



ARTIGO

Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.)

Fabiana Fonseca dos Santos¹, Juliana de Magalhães Bandeira^{2*}, Patrícia Marini³,
Andréa Bicca Noguez Martins⁴, Daiane Peixoto Vargas⁵, Leonardo Ferreira Dutra⁶,
Enilton Fick Coutinho⁶ e Dario Munt de Moraes⁷

Recebido: 27 de abril de 2014 Recebido após revisão: 5 de novembro de 2015 Aceito: 10 de julho de 2015
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3015>

RESUMO: (Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.)). O cultivo de oliveiras é recente no Brasil e a falta de mudas de qualidade é limitante para sua expansão. Visando a rápida produção de mudas de qualidade fitossanitária, objetivou-se avaliar a viabilidade e o vigor de sementes e sua relação com a germinação e o cultivo *in vitro* das sementes integras e embriões isolados de cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki). A viabilidade das sementes foi avaliada pelo teste do tetrazólio e o vigor pela atividade respiratória. Para o cultivo *in vitro*, sementes e embriões foram inoculados em meio MS com 0,01 mg L⁻¹ de ácido giberélico, 1 mg L⁻¹ do antioxidante PPM, pH 6,2, mantidos em sala de crescimento (25±1 °C, luminosidade de 32 μmoles m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas). Após 15, 30, 45, 60 e 75 dias foram avaliadas as porcentagens de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 embriões/sementes e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05). A cv. Koroneiki apresentou 6% de embriões viáveis enquanto que a Arbequina apresentou 86%. A maior atividade respiratória nas sementes de Arbequina (48,4 mg CO₂ g de semente⁻¹ h⁻¹), evidenciou maior vigor, diferindo significativamente da cv. Koroneiki (30,8 mg CO₂ g de semente⁻¹ h⁻¹). Houve diferença significativa para a germinação *in vitro* entre as sementes íntegras e os embriões para as duas cultivares, com médias de 24% e 63% para 'Arbequina' e de 6,2% e 34,6% para 'Koroneiki', respectivamente. A maior viabilidade e vigor das sementes da cv. Arbequina correspondem a sua maior porcentagem de germinação *in vitro*.

Palavras-chave: *Olea europaea*, Arbequina, Koroneiki, tetrazólio, respiração.

ABSTRACT: (The relationship between viability, vigor and *in vitro* culture of embryos and seeds of olive (*Olea europaea* L.)). Cultivation of the olive tree is recent in Brazil and the lack of high-quality saplings is a limiting factor to its expansion. Aiming at the rapid production of saplings with high phytosanitary quality, we evaluated the viability and vigor of seeds and their relationship with germination and *in vitro* culture of intact seeds and isolated embryos of two olive cultivars (Arbequina and Koroneiki). Seed viability was assessed by the tetrazolium test, and vigor by the measuring respiratory activity. For the *in vitro* culture, seeds and embryos were cultivated in MS medium with 0.01 mg L⁻¹ gibberellic acid and 1 mg L⁻¹ PPM antioxidant at pH 6.2 in a growth chamber (25 ± 1 °C, 32 μmoles m⁻² s⁻¹ light and 16 h photoperiod). After 15, 30, 45, 60 and 75 days, germination percentages were evaluated. The experimental design was completely randomized with four replications of 25 embryos/seeds, and means were compared by Tukey's test (p<0.05). The Koroneiki cv. showed 6% viable embryos, whereas the Arbequina cv. showed an 86% rate. The higher respiratory activity in Arbequina seeds (48.4 mg CO₂ g seed⁻¹ h⁻¹) indicated their higher vigor, differing significantly from Koroneiki seeds (30.8 mg CO₂ g seed⁻¹ h⁻¹). There were significant differences in *in vitro* germination rates between the intact seeds and the isolated embryos in both cultivars, with averages of 24% and 63% for Arbequina, and 6.2% and 34.6% for Koroneiki, respectively. The higher viability and vigor of Arbequina seeds correspond to their higher *in vitro* germination rate.

