

## Estabelecimento *in vitro* de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki'

### *In vitro* establishment of olive tree 'Arbequina' and 'Koroneiki'

Jullie dos Santos<sup>I</sup>, Marcos Vinícius Marques Pinheiro<sup>II</sup>, Daniele Cristina Fontana<sup>III</sup>, Denise Schmidt<sup>IV</sup>, Matheus Milani Pretto<sup>V</sup>

### Resumo

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

**Palavras-chave:** *Olea europaea*; Cultivares; Assepsia; Citocinina

### Abstract

Due to its relevant economic importance, both for the food and pharmaceutical sectors, the olive tree is being increasingly cultivated around the world. For this, obtaining quality seedlings with uniformity and varietal suitability emerges as a highly relevant factor at the implantation of olive orchards. Thus, the objective of this work was to develop *in vitro* establishment protocol from nodal segments of two olive cultivars under different concentrations of sodium hypochlorite and different concentrations of BAP. The experiment was conducted on completely randomized design, in a triple factorial scheme (2x3x3), two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki), three BAP concentrations (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) and three concentrations of sodium hypochlorite (0,6; 0,8 and 1,0% active chlorine) for the decontamination of the explants. Each treatment had three replicates and the experimental unit consisted of five test tubes with one explant each. After 28 days, it was possible to observe that the treatments tested did not promote *in vitro* establishment of *Olea europaea* cv. Arbequina. The concentration of 2,22  $\mu\text{M}$  of BAP added to the WPM and the 1,0% concentration of sodium hypochlorite used in disinfection of the explants, presented promising results in the *in vitro* establishment of *Olea europaea* cv. Koroneiki.

**Keywords:** *Olea europaea*; Cultivars; Asepsis; Cytokinin

<sup>I</sup> Engenheira Florestal, MSc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. [jullie27@hotmail.com](mailto:jullie27@hotmail.com) (ORCID: 0000-0003-1621-3556)

<sup>II</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr., Programa de Pós Graduação em Agronomia-Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. [macvini@gmail.com](mailto:macvini@gmail.com) (ORCID: 0000-0002-5028-7818)

<sup>III</sup> Engenheira Agrônoma, MSc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade de São Paulo (ESALQ), Avenida Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba (SP), Brasil. [daani\\_fontana@hotmail.com](mailto:daani_fontana@hotmail.com) (ORCID: 0000-0003-4285-6299)

<sup>IV</sup> Engenheira Agrônoma, Dra., Professora associada do Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. [denise@ufsm.br](mailto:denise@ufsm.br) (ORCID: 0000-0002-9963-4956)

<sup>V</sup> Acadêmico de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. [matheusmilani18@hotmail.com](mailto:matheusmilani18@hotmail.com) (ORCID: 0000-0001-6229-6837)



## Introdução

A oliveira (*Olea europaea*) apresenta importância econômica, sendo cada vez mais apreciada e cultivada em todo o mundo. O amplo consumo de seus produtos, a azeitona de mesa e o azeite de oliva, tem demonstrado que a espécie possui elevado potencial econômico, atraindo o interesse de produtores nacionais e internacionais (SOUZA *et al.*, 2012). Segundo o Conselho Oleícola Internacional (2017), a produção mundial de azeitonas de mesa nos últimos 30 anos cresceu de forma constante, passando de 950.000 t em 1990/91 para 2.953.500 t em 2017/18, tendo aumento de 211%. Já o consumo mundial para a safra 2016/2017 foi calculado em aproximadamente 2.803.000 t.

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

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

Atualmente, a oliveira vem sendo propagada vegetativamente através de métodos convencionais, como a enxertia e a estaquia. Estas, em condições adequadas, dão origem a uma nova planta a partir da emissão de raízes em partes vegetais excisadas de uma planta matriz pré-selecionada com características desejadas, as quais se manterão nas mudas produzidas. Porém, apesar destas vantagens, tais técnicas possuem alguns inconvenientes, como a baixa eficiência, por sofrer influência das variações sazonais do clima, da constituição genética das cultivares e de condições nutricionais e sanitárias do material vegetal utilizado (CANÇADO *et al.*, 2012). Outra maneira de propagação da espécie seria por via sexuada (sementes), entretanto, este método gera elevada variabilidade genética, elevado período juvenil das plantas produzidas, além da baixa germinação a campo, o que inviabiliza a produção de mudas para fins comerciais (SANTOS *et al.*, 2015).

