução, a uma concentração de 5 g L^{-1} de AIB + 15 g L^{-1} de sacarose, por 72 horas, em condição de escuro, com posterior transferência para meio de cultura/substrato a ser testado.

A distribuição dos tratamentos a serem avaliados foi a seguinte:

- a) Tratamento 1 (T1): meio de cultura convencional + 2 mg L^{-1} de AIB;
- b) Tratamento 2 (T2): turfa + areia + 2 mg L^{-1} de AIB + 15 g L^{-1} de sacarose;
- c) Tratamento 3 (T3): meio de cultura convencional + explantes induzidos;
- d) Tratamento 4 (T4): turfa + areia + 15 g L^{-1} de sacarose + explantes inoculados;

Passado o período necessário para enraizamento de 45 dias foram avaliados a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante, o comprimento médio das raízes, a massa fresca e massa seca das raízes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Primeiro experimento

Os resultados obtidos mostram diferença estatística entre as concentrações de AIB, evidenciando a necessidade de utilização do regulador de crescimento para o enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo

(Tabela 3). Embora a utilização de AIB assegure um alto percentual de enraizamento, é possível observar que também na ausência total deste regulador de crescimento, o percentual de enraizamento de oliveira Moraiolo *in vitro* foi alto, superando 90%.

Tabela 3 - Porcentagem de enraizamento, número de explantes por raiz.

Concentração de AIB (mg L ⁻¹)	Porcentagem de enraizamento	Número de raízes/explante
0	91,67b*	1,85b
2	98,33a	5,11a
4	98,33a	4,90a
5	99,16a	4,85a
CV	7,17	31,40

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos estão de acordo com a pesquisa de Rostami e Shahsavar (2012) que confirmaram a necessidade de utilização de AIB para um maior enraizamento de explantes de oliveira. Estes autores verificaram que para a cultivar Mission a utilização de 6 mg L⁻¹ di AIB garante um enraizamento de 93% ao passo que sem a utilização do regulador de crescimento não se obtém enraizamento nestas condições para esta cultivar.

Também Moshtaghi e Shahsavar (2011) observaram a necessidade de utilização de AIB para um maior enraizamento na micropropagação de oliveira. Estudando duas cultivares de oliveira com potencial rizógeno diverso, estes pesquisadores demonstraram como a capacidade de enraizamento está ligada ao genótipo, sendo que cada cultivar estudada demonstrou uma resposta à concentração de AIB utilizada e, sobretudo, a ausência de AIB no meio de cultivo. Nesse sentido, a cultivar Moraiolo demonstra ser menos exigente na concentração de AIB no meio de enraizamento em relação as cultivares estudadas por estes autores.

Quanto ao número de raízes desenvolvidas em cada explante, também se observa influência da concentração de AIB (Tabela 3). A ausência de AIB no meio de cultivo leva ao desenvolvimento de poucas raízes, comprometendo uma posterior fase de aclimatização. Ao mesmo tempo concentrações de 2, 4 e 5 mg L⁻¹ de AIB não mostram diferença estatística sugerindo a possibilidade de utilização de 2 mg L⁻¹ por propiciar redução do consumo do regulador de crescimento e conseqüente redução no custo final de produção da muda.

Existem diversos estudos que relatam um efeito positivo do uso de AIB no aumento do número de raízes desenvolvidas em explantes de oliveira micropropagados, a exemplo de Moshtaghi e Shahsavari (2011) nas cultivares Tokhmkabki e Roghani; Rostami e Shahsavari (2012) na cultivar Mission; e Padilla, Vidoy e Encina (2009) para as cultivares Arbequina, Manzanilla de Sevilla e Gordao Sevillana.

Outro parâmetro importante para o enraizamento *in vitro* é o comprimento das raízes. As raízes formadas devem apresentar um comprimento tal, que permita a manipulação da nova plântula de forma simples, evitando possíveis danos no momento do transplante. No presente trabalho verifica-se interação significativa entre a concentração de AIB e a realização de indução no que diz respeito ao comprimento das raízes (Tabela 4).