Keywords: *Olea europaea*, Arbequina, Koroneiki, tetrazolium, respiration.

INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie perene amplamente cultivada e apreciada em todo o mundo, em função do consumo crescente do azeite de oliva e

das azeitonas de mesa. Pesquisas recentes revelam que o azeite de oliva é comprovadamente benéfico à saúde, principalmente na proteção de enfermidades cardiovasculares e por ser muito utilizado como veículo na

1. Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV), Instituto de Biologia (IB), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Caixa Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas, RS, Brasil.
 2. Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, campus São Borja. Rua Otaviano Castilho Mendes, 355, CEP 97670-000, São Borja, RS, Brasil.
 3. Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, campus Alegrete. RS-377, km 27, Passo Novo, CEP 97555-000, Alegrete, RS, Brasil.
 4. Engenheira Agrônoma, Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes (PPGCTS), UFPEL. Caixa Postal 354, CEP 96001-970, Pelotas, RS, Brasil.
 5. Bióloga, Pós-doutoranda, Laboratório de Cultura de Tecidos, Embrapa Clima Temperado, Rod. BR 392, km 78, 9º Distrito, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil.
 6. Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado. Rod. BR 392, km 78, 9º Distrito, CEP 96010-971, Pelotas, RS, Brasil.
 7. Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Associado, IB, UFPEL. Caixa Postal 354, 96001-970, Pelotas, RS, Brasil.
- *Autor para contato: bandeira_jm@hotmail.com

confeção de produtos farmacêuticos (Barcelos *et al.* 2006). Entre 2001 e 2010 o consumo e importação de azeite de oliva e azeitona, somente no Brasil, tiveram aumento de 120% e 45%, respectivamente (Bertoncini *et al.* 2010). De maneira que o Brasil é um dos maiores importadores de produtos da oliveira da América do Sul, sendo a Argentina um dos maiores fornecedores, além da Espanha e Portugal (EPAMIG 2006).

Atualmente, no estado do Rio Grande do Sul (RS), a Embrapa Clima Temperado tem se empenhado no desenvolvimento e adequação de tecnologias para a cultura de oliveira, visando dar suporte técnico aos olivais implantados, assim como para futuros empreendimentos, com o intuito de melhorar a qualidade dos produtos colhidos.

A área cultivada com oliveiras no RS é próxima de 1,4 mil hectares (Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Estado Rio Grande do Sul 2015), com propriedades variando de 3 a 15 ha, destacando os cultivares Arbequina, Koroneiki, Arbosana e Picual como os mais promissores para produção de azeite e os cvs. Manzanilla, Cordovil de Sêrpa e Carolea para azeitona de mesa, enquanto que o cultivar Galega é utilizado com dupla finalidade (Coutinho 2012*).

Na Espanha, o cultivar Arbequina é uma das mais importantes devido as suas características de vigor vegetativo, precocidade, alto rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças (Oliveira *et al.* 2003). O 'Koroneiki' é originária da Grécia, resistente à seca, mas susceptível ao frio e com produtividade elevada e constante (Coutinho 2012*). Embora o mercado de azeitonas e azeite de oliva seja promissor, até o momento a olivicultura no Brasil não se caracteriza como uma alternativa rentável e viável para os produtores, devido principalmente a manejos inadequados, falta de conhecimento de modernas técnicas de formação e má condução dos pomares (Oliveira 2001).