Dessa forma, a técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* se destaca como uma maneira eficiente para propagação das espécies contornando estas dificuldades. Dentre as vantagens desta técnica estão a produção de mudas em curto tempo e espaço, garantindo homogeneidade e qualidade fitossanitária das plantas produzidas, e o aperfeiçoamento dos processos de melhoramento genético (SOUZA *et al.*, 2012). No entanto, para que se obtenham tais resultados positivos, é comum durante o processo a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, por desempenharem papéis fundamentais no desenvolvimento dos propágulos. A eficiência destas substâncias sintéticas adicionadas ao meio está diretamente relacionada ao conteúdo endógeno nos tecidos do explante, o qual pode variar dependendo do genótipo.

Dentre os principais reguladores utilizados estão as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP), com função de estimular a brotação nos explantes, quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares (CANÇADO *et al.*, 2012).

Dentre vários fatores, o sucesso do cultivo *in vitro* depende da adoção de métodos eficientes de assepsia, tanto dos explantes como também do ambiente de trabalho e materiais utilizados, devido ao elevado grau de contaminação e à presença sistêmica de microrganismos. Para isso, várias substâncias com ação desinfestante têm sido utilizadas, como o etanol, e compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio e de cálcio (COSTA *et al.*, 2007).

Além da desinfestação, a ocorrência de oxidação fenólica dos explantes representa

outro fator limitante, principalmente no que se refere ao cultivo *in vitro* de plantas lenhosas, dificultando o processo de estabelecimento. Para isso, a fim de mitigar ou evitar a ocorrência destes eventos, pré-tratamentos de prevenção são aplicados à planta-matriz (ERIG; SCHUH, 2003), como por exemplo, fungicidas e bactericidas aplicados dias antes da coleta do material vegetal para isolamento. Contudo, a combinação dos compostos ativos destas substâncias deve ser estabelecida de acordo com a espécie e a sensibilidade do material a ser desinfestado (ERIG; SCHUH, 2003), para que não ocorra intoxicação dos tecidos. A superexposição do tecido aos agentes esterilizantes pode danificar o explante, levando a morte celular (CARVALHO, 2012).

Neste contexto, tendo em vista a crescente demanda pelos produtos da oliveira, a geração de conhecimentos para a expansão da olivicultura torna-se essencial o que fundamenta a importância da busca por condições adequadas de estabelecimento para esta espécie. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver protocolo de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais de cultivares de oliveira sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e suplementação do meio com BAP.

## **Materiais e métodos**

### **Material Vegetal e Condições de Cultivo**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Extrativos Aromáticos da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, *Campus* de Frederico Westphalen-RS.

Como fonte de explantes foram utilizados segmentos nodais excisados de brotações jovens de plantas-matrizes de duas cultivares de *Olea europaea* L., cultivadas a campo em um plantio experimental de nove anos de idade, localizado na cidade de Chapecó, região Oeste de Santa Catarina, com coordenadas geográficas: 27°05' 47" de latitude sul, 52°37'06" de longitude oeste e altitude de 674 m. O material vegetal foi coletado com o auxílio de tesoura de poda esterilizada em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo imediatamente após cada excisão. Em seguida os ramos foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% de cloro ativo, adicionada de 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 30 mg L<sup>-1</sup> de fungicida Cercobin® 700 WP.

Em condições de laboratório, foi retirado 1/3 das folhas dos segmentos nodais, em seguida, sendo mantidos sob água corrente por aproximadamente uma hora. Passado este período, em câmara de fluxo laminar os explantes foram submetidos aos processos de desinfestação, realizando a lavagem do material vegetal em solução de álcool 70% (durante 30 segundos) em seguida em soluções de hipoclorito de sódio, cujas concentrações de cloro ativo variaram entre 0,6 a 1,0 % de cloro ativo, acrescido de duas gotas de Tween20® (durante 15 minutos), sob agitação constante. Em seguida, os explantes foram submetidos a três lavagens em água destilada esterilizada por aproximadamente cinco minutos (cada lavagem), para retirada do excesso de hipoclorito de sódio.

Após a desinfestação, os explantes foram excisados retirando o restante das folhas seguido de redução a aproximadamente 1,0 cm, sendo inoculados em tubos de ensaio de vidro 15 x 25 mm, contendo 10 ml dos sais e vitaminas do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado ou não com o regulador de crescimento BAP nas concentrações de 2,22 ou 4,44 µM, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido de autoclavagem a 120°C, 108 kPa, por 20 minutos. Os tubos com os explantes foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, mantidos no escuro por sete dias, em seguida transferidos para ambiente com irradiação luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provenientes de lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, Luz do dia), com fotoperíodo de 16 horas de luz, permanecendo nessas condições por 28 dias.

## Desenho experimental e variáveis analisadas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 x 3, sendo duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki), três concentrações de hipoclorito de sódio (0,6; 0,8 e 1,0% de cloro ativo) e três concentrações de BAP (0,00; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) totalizando 18 tratamentos, com três repetições cada, e a unidade experimental constituída por cinco tubos de ensaio com um explante cada.