Em particular, não houve diferença entre os tratamentos nos quais os explantes sofreram tratamento indutivo, diferentemente dos tratamentos em que não houve indução, onde se pode verificar variação, a exemplo das concentrações de 0 e 4 mg L⁻¹ que foram superiores aos demais tratamentos sem indução.

Dentro das concentrações estudadas, na ausência de regulador de crescimento no meio de cultura, os resultados são estatisticamente iguais independente da realização ou não de indução nos explantes. Com a adição de baixa concentração de AIB ao meio (2 mg L⁻¹) a realização de indução torna-se

interessante, propiciando um resultado superior ao tratamento sem indução, contrariamente ao maior valor que foi encontrado no meio de cultura com 4 mg L⁻¹ de AIB, sem indução.

Tabela 4 - Comprimento de raízes de explantes de oliveira cultivar Moraiolo enraizados em meio de cultura com diversas concentrações de AIB e submetidos a tratamento indutivo com 72 horas de escuro após inoculação.

Concentração de AIB (mg L ⁻¹)	Com indução	Sem indução
0	23,40aA*	23,61aA
2	24,10aA	17,00bB
4	19,79aB	27,66aA
5	19,22aA	20,69bA
CV	25,46	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

À luz dos resultados obtidos é possível afirmar que a indução tem influência sobre o enraizamento dos explantes. Esta afirmação é confirmada por Souza e Pereira (2007) que dizem que a presença de luminosidade reduz a concentração de auxina endógena e também leva ao acúmulo de fenóis e subprodutos que inibem o enraizamento.

Ainda em relação a estes resultados é possível afirmar que, embora estatisticamente não tenha sido encontradas diferenças, a ausência de AIB permite, contudo, a obtenção de raízes com comprimento adequado após 45 dias de cultivo.

A massa de raiz de um explante é outro parâmetro que pode ser avaliado para medir o crescimento de plântulas ou parte dessas. Essa medida pode ser tanto da massa fresca quanto seca. O resultado da análise estatística mostrou um efeito da concentração de AIB e da concentração da componente nutritiva do meio de cultura separadamente (Tabela 5).

Assim como observado no percentual de enraizamento e número de raízes por explante, a adição de AIB no meio de cultura determina um aumento da massa fresca de raízes. As concentrações comparadas não mostraram diferença estatística, indicando a concentração de 2 mg L⁻¹ como concentração suficiente para um bom crescimento e acúmulo de massa na raiz.

Em concordância com os dados encontrados neste estudo, Rahdari Khosroabadi e Delfani (2014) verificaram um aumento da massa fresca de raízes em explantes de cróton (*Cordyline terminalis* L.) com adição de AIB ao meio de cultura. Estes autores atribuíram este aumento da massa à capacidade da auxina de promover uma diferenciação celular dos tecidos vasculares e um incremento do fluxo de materiais nos vasos condutores. O efeito da concentração de AIB sobre o crescimento da massa fresca de raízes pode ser verificada também na propagação *ex vitro* de oliveira como demonstrado por Khajehpour, Jam'Eizadeh e Khajehpour (2014) na cultivar Manzanilla, na qual 3 mg L⁻¹ de AIB determinou um aumento da massa fresca de raízes 2,5 vezes maior que o tratamento controle.

Tabela 5 - Massa fresca e massa seca de raiz de plântulas de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas in vitro em função da concentração de AIB e de sais no meio de cultura.

Concentração de AIB (mg L ⁻¹)	Massa fresca de raiz (g)	Massa seca de raiz (g)
0	0,03b*	0,005b
2	0,26a	0,032a
4	0,33a	0,038a
5	0,33a	0,040a
CV	40,16	44
Meio de cultura	Massa fresca de raiz (g)	Massa seca de raiz (g)
OM	0,19b	0,023b
OM/2	0,28a	0,033a
CV	40,16	44

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A composição do meio de cultura é relatada como um importante fator para a micropropagação de oliveira. Existem diversos meios de cultura e composições que já foram testados para a micropropagação da oliveira, a exemplo de Rkhis et al. (2011), que testaram três diferentes meios de cultura para a micropropagação da cultivar Oueslati.