Normalmente a oliveira é propagada vegetativamente por enxertia e estaquia, de maneira que a propagação por sementes não é aconselhável em função da variabilidade genética e longo período juvenil, além da baixa germinação em condições de campo, inviabilizando a propagação comercial. Entretanto, pode ser utilizada na produção de porta-enxertos de cultivares difíceis de enraizar por estacas e para melhoramento genético. Um dos obstáculos para propagação por enxerto de algumas cultivares, assim como a utilização de mudas em programas de melhoramento é a dormência e a baixa germinação das sementes de porta-enxerto de oliveira (Bandino *et al.* 1999). Diante disso, a utilização de técnicas de cultura de tecidos se torna uma alternativa enriquecedora visando melhorar a rentabilidade das culturas, visto que esta técnica tem-se apresentado como um instrumento importante para ser explorado pelos pesquisadores (Oliveira *et al.* 2006). Entre estas técnicas, a cultura de embriões *in vitro*, além de reduzir o tempo para obtenção de um novo indivíduo,

permite boa uniformidade e alto percentual de germinação (Oliveira 2001).

Portanto, visando a produção de mudas de maneira mais rápida e de alta qualidade fitossanitária, objetivou-se avaliar a viabilidade e o vigor de sementes e sua relação com a germinação e o cultivo *in vitro* das sementes íntegras e embriões isolados de duas cultivares de oliveira.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) e Laboratório de Pesquisa em Fisiologia de Sementes do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. Sementes das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, safra 2012, foram coletadas no mesmo estádio de maturidade fisiológica do olival da Embrapa Clima Temperado.

A viabilidade dos embriões foi confirmada pelo teste de tetrazólio, de acordo com a metodologia descrita para oliveira cv. Santa Catalina (Souza *et al.* 2011), sendo utilizadas quatro repetições com 25 embriões, totalizando 100 embriões para cada cultivar. O albúmen foi retirado e os embriões colocados em tubos de ensaio totalmente submersos em solução de tetrazólio a 0,1%. Os tubos foram mantidos no escuro a 25 °C, por 18 horas. Após este período, os tecidos vivos e mortos nas sementes foram diferenciados em função da coloração e os embriões foram individualmente classificados em duas categorias conforme o padrão de coloração: viáveis (mais de 80% da superfície do embrião corada com tom rosa acentuado, incluindo eixo embrionário e região de translocação) e inviáveis (menos de 80% da superfície do embrião corada ou corada com tom rosa pálido, sem coloração no eixo embrionário e na região de translocação), de acordo com a metodologia descrita por Souza *et al.* (2011).

O vigor foi determinado pela atividade respiratória, determinada no aparelho de Pettenkofer, sendo utilizadas 40 g de sementes das cultivares avaliadas, as quais foram embebidas por 60 minutos em 80 mL de água destilada para acelerar o processo respiratório. Após este período, foi realizada a medição da respiração das sementes, segundo metodologia descrita por Mendes *et al.* (2009). O resultado foi expresso em quantidade de CO₂ liberado por miligrama de semente, por hora (mg CO₂ mg de semente⁻¹ h⁻¹).

Para a inoculação *in vitro* foram utilizadas quatro repetições com cinco subamostras de embriões e sementes, totalizando 25 embriões e sementes por repetição. As sementes foram rompidas com auxílio de torno, para retirada do endocarpo e desinfestadas com álcool etílico (70%), durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo) por 15 minutos, twenn 80 e lavagem triplíce com água destilada e autoclavada. Logo em seguida, as sementes foram embebidas em água estéril por 24 h. A metade dessas sementes foram rompidas com auxílio de estilete para extração do embrião. Tanto as sementes como os embriões foram inoculados em frascos contendo meio MS (Murashige & Skoog 1962) acrescido de ácido

*COUTINHO, E. F. Cultivares de *Olea europaea* L. do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado. Comunicação pessoal. Pelotas, 2012.

giberélico (0,01 mg L⁻¹) e 1 mg L⁻¹ do antioxidante PPM (*Plant Preservative Mixture*), com pH ajustado para 6,2. Os frascos com as sementes e embriões foram mantidos em sala de crescimento a 25±1 °C, intensidade luminosa de 32 µmoles m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após 15, 30, 45, 60 e 75 dias foram avaliadas a porcentagem de germinação das sementes sem o endocarpo e dos embriões.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, de cinco explantes em cada frasco, totalizando 25 sementes e 25 embriões, sendo os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do teste de tetrazólio foi possível observar diferença significativa entre as cultivares, sendo que a cv. Arbequina apresentou 86% dos embriões viáveis enquanto que a cv. Koroneiki apresentou apenas 6% (Tab. 1) confirmando a maior viabilidade da cv. Arbequina.