Após 28 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de contaminação fúngica; porcentagem de contaminação bacteriana; porcentagem de oxidação; porcentagem de sobrevivência (determinada pela coloração verde dos explantes); e porcentagem de estabelecimento (determinada pelo desenvolvimento dos primórdios foliares – presença de folhas/brotos). As análises estatísticas foram realizadas pelo software SISVAR (FERREIRA, 2010) aplicando-se teste de Tukey a 5% de significância. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.5, a partir de médias não transformadas.

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

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

Table 1 – Treatments used to develop *in vitro* establishment protocol of *Olea europaea* cultivars.

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

Fonte: Autores (2018)

## Resultados

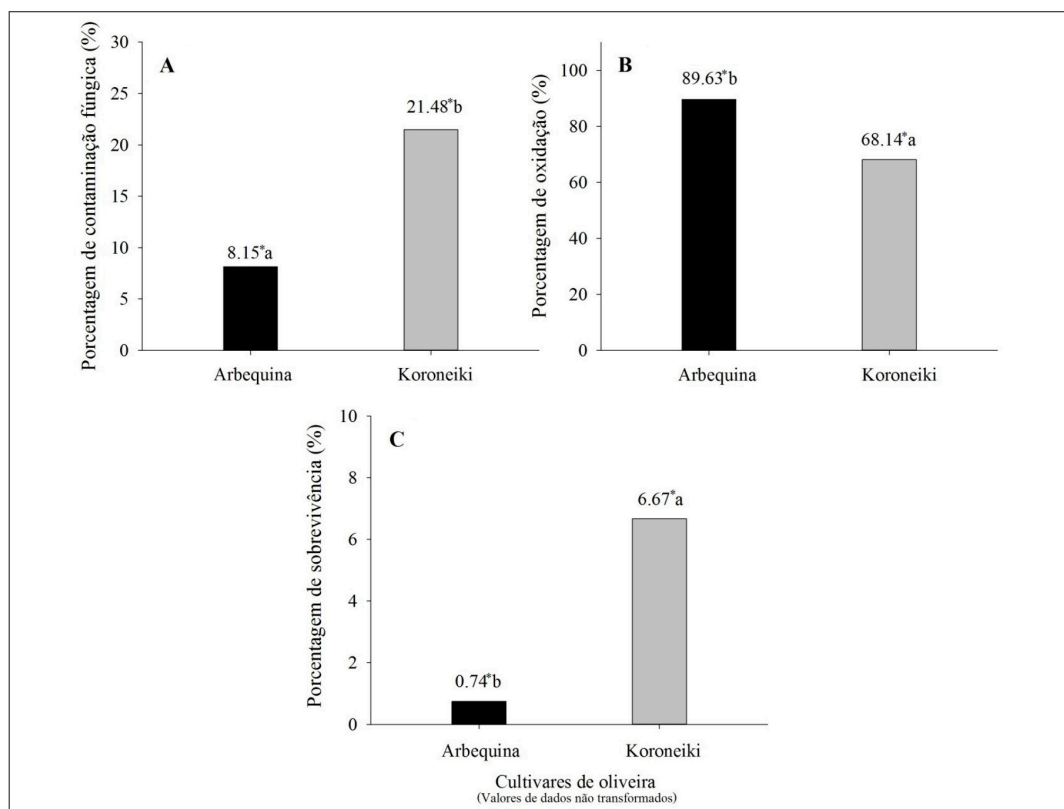
Pela análise de variância, foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo que para as variáveis porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de oxidação e porcentagem de sobrevivência houve interação significativa apenas para o fator cultivares. Para a variável porcentagem de estabelecimento observou-se interação tripla entre os fatores estudados (cultivares x concentrações de BAP x concentrações de hipoclorito). A variável porcentagem de contaminação bacteriana não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos estudados (Figura 1).

Para a variável porcentagem de contaminação fúngica, a cultivar Koroneiki demonstrou maior susceptibilidade com média de 21,48%, quando comparada a cultivar Arbequina com média de 8,15%, apresentando um coeficiente de variação de 108,69% ( $p < 0,05$ ; Figura 1A).

Para a variável porcentagem de oxidação, a cultivar Arbequina (89,63%) foi superior significativamente ( $p < 0,05$ ) à Koroneiki (68,14%), indicando influência do genótipo na resposta desta variável, com coeficiente de variação de 23,65% (Figura 1B). Este resultado refletiu diretamente nas respostas da variável porcentagem de sobrevivência ( $p < 0,05$ ; CV= 207,85%), no qual foram observadas médias superiores para a cultivar Koroneiki (6,67%) em comparação à Arbequina com média de 0,74% (Figura 1C).