Em relação a capacidade nutritiva do meio de cultura, se pode observar que a redução de sais à metade da concentração, permite um enraizamento mais eficiente em relação ao meio de cultura com a concentração inteira do meio OM.

Estes resultados estão de acordo com a indicação de Ruggini e Baldoni (2011) para o enraizamento *in vitro* de explantes de oliveira; estes sugerem que para o enraizamento de oliveira se pode utilizar um meio de cultura composto pelo meio de cultura OM, a metade da concentração, sempre associado ao uso de auxina.

A redução da concentração de sais promoveu resultados positivos no enraizamento de muitas espécies. Segundo Wang, Yuangang e Hongmei (2007) o aumento da massa em função de uma concentração reduzida de sais no meio de cultura é consequência de uma concentração de nitrogênio menor, uma vez que este elemento é associado a um maior crescimento da parte vegetativa. Assim como ocorrida para massa fresca das raízes, também para a massa seca foi observado um efeito da concentração de AIB e da concentração do componente nutritivo separadamente (Tabela 5).

Em relação à concentração de AIB, somente o tratamento controle demonstrou ser inferior aos demais que, todavia, não demonstraram diferenças entre si. Diante desses resultados, a concentração de 2 mg L^{-1} se mostra novamente a concentração ideal do ponto de vista técnico e econômico.

Também para a massa seca das raízes a concentração do meio OM reduzida pela metade demonstrou-se melhor. A maior quantidade de massa seca,

nos mesmos tratamentos nos quais se verificou maior quantidade de massa fresca, indica um crescimento regular e uma assimilação satisfatória de substâncias minerais do meio.

De acordo com estes resultados, Fotopoulos e Sotiropoulos (2005) afirmam que a concentração de sais do meio reduzida à metade também é eficiente em outros meios de cultivo, e para outras espécies como o porta-enxerto PR 204/84 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) que apresenta melhor enraizamento em meio MS com metade da força.

Em síntese, após análise de todos os parâmetros avaliados neste experimento, de forma geral, pode-se recomendar para o enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo, a utilização de 2 mg L⁻¹ de AIB adicionados ao meio de cultivo OM com metade da concentração de sais, juntamente com indução dos recipientes com os explantes inoculados em 72 horas de escuro.

3.2 Segundo experimento

A partir da observação do efeito da indução sobre o comprimento de raízes e do benefício da utilização de AIB sobre o número, comprimento, massa fresca e massa seca do aparato radicular e que mesmo sobre ausência de AIB se pode obter um expressivo percentual de enraizamento, verificou-se então, o efeito da adição de AIB ao meio de cultura para enraizamento, juntamente com outros parâmetros que possam viabilizar o processo rizógeno, entre eles o escurecimento do meio de cultura e a realização de indução inicial submetendo os explantes a um período de 72 horas de escuro durante os três primeiros dias após a inoculação.

O resultado desse segundo experimento mostrou interação entre a presença ou ausência de AIB e o tipo de escurecimento do meio de cultura para todos os parâmetros avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Percentagem de enraizamento, número, comprimento e massa fresca e massa seca de raízes de plântulas de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas em meio de cultura com e sem AIB e diferentes formas de escurecimento.

Concentração de AIB (mg L ⁻¹)	Tipo de escurecimento do meio		
	Controle	Carvão ativado	Brillant Black [®]
	Percentagem de enraizamento (%)		
0	18,33bB*	71,67aA	80,83aA
2	100,00aA	95,00aA	98,33aA
CV(%)	19,35		
	Número de raízes		
0	0,98bA	1,90aA	2,05bA
2	4,95aB	1,34aC	6,55aA
CV(%)	13,51		
	Comprimento de raízes (cm)		
0	2,63bB	4,67aA	4,06aA
2	4,46aA	4,43aA	4,56aA
CV(%)	17,85		
	Massa fresca de raízes (g)		
0	0,005bA	0,019aA	0,020bA
2	0,175aA	0,014aB	0,160aA
CV(%)	1,22		
	Massa seca de raízes (g)		
0	0,001bA	0,004aA	0,004bA
2	0,025aA	0,003aB	0,023aA
CV(%)	0,50		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A porcentagem de enraizamento quando se utiliza um meio de cultura escuro, independentemente do tipo de substância utilizada para realização deste escurecimento, não apresenta diferença estatística na ausência de AIB no meio, com resultados iguais entre os meios de cultura escurecidos com carvão ativado

e Brilliant Black[®], porém, ambos superiores ao meio de cultura controle, sem escurecimento.