É evidenciado que alterações responsáveis pela queda do vigor reduzem a taxa respiratória (Mendes *et al.* 2009). Em sementes secas as membranas das mitocôndrias não estão organizadas e por isso, no início do processo de embebição, a recuperação estrutural começa a ocorrer à medida que a hidratação prossegue, tornando-se mais eficiente na fosforilação oxidativa (Castro & Hilhorst 2004). Portanto, a manutenção do vigor pode ser visualizada como consequência do período de tempo necessário para que as mitocôndrias fiquem mais eficientes, passem a executar funções respiratórias e o sistema de membranas se torne mais organizado (Marcos Filho *et al.* 2006). Desta forma, a maior atividade respiratória verificada nas sementes da cv. Arbequina (48,4 mg CO₂ g⁻¹ semente h⁻¹) evidencia seu maior vigor diferindo significativamente da cv. Koroneiki (30,8 mg CO₂ g⁻¹ semente h⁻¹) (Tab. 1) , tendo em vista que a maior liberação de CO₂ caracterizou a integridade das membranas celulares, inclusive as mitocondriais.

Cinco dias após a inoculação *in vitro* do embrião, foi verificado o início do processo germinativo, sendo possível evidenciar os cotilédones, ressaltando que após 10 dias, houve a protrusão completa da raiz primária. Estes resultados concordam com os encontrados por Souza *et al.* (2011) em trabalho de cultivo *in vitro* com a cv. Santa Catalina. Segundo Acebedo *et al.* (1997) a germinação *in vitro* de embriões isolados de oliveiras pode ser uma

Tabela 1. Sementes de duas cultivares da espécie *Olea europaea* (Arbequina e Koroneiki) submetidas ao teste de viabilidade (tetrazólio) e vigor (atividade respiratória, método de Pettenkofer).

Cultivar	Atividade respiratória (mg CO ₂ .mg ⁻¹ semente.h ⁻¹)	Teste de Tetrazólio	
		Viáveis (%)	Inviáveis (%)
Arbequina	48,4 a	86 a	14 b
Koroneiki	30,8 b	6 b	94 a

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem à nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey

Tabela 2. Germinação de sementes íntegras e embriões de duas cultivares de oliveira (Arbequina e Koroneiki) *in vitro* aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a inoculação.

	Cultivar	Dias após inoculação	% Germinação
Sementes	Arbequina	15	1 a
		30	7 a
		45	28 a
		60	39 a
		75	45 a
	Koroneiki	15	0 a
		30	1 b
		45	5 b
		60	9 b
		75	16 b
Embriões	Arbequina	15	52 a
		30	64 a
		45	70 a
		60	65 a
		75	64 a
	Koroneiki	15	28 b
		30	38 b
		45	37 b
		60	37 b
		75	33 b

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem à nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey

ferramenta útil para aumento da eficiência da germinação e estabelecimento de plantas para programas de melhoramento genético, visto que as plantas geradas por esse sistema apresentam melhor desempenho quando comparadas às plantas oriundas de sementes.

Houve diferença significativa para a germinação *in vitro* entre as sementes desprovidas de endocarpo e os embriões isolados para as duas cultivares, aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias (Tab. 2). Entretanto, após a germinação *in vitro* dos embriões as plântulas não continuaram a se desenvolver e secaram, sendo necessário testar outros meios de cultura mais adequados para o cultivo *in vitro* de embriões de oliveiras, pois, num primeiro momento os embriões são capazes de iniciar o processo de germinação com pouca influência da composição do meio externo, utilizando apenas as suas reservas, entretanto, nas etapas posteriores, que necessitam de fonte de carbono e energia para a síntese e desenvolvimento de novos tecidos e órgãos, o papel do meio de cultura torna-se imprescindível (Cançado *et al.* 2013).