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

Figure 1 – Percentage of fungal contamination (A), percentage of oxidation (B) and survival percentage (C) of *Olea europaea* cultivars during *in vitro* establishment. \* Averages followed by the same letter do not differ by Tukey test ( $p < 0.05$ ).



Fonte: Autores (2018)

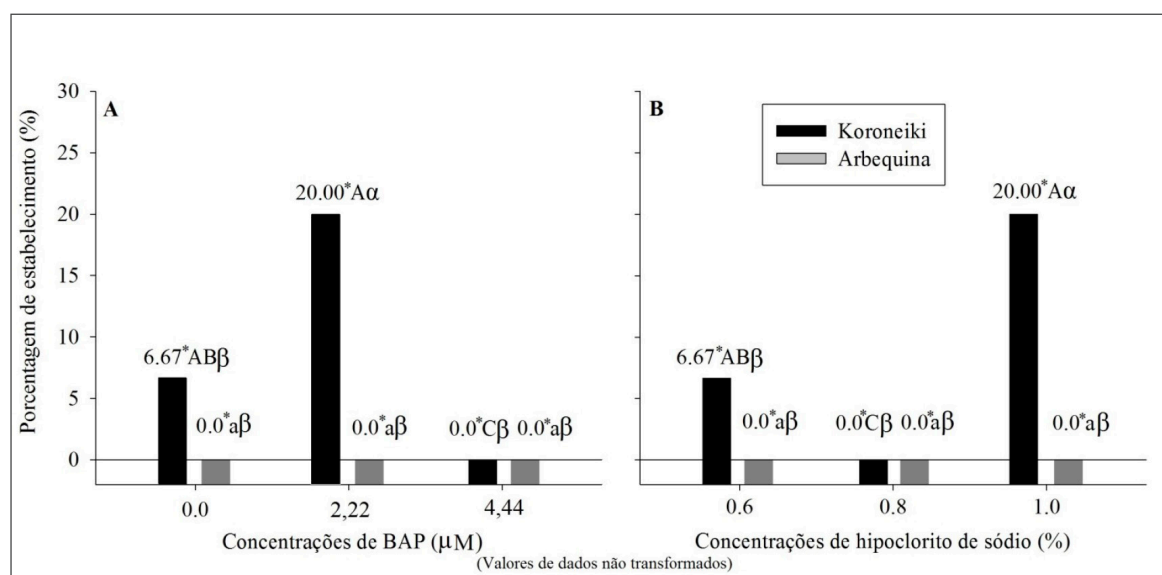


Os resultados obtidos para a variável porcentagem de estabelecimento *in vitro* (CV= 367,42%), no desdobramento das concentrações de BAP dentro de cada cultivar estudada, demonstraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as cultivares e nas concentrações de hormônio testadas. A cultivar Koroneiki na concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, e no tratamento sem adição de BAP, apresentou estabelecimento *in vitro* com médias de 20,0% e 6,67%, respectivamente, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) da cultivar Arbequina que não apresentou estabelecimento nestas concentrações. As cultivares não diferiram de forma significativa quando foram submetidas à concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, não havendo registros de estabelecimento *in vitro* nesta condição (Figura 2A).

Não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em relação às concentrações de hipoclorito de sódio testadas. A cultivar Koroneiki quando submetida aos tratamentos com hipoclorito de sódio 0,6% e 1,0% de cloro ativo, apresentou médias de 6,67% e 20,0%, respectivamente, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) da cultivar Arbequina, que, nas mesmas condições, não apresentou propágulos estabelecidos. Não houve diferença significativa entre as cultivares no tratamento com hipoclorito de sódio na concentração 0,8% de cloro ativo, não havendo porcentagem de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais (Figura 2B).

**Figura 2 – Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de cultivares de *Olea europaea* L. submetidas a diferentes concentrações de BAP (A) e hipoclorito de sódio (B). Letras maiúsculas comparam a cultivar Koroneiki e letras minúsculas comparam a cultivar Arbequina, nas diferentes concentrações de BAP e hipoclorito de sódio; Letras gregas comparam as duas cultivares dentro de cada concentração de BAP e hipoclorito de sódio. \* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, médias seguidas da mesma letra minúscula e médias seguidas de mesma letra grega não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.**

Figure 2 – *In vitro* establishment of nodal segments of *Olea europaea* L. cultivars submitted to different concentrations of BAP (A) and sodium hypochlorite (B). Upper case letters compare the Koroneiki cultivar and lower case letters compare the Arbequina cultivar, in the different concentrations of BAP and sodium hypochlorite; Greek letters compare the two cultivars within each concentration of BAP and sodium hypochlorite. \* Averages followed by the same capital letter, averages followed by the same lowercase letter and averages followed by the same Greek letter do they do not differ by the Tukey test, at 5% significance.