O enraizamento *in vitro* de plântulas de oliveira está associado a muitos elementos, entre os quais fatores ambientais, como a luz. A adição de substâncias para reduzir a iluminação do meio de cultura as tornam mais similares ao solo, criando condições mais favoráveis ao desenvolvimento de raízes e pode ainda atuar de outras formas, como por exemplo, interferindo no controle hormonal endógeno, sobretudo em relação a síntese de auxinas.

Corroborando o maior enraizamento em meios de cultura escuros quando não há ausência de auxinas, a sensibilidade do explante de oliveira ao escurecimento do meio de cultura para o enraizamento é relatada também por Mencuccini (2003) nas cultivares Frantoio e Dolce Agogia.

Na presença de AIB na concentração de 2 mg L⁻¹ o meio de cultura claro não difere dos demais, com alta porcentagem de enraizamento, todavia, é o único meio de cultura em que a presença de AIB é fundamental, com enraizamento de 100 % dos explantes, contra apenas 18,33% de explantes enraizados sem AIB no meio.

A necessidade de utilização de AIB para o enraizamento de oliveira quando o mesmo ocorre em meio de cultura transparente também foi reportada por Ali et al. (2009) para a variedade Moraiolo, os quais obtiveram percentual de enraizamento de 53,33 e 0 utilizando, respectivamente, 2 e 0 mg L⁻¹ de AIB. Também para outras cultivares é descrita a necessidade de utilização de AIB quando o meio de cultura utilizado no enraizamento é translúcido, a exemplo da cultivar Mission (ROSTAMI; SHAHSAVAR, 2012) e para a cultivar Dolce Agogia (HAQ et al., 2009).

Em relação ao número de raízes, novamente houve interação entre o fator AIB e a substância de escurecimento do meio de cultura. Entre a ausência de AIB e sua presença na concentração de 2 mg L⁻¹ no meio, somente o

tratamento com carvão ativado mostrou comportamento diferenciado, não apresentando variação estatística. Para os demais meios, a presença de auxina propiciou um aumento no número de raízes por explante (Tabela 6).

O meio de cultivo escurecido com Brilliant Black[®] novamente foi superior ao meio de cultura escurecido com carvão ativado e no tratamento controle independente da presença de auxina no meio de cultura, todavia na presença 2 mg L⁻¹ de AIB no meio de cultura o número de raízes crescidas foi ainda melhor, atingindo 6,55 raízes por explante, contra 2,05 raízes no meio de cultura sem AIB.

O efeito da auxina sobre a promoção do enraizamento pode ser atribuído ao seu papel na estimulação da divisão celular no câmbio vascular que leva a formação dos primórdios radiculares. Em concordância a esta afirmação, Padilla, Vidoy e Encina (2009) encontraram um maior número de raízes em explantes de oliveira cultivar Arbequina, enraizados em meio de cultura com presença de 1 mg L⁻¹ de AIB em relação ao tratamento controle sem a presença desta auxina.

O Brilliant Black[®] demonstrou ter um efeito superior aos demais tratamentos em relação ao número de raízes desenvolvidas por explante. Contrariamente ao encontrado para a porcentagem de enraizamento, para o número de raízes o tratamento com carvão ativado teve o pior resultado, inferior até mesmo ao tratamento sem escurecimento do meio de cultura.

Geralmente a adição de carvão ativado em meios de cultura para o enraizamento *in vitro* tem resultado benéfico, condicionado pela concentração de carvão ativado utilizado, tanto é que, concentrações elevadas, demonstram resultados danosos (THOMAS, 2008). Tudo isso pode ajudar a compreender os resultados observados no presente estudo em relação ao número de raízes desenvolvidas na presença de carvão ativado a 3 g L⁻¹.