Os testes de viabilidade e vigor, realizados pelo tetrazólio e atividade respiratória, respectivamente, confirmam os resultados de porcentagem de germinação *in vitro*, sendo verificado maior viabilidade e vigor da cv. Arbequina em relação a cv. Koroneiki. É importante ressaltar que a germinação *in vitro* de embriões é mais rápida comparada às sementes íntegras reduzindo o tempo para obtenção de um novo indivíduo das cultivares Arbequina e Koroneiki, resultados estes de grande relevância tendo em vista a dificuldade de estabelecer e uniformizar a germinação de se-

mentes de oliveiras a fim de gerar um pomar homogêneo. Diante do exposto, conclui-se que a maior viabilidade e vigor das sementes da cv. Arbequina corresponde a sua maior porcentagem de germinação *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ACEBEDO, M.M., LAVÉE, S., LIÑÁN, J.B. & TRONCOSO, A.A. 1997. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69: 207-215.
- BARCELOS, M.F.P., ANGELIS-PEREIRA, M.L.C. & OLIVEIRA, A.F. 2006. Aspectos nutricionais do azeite de oliva e sua influência na dieta humana. *Informe Agropecuário*, 27(213): 98-104.
- BANDINO, G., SEDDA, P. & MULAS, M. 1999. Germination of olive seeds as affected by chemical scarification, hot water dip, and gibberellic acid treatments. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 474: 35-38.
- BERTONCINI, E.I., TERAMOTO, J.R.S. & PRELA-PANTANO, A. 2010. Desafios para produção de azeite no Brasil. Infobibos – informação tecnológica. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm>. Acesso em: 26 mar. 2014.
- CANÇADO, G.M., BRAGA, F.T., SOUZA, R.A.V., NUNES, C.F., RIBEIRO, A.P. & SOARES, B.D.F. 2013. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. In: OLIVEIRA, A.F. (Ed.). *Oliveira no Brasil: tecnologias de produção*. Belo Horizonte: Epamig. p. 275-310.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G. & BORGHETHI, F. *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. p. 149-162.
- EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 2006. Azeitona e Azeite de oliva: tecnologias de produção. *Informe Agropecuário*, 27(231): 7-12.
- OLIVEIRA, A. F. 2001. Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira (*Olea europaea*). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, MG (Brasil), 122 p.
- OLIVEIRA, A.F., PASCAL, M., CHALFUN, N.N.J., REGINA, M.A. & RINCÓN, C.R. 2003. Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. *Ciência Agrotecnológica*, 27(2): 332-338
- OLIVEIRA, A.F., ANTUNES, L.E.C. & SCHUCH, M.W. 2006. Caracterização morfológica de cultivares de oliveira em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. *Informe agropecuário*, 27(231): 55-62.
- MARCOS FILHO, J., BENNETT, M.A., MCDONALD, M.B., EVANS, A. & GRASSBAUGH, E.M. 2006. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. *Seed Sci. Technol.*, 31: 485-497.
- MURASHIGE, T. & SKOOG. 1962. F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- MENDES, C.R., MORAES, D.M., LIMA, M.G.S. & LOPES, N.F. 2009. Respiratory activity for the differentiation of vigor on soybean seeds lots. *Rev. bras. sementes*, 31: 171-176.
- Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Estado Rio Grande do Sul. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/7432/?Pr%C3%B3-Oliva>>. Acesso em 30 ago. 2015.
- SOUZA, R.A.V., BRAGA, F.T., NETO, J.V., MENDONÇA, E.A.F., AZEVEDO, P.H. & CANÇADO, G.M.A. 2011. Viabilidade e germinação de embriões de oliveira submetidos a diferentes condições de armazenamento de frutos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46(3): 309-314.