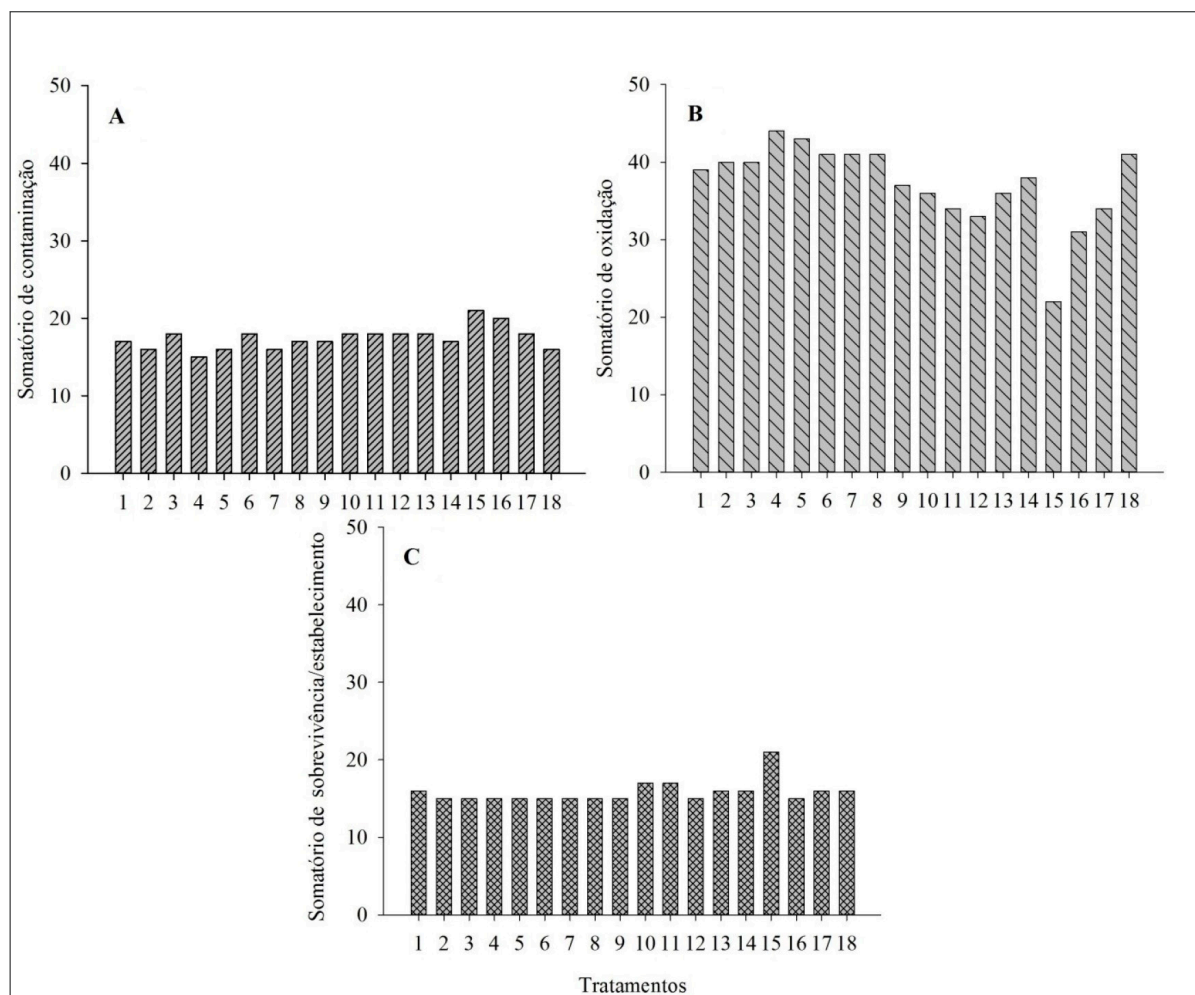


Fonte: Autores (2018)

De acordo com o teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), o desempenho dos tratamentos para a variável contaminação foi bastante semelhante, porém, o T15 (Koroneiki + 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 1,0% de cloro ativo de hipoclorito de sódio) apresentou maior contaminação em relação aos demais tratamentos, com somatório total igual a 21. Em contrapartida, o tratamento com menor ocorrência de contaminação foi o T4 (Arbequina + 2,22  $\mu\text{M}$  BAP + 0,6% hipoclorito de sódio), com somatório total igual a 15 (Figura 3A). Em relação a variável oxidação dos explantes, o T4 (Arbequina + 2,22  $\mu\text{M}$  + 0,6% hipoclorito de sódio) apresentou maiores níveis de oxidação, totalizando somatório de 44. O tratamento que apresentou menor somatório de oxidação foi o T15 com total de 22 (Figura 3B). Este resultado refletiu diretamente na quantidade de plantas sobreviventes e estabelecidas (Figura 3C), em que o tratamento T15 (Koroneiki + 2,22  $\mu\text{M}$  BAP + 1,0 % de hipoclorito de sódio) apresentou somatório de 21. Foi possível observar que os tratamentos T12 e T16 com a cultivar Koroneiki apresentaram baixo somatório de oxidação, o que demonstraria a forte influência do genótipo no papel desta variável.