No que diz respeito ao comprimento médio da raiz também se verificou interação significativa entre a presença de AIB e a forma de escurecimento do

meio de cultura (Tabela 6). Em meios de cultura escuros, a presença de AIB não apresentou efeito para este parâmetro, apresentando um resultado positivo, com raízes de maior comprimento, somente no meio de cultura controle, onde não foi utilizada nenhuma substância para escurecimento do meio. Já entre as formas de escurecimento testadas não houve diferença significativa entre o carvão ativado e o Brilliant Black[®] na ausência de AIB, sendo ambos superiores ao meio de cultivo controle, de coloração translúcida, contudo uma vez inserido 2 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultura nenhum dos meios diferenciou-se estatisticamente.

Os resultados encontrados demonstram que tanto o escurecimento quanto a utilização de AIB exercem algum efeito sobre o alongamento de raízes de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas *in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados por Haq et al. (2009) e Rostami e Shahsavari (2012) que confirmam o alongamento de raízes adventícias geradas em explantes de oliveira de diferentes cultivares, quando enraizadas com presença de AIB no meio de cultura.

Em estudo realizado com a cultivar Moraiolo *in vitro*, Ali et al. (2009) confirmam o efeito da presença de AIB no alongamento das raízes formadas em explantes de oliveira enraizadas *in vitro* e corrobora com outros autores, que explicam que este alongamento ocorre porque enzimas envolvidas no processo de crescimento celular, tem sua síntese desencadeada pela presença de auxinas (COSGROVE, 2005).

Os resultados também demonstram que o escurecimento do meio favorece o alongamento de raízes adventícias, pois, no meio, sem a presença de AIB, os dois meios escuros apresentaram raízes mais longas, todavia não diferiram estatisticamente entre si. Já na presença do fitormônio enraizador no meio de cultivo os meios escuros não apresentaram diferença estatística do tratamento controle.

O escurecimento do meio de cultura favorece o desenvolvimento de raízes por reduzir a incidência da luz na zona de crescimento do sistema radicular, podendo ainda, quando realizado com carvão ativado, favorecer este desenvolvimento por adsorver substâncias tóxicas, principalmente fenóis e/ou quinonas que afetam o desenvolvimento das raízes (VILLA et al., 2007). Desta forma, o escurecimento do meio é reportado como fator que propicia o alongamento do sistema radicular em algumas espécies lenhosas (LÉDO et al., 2007).

Em relação à massa das raízes, houve uma interação entre a presença/ausência de AIB no meio de cultura e o escurecimento do meio, com especial atenção para a utilização de carvão ativado como agente propiciante de escurecimento físico deste meio de cultura (Tabela 6).

A presença de 2 mg L⁻¹ de AIB no meio de cultura resultou em uma maior massa fresca e seca de raízes, tanto no tratamento controle quanto no tratamento que continha Brilliant Black[®], contudo, no meio de cultura escurecido com carvão ativado, não houve diferença entre os tratamentos com e sem AIB. Já no que diz respeito ao tipo de escurecimento do meio de cultura, novamente somente o meio de cultura escurecido com carvão ativado demonstrou ser inferior aos demais no meio acrescido de AIB, ao passo que no meio sem fitormônio não houve diferença entre os tratamentos, tanto para massa fresca quanto para massa seca.

Tal resultado pressupõe uma absorção da auxina presente no meio pelo carvão ativado. A alta capacidade de adsorção de elementos do meio de cultura é reportada por Thomas (2008), sendo esta, uma das principais características da aplicação deste elemento a meios de cultura destinados a micropropagação, pois, desta forma, a adsorção de elementos prejudiciais à multiplicação celular, como por exemplo, compostos fenólicos, aumenta o sucesso regenerativo nas

diferentes fases da micropropagação, tornando-a uma técnica viável do ponto de vista econômico e científico para algumas espécies.

A capacidade de adsorção de AIB em meio de cultura adicionado de carvão ativado é relatada por Arthur, Stirk e Van Staden (2006), suportando desta forma, a hipótese de redução na massa fresca e seca de raízes de oliveira, cultivar Moraiolo, micropropagada em meio de cultura contendo 3 g L^{-1} de carvão ativado devido a reduzida disponibilidade de AIB no meio em função da adsorção ocorrida.