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

Figure 3 – Kruskal Wallis test for summation data of fungal contamination (A), sum of oxidation (B) and sum of survival/establishment (C) of nodal segments of *Olea europaea* L. cultivars *in vitro*.

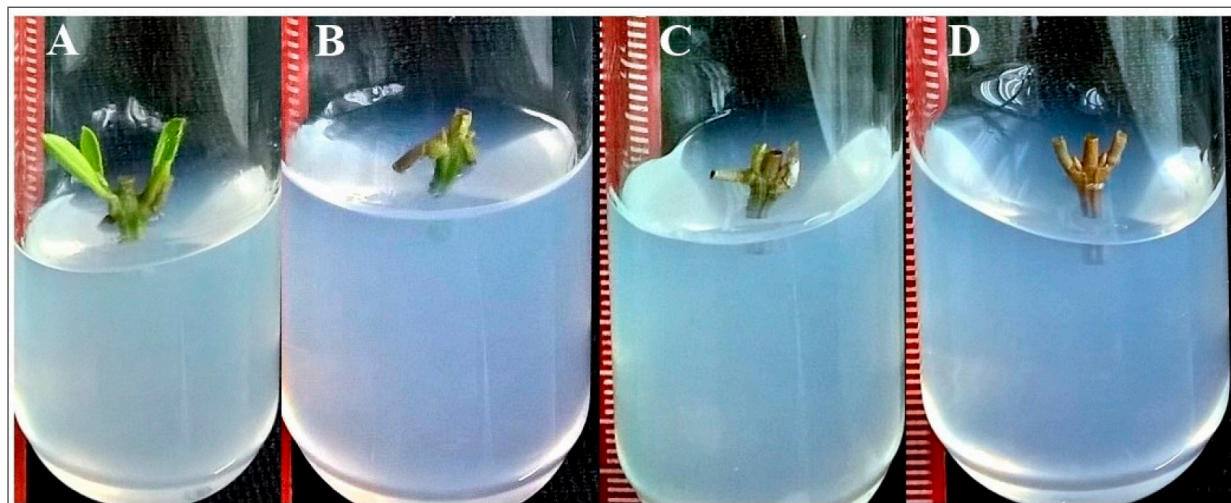


Fonte: Autores (2018)

Na Figura 4 estão demonstrados os parâmetros utilizados no teste de Kruskal Wallis para as variáveis estabelecimento (Figura 4A), sobrevivência (Figura 4B), oxidação 50% (Figura 4C) e oxidação 100% (Figura 4D).

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

Figure 4 – Explants of *Olea europaea in vitro* cv. Koroneiki: established (A), survivor (B), 50% oxidized (C) and 100% oxidized (D).



Fonte: Autores (2018)

## Discussão

A baixa porcentagem de contaminação obtida reflete a eficiência do método de desinfestação adotado neste trabalho. O fato desta variável demonstrar resposta diferenciada entre as cultivares estudadas pode estar associado à suscetibilidade de alguns genótipos e à rusticidade de outros. Por exemplo, a cultivar Arbequina apresenta, entre outras características, boa adaptabilidade a diferentes condições ambientais e a resistência ao ataque de pragas e doenças (DONINI *et al.*, 2008b; COUTINHO *et al.*, 2015). Segundo Andrezza *et al.* (2016), a sensibilidade ou resistência de um genótipo em relação a outro pode estar diretamente relacionado às características físico-químicas do vegetal, o que lhe garante maior rusticidade, conferindo aumento na capacidade de resistir ao ataque de determinadas pragas e patologias. Resultados obtidos por Moreira (2014) condizem com o que foi encontrado no presente estudo, quando foi descrito menor taxa de contaminação fúngica para a cultivar Arbequina comparada com a cultivar Maria da Fé. Entretanto, Donini *et al.* (2008a) obtiveram menores porcentagens de contaminação fúngica para a cultivar Koroneiki em relação às cultivares Picual e Frantoio.

Em relação à espécie Arbequina, que apresentou baixo índice de mortalidade quando tratadas com hipoclorito de sódio, Malyzs *et al.* (2011) descreveram para *Eucalyptus dunnii* alto índice de mortalidade quando utilizaram a concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio em comparação a concentração de 1,0%, considerando a assepsia e a sobrevivência. Porém, os resultados destes autores confirmam com o que foi observado para a cultivar Koroneiki. Considera-se que estas respostas diferenciadas entre as cultivares estudadas podem estar associadas à ocorrência de possível intoxicação dos explantes de Arbequina submetidos às concentrações de hipoclorito de sódio, fato que desencadeou maior nível de oxidação e, por consequência, menor porcentagem de sobrevivência e estabelecimento dos propágulos desta cultivar.



Também em relação ao nível de oxidação da cultivar Arbequina, os presentes resultados condizem com os encontrados por Moreira (2014), nos quais o autor observou maior porcentagem de oxidação para a cultivar Arbequina em comparação às cultivares Ascolano, Leccino, Coratina, Maria da Fé e Frantoio. O fenômeno da oxidação fenólica está relacionado ao metabolismo enzimático, sendo responsável por atribuir coloração marrom aos explantes. Segundo Bezerra, Aloufa e Freire (2014), tal fenômeno ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro* devido às células serem danificadas durante a excisão dos explantes, assim, esses compostos são oxidados pelas enzimas polifenases e produzem substâncias tóxicas capazes de inibir o desenvolvimento dos explantes. Já Donini *et al.* (2008a) também descreveram menores médias de oxidação para a cultivar Koroneiki em relação à cultivar Frantoio, que foi atribuída às menores concentrações de compostos fenólicos totais e aos diferentes tipos de fenóis existentes nos tecidos desta cultivar. Os mesmos autores afirmam ainda que estes compostos, ao entrarem em contato com o oxigênio, desencadeiam reações de oxidação resultando em produtos tóxicos que ocasionam o escurecimento e a necrose do tecido vegetal.

A baixa taxa de sobrevivência da cultivar Arbequina observada no presente trabalho pode ser atribuída à grande ocorrência de oxidação dos explantes, tal fato se deve aos propágulos desta cultivar que resistiram à contaminação sofrerem oxidação fenólica. Entretanto, conforme Navroski, Reiniger e Pereira (2015), as variações de respostas entre as cultivares podem estar relacionadas às diferenças genéticas entre as matrizes ou ao balanço hormonal específico de cada indivíduo. Estas diferenças podem ter origem por meio do controle genético, ou dos diferentes ritmos endógenos da planta, associados a fatores fisiológicos e morfológicos, pois estas flutuações podem ocorrer mesmo entre indivíduos intimamente aparentados de acordo com o funcionamento endógeno, considerando que ambas as cultivares estão acondicionadas no mesmo ambiente.

A diferença das respostas entre as cultivares neste trabalho para a variável porcentagem de sobrevivência também foi descrita por Mendes (2013) em diferentes genótipos de citrus. Este mesmo autor associou o desempenho desigual da sobrevivência ao fato de que as condições para o desenvolvimento *in vitro* de uma espécie podem variar entre os genótipos, considerando que cada indivíduo apresenta características únicas determinadas por fatores genéticos e por isso suas exigências *in vitro* também tendem a ser únicas. Resultados semelhantes ao presente trabalho também foram encontrados por Donini *et al.* (2008a), em que observaram maiores médias de sobrevivência para a cultivar Koroneiki em comparação às cultivares Picual e Frantoio.

Com base nos resultados, foi possível observar que a sobrevivência nem sempre indica bom estabelecimento, pois nem todos os propágulos sobreviventes da cultivar Arbequina se estabeleceram. Independentemente das concentrações de BAP e hipoclorito de sódio aplicadas, a baixa porcentagem de sobrevivência e o não estabelecimento dos propágulos da cultivar Arbequina, podem estar associados à elevada porcentagem de oxidação observada para esta cultivar, salientando que grande parte dos explantes que não oxidaram apresentaram contaminação. Diferentemente do que foi observado para a cultivar Koroneiki, que, apesar de sofrer maior contaminação, demonstrou maior porcentagem de sobrevivência e estabelecimento dos propágulos. Tais resultados discordam dos encontrados por Moreira (2014), quando observou maiores taxas de estabelecimento para a cultivar Arbequina em comparação às demais cultivares de oliveira testadas.

O mesmo comportamento da variável porcentagem de brotação observado neste trabalho em relação às concentrações de BAP testadas, estão de acordo com Santos *et al.* (2016) que também observaram aumento desta variável ao utilizarem BAP na concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  para a espécie Bastão-do-imperador (*Etlintera elatior*). Mangal *et al.* (2014) encontraram maior taxa de estabelecimento *in vitro* de oliveira cultivar Frantoio quando os explantes foram submetidos a 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Em contrapartida, Ahmad *et al.* (2016) não observaram proliferação de brotos quando testaram o regulador BAP na micropropagação *in vitro* de oliveira cultivares Uslu, Coratina, Nocellara, Pendolino e Leccino.