A probabilidade do efeito de adsorção do carvão ativado agindo no presente estudo embasa-se ainda na afirmação de Thomas (2008) que diz que na adição de carvão ativo ao meio de cultura, o mesmo tem preferência por substâncias polares, com grande capacidade adsorptiva por produtos aromáticos como fenóis e seus oxidatos e fitormônios, entre os quais auxinas como ácido nafteleno acético (ANA), ácido indole-3-acético (AIA) e o ácido indole-3-butírico (IBA).

Após analisados e compreendidos todos os fatores, pode-se sintetizar a partir dos resultados obtidos neste experimento, que para um enraizamento *in vitro* de explantes da cultivar Moraiolo com maior qualidade, a recomendação é a utilização de 2 mg L^{-1} de AIB realizada em um meio de cultura escurecido com 150 mg L^{-1} de Brilliant Black[®] sem necessidade de indução com escuro dos explantes no início da fase de enraizamento.

3.3 Terceiro experimento

A oliveira, em relação a outras espécies, tem uma exigência de tempo de subcultivo mais longo, em média de 30 a 60 dias com base no genótipo em proliferação (PETRUCCELLI, 2012); a este tempo soma-se mais 28 a 40 dias para o enraizamento (HAQ et al., 2009) e mais um período posterior a estas

fases para aclimação, sendo, portanto, o tempo para obtenção de uma planta pronta para ser transferida a campo longo e custoso, o que contribui para tornar a micropropagação da oliveira antieconômica.

Para melhorar este aspecto, é necessário reduzir ao máximo, o ciclo. Uma opção para alcançar essa redução é obter durante o enraizamento uma espécie de ‘pré-adaptação’ dos explantes, que pode ser realizado mediante a utilização de um substrato de enraizamento mais próximo àquele geralmente utilizado na fase de aclimatização, procurando manter sempre as características de assepsia típicas do cultivo *in vitro*.

Sabendo disso, os tratamentos testados nesse experimento demonstraram diferença estatística em todos os parâmetros avaliados (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem de enraizamento (PE), número, comprimento (CR), massa fresca (MFR) e massa seca (MS) de raízes de explantes de oliveira cultivar Moraiolo enraizadas em diferentes meios de cultura/substratos e com diferentes formas de aplicação de AIB.

Trat.	PE (%)	Nº de raízes	CR (cm)	MFR (g)	MSR (g)
T1	100a	6,4a	9,16b	0,16a	0,02a
T2	46,67b	1,9b	6,01b	0,02c	0,003b
T3	80a	2,9b	19,83a	0,07b	0,01b
T4	0c	0a	0c	0c	0b
CV (%)	12,47	14,45	20,38	1,73	0,50

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Tratamentos: T1: meio de cultura convencional + 2 mg L⁻¹ de AIB; T2: turfa + areia + 2 mg L⁻¹ de AIB + 15 g L⁻¹ de sacarose; T3: meio de cultura convencional + explantes induzidos; T4: turfa + areia + 15 g L⁻¹ de sacarose + explantes inoculados;

A fase de enraizamento é considerada crítica para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas (CHIAPPETTA et al., 2010). Para os explantes de oliveira multiplicados *in vitro*, o percentual de enraizamento muda amplamente, não somente em relação ao genótipo enraizado, mas também em função do meio de cultura utilizado no enraizamento (RKHIS et al., 2011).

Para a cultivar Moraiolo, avaliada neste experimento, observou-se exatamente este comportamento. Os dois tratamentos com meio de cultura agarizado sobressariam-se aos tratamentos com substrato composto por turfa e areia, embora tenha ocorrido diferença estatística entre os dois meios agarizados (Tabela 7).

Os dois tratamentos com substrato de turfa e areia (T2 e T4) não apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando porcentagem de enraizamento diferentes entre amodos, com relação ao tipo de aplicação de AIB. Entre esses dois tratamentos aquele em que os explantes foram colocados diretamente no substrato banhado com solução contendo AIB foi superior àquele em que os explantes permaneceram por três dias em solução indutiva contendo o mesmo regulador de crescimento.