Os resultados obtidos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram confirmados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ) no qual observaram-se respostas positivas da cultivar Koroneiki em relação à oxidação e sobrevivência/estabelecimento quando comparada com a cultivar Arbequina, o que depende substancialmente ao metabolismo do genótipo, rusticidade e capacidade de adaptação às diferentes condições de ambiente. Entretanto, a mesma cultivar demonstrou maior sensibilidade à contaminação, em comparação à Arbequina.

## Conclusão

O estabelecimento *in vitro* de oliveira apresenta resultados distintos entre as cultivares testadas. Em relação ao processo de desinfestação, a concentração de hipoclorito de sódio (1,0% de cloro ativo) utilizada no processo de desinfestação e a concentração de BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) adicionada ao meio de cultura WPM, apresentou resultado promissor para o estabelecimento *in vitro* da cultivar Koroneiki. Este resultado destaca-se pelo fato de que ainda não existe descrição de um protocolo de desinfestação eficiente para esta cultivar publicado cientificamente até o momento.

Em relação à cultivar Arbequina, as concentrações de hipoclorito de sódio e BAP testadas neste trabalho não foram eficientes para o seu estabelecimento *in vitro*, o que sugere o desenvolvimento de novos testes a fim de se determinar um protocolo eficiente de estabelecimento para esta cultivar.

Considerando as baixas porcentagens de sobrevivência e estabelecimento obtidas no presente trabalho, tratando-se da manutenção da coloração verde e emissão de brotos nos explantes, pode-se observar que as concentrações de BAP testadas neste trabalho não demonstraram grande relevância, o que reflete a necessidade de se desenvolver novos testes com outras concentrações deste regulador como também combinações de outras citocininas buscando obter melhores respostas para estas cultivares.

## Referências

- AHMAD, N. *et al.* Comparison of diferente parameters for the *in vitro* propagation of various cultivars of olive (*Olea europaea* L.). **International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy**, [s. l.], v. 6, n. 1, jun. 2016.
- ANDREAZZA, F. *et al.* Suscetibilidade de bagas de genótipos de videira pela infestação por *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 599-606, maio 2016.
- BEZERRA, R. M. F.; ALOUFA, M. A. I.; FREIRE, F. A. M. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.
- CANÇADO, G. M. A. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. In: OLIVEIRA, A. F. *et al.* **Oliveiras no Brasil -tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. p. 275-310.
- CARGNELUTTI FILHO, A. *et al.* **Testes não paramétricos para pesquisas agrícolas**. Santa Maria: UFSM; CCR, 2001. 87 p.
- CARVALHO, S. M. S. **Cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa* H.B.K.** 2012. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.
- CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Market Newsletter No. 121**. Madrid, 2017. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/697-year-2017-news/909-market-newsletter-november-2017>. Acesso em: 19 dez. 2017.

- COSTA, F. A. *et al.* Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Aracaju, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan./mar. 2007.
- COUTINHO, E. F. *et al.* (org.). **Oliveira**: aspectos técnicos e cultivo no Sul do Brasil. Brasília: EMBRAPA, 2015. 196 p.
- DONINI, L. P. *et al.* Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 229-233, 2008a.
- 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, set. 2008b.
- DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira “Arbequina”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, set. 2011.
- ERIG, M. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociências**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 221-227, set. 2003.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, [s. l.], v. 30, p. 421-427, 1980.
- MANGAL, M. *et al.* *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, ‘Frontio’ from nodal segments. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 52, p. 912-916, set. 2014.
- MALYSZ, M. *et al.* Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Perspectiva**, Erechim, v. 35, n. 131, p. 69-77, 2011.
- MENDES, M. I. S. **Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de citros visando a obtenção de plantas livres de doenças**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.
- MOREIRA, R. M. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de oliveira**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.
- NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015.
- OLIVEIRA, A. F. *et al.* Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 317-322, ago. 2010.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11. ed. Piracicaba: ESALQ, 1985. 467 p.
- REISSER JÚNIOR, C. *et al.* **Cultivo de Oliveira** (*Olea europaea* L.). Pelotas: EMBRAPA Sistemas de Produção, 2009.
- SANTOS, E. O. *et al.* Multiplicação de bastão-do-imperador em resposta a concentrações de BAP e número de subcultivos. **Ornamental Horticulture**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2016.
- SANTOS, F. F. *et al.* Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 130-133, set. 2015.
- SOUZA, R. A. V. *et al.* Efeito da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 59, n. 3, p. 299-304, jun. 2012.