Para o número de raízes desenvolvidas, o tratamento T1 teve resultados superiores, com uma média de 6,4 raízes por explante. Contrariamente, o tratamento 4 novamente teve o pior desempenho, sem nenhum desenvolvimento de raízes durante o período do experimento. Interessantes resultados podem ser observados para os tratamentos T2 e T3, nos quais, independentemente do tipo de meio de cultura/substrato utilizado, desenvolveram número estatisticamente similar de raízes por explante (1,9 e 2,9 respectivamente) (Tabela 7).

Para o comprimento de raízes, o tratamento T3, com meio de cultura agarizado e explantes que permaneceram em solução contendo AIB foi superior, com valores que chegaram ao dobro do comprimento nos demais tratamentos (Tabela 7). Os resultados obtidos podem ser explicados pelo efeito do tempo de contato prolongado entre os explantes e a solução contendo AIB. Segundo Souza e Pereira (2007), a presença de auxina é necessária para a indução do aparato radicular, porém, deve-se levar em consideração que concentrações acima de um limiar provocam a redução do comprimento das raízes, podendo chegar até mesma à estagnação do crescimento. Ainda sobre o comprimento das raízes,

altas concentrações de auxinas durante o enraizamento podem manifestar-se sobre o alongamento das raízes levando a um impedimento do crescimento (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009).

No discurso referente à massa, os resultados melhores foram encontrados no meio de cultura agarizado contendo AIB, com explantes imediatamente transferidos, seja para a massa fresca ou para a massa seca (Tabela 7).

Para a massa seca, os tratamentos T2, T3 e T4 não demonstraram diferença entre si, enquanto que para a massa fresca o tratamento T3 demonstrou resultados melhores entre esses tratamentos, mas sempre inferior ao tratamento T1. Este resultado é atribuído a uma relação entre o número e o comprimento de raízes. Assim, o tratamento T3, com meio de cultura agarizado e explantes tratados com solução contendo AIB, apresentou um maior comprimento de raízes e, conseqüentemente, uma maior massa fresca; o mesmo comportamento, porém, não foi observado para a massa seca onde o tratamento T3 não diferiu dos demais resultados negativos observados nos tratamentos T2 e T4, o que demonstra uma grande absorção de água em relação a nutrientes.

A maior absorção de água no tratamento T3 é uma resposta a um crescimento superior em condições favoráveis ao desenvolvimento das raízes, causado pelo pré-tratamento com AIB antes do transferimento para o meio de cultura agarizado. Segundo Niaz et al. (2014) a auxina esta correlacionada a iniciação e desenvolvimento de raízes, promovendo o crescimento, alongamento e divisão celular; estas alterações celulares fazem parte de um complexo processo de expansão celular, no qual está envolvido uma maior pressão de turgor no interior da célula, pressão esta que demanda uma maior absorção de água para que possa ocorrer. Esta maior absorção de água só é possível por meio da ação da auxina sobre as miofrilas da parede celular, alterando sua plasticidade e permeabilidade da membrana celular (PERROT-RECHENMANN, 2010).

Os resultados encontrados neste experimento apontam para uma superioridade do enraizamento tradicional em meio de cultura agarizado, dispensando a indução dos explantes. Todavia, a necessidade de aprimorar o processo de produção de mudas de oliveira, associado aos indícios de enraizamento em substrato composto por areia e turfa no tratamento T3 projetam uma possibilidade de maiores estudos, a fim de viabilizar o enraizamento neste substrato ou em outro de estrutura similar, que seja utilizado no processo de aclimatização de plantas micropropagadas, permitindo a redução do tempo para obtenção de mudas micropropagadas de oliveira de boa qualidade.

4 CONCLUSÃO

A concentração ideal de AIB para enraizamento de explantes de oliveira cultivar Moraiolo é 2 mg L^{-1} .

A indução dos explantes inoculados com 72 horas de escuro aliada a 2 mg L^{-1} de AIB melhora a qualidade das raízes formadas em explantes de oliveira cultivar Moraiolo.

A redução da concentração de sais do meio OM pela metade aumenta a massa das raízes formadas.

O escurecimento do meio de cultura com 150 mg L^{-1} de Brilliant Black[®] aumenta o número de raízes formadas.

O substrato composto por turfa e areia na proporção 3:1 (v:v) não foi eficiente para o enraizamento direto *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALI, A. Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'. **Pakistan Journal of Botany**, Karashi, v. 41, n. 2, p. 783-795, 2009.

ARTHUR, G. D.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Effects of autoclaving and charcoal on root-promoting substances present in water extracts made from gelling agents. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 97, n. 15, p. 1942-1950, 2006.

CHIAPPETTA, A. et al. Propagazione "*in vitro*" di *Olea europaea* L subsp. *oleaster*: ricorso a microtalee da semenzali. **Informatore Botanico Italiano**, Florença, v. 42, n. 1, p. 145-149, 2010.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews molecular cell biology**, London, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

DAG, A. et al. The effect of olive tree stock plant nutritional status on propagation rates. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 2, p. 307-310, 2012.

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

FOTOPOULOS, S.; SOTIROPOULOS, T. E. *In vitro* propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*): the effect of auxin type and concentration on rooting. **Advances in Horticultural Science**, Florença, v. 19, n. 1, p. 54-57, 2005.

HAQ, I. U. et al. Influence of microcutting sizes and IBA concentrations on *in vitro* rooting of olive cv. "Dolce Agogia". **Pakistan Journal of Botany**, Karashi, v. 41, n. 3, p. 1213-1222, 2009.

KHAJEHPOUR, G.; JAM'EIZADEH, V.; KHAJEHPOUR, N. Effect of different concentrations of IBA (indole butyric acid) hormone and cutting season on the rooting of the cuttings of olive (*Olea europaea* var Manzanilla). **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, Haslemere, v. 2, n. 12, p. 2920-2924, 2014.

LÉDO, A. S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de aib e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LORETI, F.; MORINI, S. **Tecniche di Propagazione**. Spoleto: Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olio, 2012. 47 p. (Collana divulgativa dell'Accademia Volume XII).

MANGAL, M. et al. *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, 'Frontio' from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 52, n. 9, p. 912-916, 2014.

MENCUCCINI, M. Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p.129-139, 2003.

MOSHTAGHI, E. A.; SHAHSAVAR, A. R. The Effects of IBA and H₂O₂ on Rooting of 2 Olive Cultivars. **Journal of Chemical Health Risks**, Damghan, v. 1, n. 1, p. 35-38, 2011.

NIAZ, N. et al. Effect of growth regulators on micropropagation of different olive cultivars (*Olea europaea* L.) **Science Letters**, Thiruchengodu, v. 2, n. 2, p. 48-52, 2014.

PADILLA, I. M.; VIDOY, I.; ENCINA, C. L. Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europaea* L.) microshoots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 9, p. 1411-1420, 2009.

PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Nova Iorque, v. 2, n. 5, p.1-15, 2010.

PETRUCCELLI, R. et al. Moltiplicazione dell'olivo e vivaismo olivicolo in Italia. **Italus Hortus**, Florença, v. 19, n. 1, p. 3-22, 2012.

RAHDARI, P.; KHOSROABADI, M.; DELFANI, K. Effect of different concentration of plant hormones (IBA and NAA) on rooting and growth factors in root and stem cuttings of *Cordyline terminalis*. **Journal of Medical and Bioengineering**, Tainan, v. 3, n. 3, p. 190-194, 2014.

RKHIS, A. C. et al. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. **Turkish Journal of Agricultural and Forestry**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 403-412, 2011.

ROSTAMI, A. A.; SHAHSAVAR, A. R. *In vitro* Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.) 'Mission' by Nodal Segments. **Journal of Biological and Environmental Science**, Bursa, v. 6, n. 17, p. 155-159, 2012.

RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, p. 123-134, 1984.

RUGINI, E.; GUTIERREZ-PESCE, P.; SAMPINATO, P. L. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 474, p. 107-110, 1999.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, Nova Iorque, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.

VILLA, F. et al. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

WANG, H.; YUANGANG, Z.; HONGMEI, L. Efficient rooting and root development after transfer of regenerated plantlets of *Camptotheca acuminata*. **Eurasian Journal of Forest Research**, Istanbul, v. 10, n. 2, p. 179-184, 2007.