



**BÁRBARA GOMES RIBEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E DORMÊNCIA  
DE SEMENTES DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

**LAVRAS – MG  
2020**

**BÁRBARA GOMES RIBEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE  
OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Laene Moreira de Carvalho  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

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

Ribeiro, Bárbara Gomes.

Caracterização morfofisiológica e dormência de sementes de  
oliveira (*Olea europaea* L.) / Bárbara Gomes Ribeiro. - 2020.  
91 p. : il.

Orientador(a): Maria Laene Moreira de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.  
Bibliografia.

1. Azeitona. 2. Análise de imagens. 3. Germinação. I. de  
Carvalho, Maria Laene Moreira. II. Título.

**BÁRBARA GOMES RIBEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE  
OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)**

**DORMANCY AND MORPHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF  
OLIVE SEEDS (*Olea europaea* L.)**

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

APROVADA em 28 de abril de 2020.

Dr. Luiz Fernando de Oliveira da Silva  
Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Maria de Oliveira Pires  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa Oliveira dos Santos

EPAMIG  
UFLA  
UFLA  
UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Laene Moreira de Carvalho  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

*À minha mãe Beatriz, ao meu irmão Felipe e  
ao meu segundo pai, Nivaldo, em memória.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Saber finalizar uma etapa da vida requer tanta sabedoria e paciência quanto para iniciá-la. É preciso entender que há tempo certo para plantar, mas também para colher, para agir, para seguir e para aprender.

O doutorado me ensinou dar tempo ao tempo e felizmente não estive sozinha nesses dias. Agradeço muito aos meus amigos queridos, Jaqueline e Diego que sempre estiveram ao meu lado, tornaram os dias difíceis mais leves, me apoiaram, me ajudaram, me divertiram e estiveram sempre presentes, amo vocês.

Obrigada também aos estudantes de iniciação científica, Rodrigo e Júlia, e aos pós-doutorandos, Dayliane e Renato, que me ajudaram de forma significativa na execução desse trabalho, sempre disponíveis, pacientes e dispostos. Obrigada pela dedicação e apoio.

À minha orientadora querida e amiga, Laene, por todos os ensinamentos, por todas as conversas, conselhos, por todas as oportunidades, por todo carinho, apoio e paciência, minha enorme gratidão.

Às professoras, Raquel e Heloisa, que são muito mais do que professoras, são grandes amigas, que admiro e amo muito. Sou muito grata a vocês. Obrigada amigas por me ajudarem tanto, obrigada por todos os conselhos, pelos puxões de orelha, pelo apoio técnico e psicológico e por serem tão presentes.

Agradeço muito também aos técnicos e amigos do setor de sementes, Dalva, Rafaela, Rose, Geraldo, Vivi e Iris por todo carinho, apoio, cuidado e incentivo. Aos professores do setor, Renato, João, Édila e Sttela por todos os ensinamentos.

À Marli, secretária mais do que querida da pós-graduação. Obrigada Marli por ser sempre tão disposta, por todas as conversas, por todo apoio, ajuda e amizade.

Ao Pedro, Tatu, pelo apoio, dedicação, paciência, amizade e pelas palavras de incentivo.

Às minhas amigas queridas do Chuveirinho, com as quais sempre vivi momentos incríveis e inesquecíveis. Amigas que levarei para sempre.

À pessoa mais especial da minha vida, minha mãe, pelo amor incondicional, por todo apoio, pela amizade, pelo incentivo diário, por todos os dias me fazer acreditar que sou capaz, e simplesmente por existir. Ao meu irmão Felipe que sempre será minha outra metade. Amo vocês minha família. Ao Nivaldo, que partiu há pouco, mas continua vivo em mim.

Ao meu companheiro e amigo Leandro que me ensinou a amar e me ensinou o que é o amor. Obrigada meu amor, por toda paciência e amizade. Te amo!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das frutíferas mais antigas do mundo. Sua origem se perdeu no tempo e se mistura com a evolução das civilizações. As primeiras pesquisas realizadas em Minas Gerais são datadas de 2008 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) no município de Maria da Fé. Há 40 municípios em Minas Gerais envolvidos na produção de azeitonas e tudo indica que em médio e longo prazo o Brasil se torne um grande produtor. Para que isso se torne possível, pesquisas envolvendo a propagação e seleção de cultivares mais adaptadas às nossas regiões são de grande importância. A oliveira é multiplicada em grande escala por meio de estacas. Entretanto, o sucesso da estaquia depende da capacidade de formação de raízes. Para algumas cultivares esse é um grande entrave. A fim de contornar esse problema, a técnica de enxertia tem sido empregada, e os porta enxertos são obtidos via sementes, sendo a dificuldade de germinação dessas sementes um enorme gargalo, pela presença do endocarpo duro e pela hipótese da presença de dormência nas sementes de oliveira. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho caracterizar cultivares de oliveira, assim como estudar alternativas para superação da dormência das sementes. Foram utilizados frutos de quatro cultivares de azeitona, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, colhidos em Maria da Fé – MG, safra 2017. Foi realizada a análise de imagens de frutos, endocarpos e sementes por meio de raios X e Ground-Eye®, além da avaliação fisiológica de plântulas. Foi realizada também a análise molecular por meio da análise de DNA, com a utilização de marcador molecular ISSR. Para o estudo da dormência, realizou-se a estratificação e escarificação de endocarpos e sementes de azeitona. Foram utilizados para os ensaios o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em diferentes tempos e concentrações, e também diferentes tempos de exposição de endocarpos e sementes ao frio (10°C). Após a submissão aos tratamentos, endocarpos e sementes foram submetidos ao teste de germinação e comparados com a testemunha. A diferenciação de cultivares foi possível pela análise de imagens. As variáveis de geometria são as que melhor diferenciaram as cultivares pela análise do endocarpo. Com relação às sementes, a avaliação de coloração permitiu melhor diferenciação das cultivares. A análise genética também foi eficiente para caracterização das cultivares. Pelo dendrograma foi possível visualizar baixa similaridade genética entre a cultivar Arbequina e as demais. Para os tratamentos de escarificação e estratificação, as cultivares estudadas não responderam de forma semelhante. A germinação de endocarpos de oliveira, das cultivares Arbequina, Koroneiki e Maria da Fé, foi possível quando submetidos ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 18 horas. Porém, a utilização do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por si só, não possibilitou a germinação de endocarpos, sendo necessária a estratificação dos mesmos e a combinação de GA<sub>3</sub>. A estratificação por 30 dias possibilitou incrementos na germinação dos endocarpos das cultivares Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, indicando que a dormência de sementes de oliveira é física e fisiológica.

**Palavras-chave:** Azeitona. Análise de imagens. Germinação.

## ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the oldest fruit trees in the world. Its origin got lost in time and mixes with the evolution of civilizations. The first researches realized in Minas Gerais are dated in 2008 by the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) in the municipality of Maria da Fé. There are 40 municipalities in Minas Gerais which are involved in the production of olives and everything points that, in the mid- to long-term, Brazil becomes a major producer. For that, researches involving the propagation and selection of more adapted cultivars to our regions are important. The olive tree is multiplied on large scales through stakes. However, the success of the cutting depends on the capability to form roots. For some cultivars, this is a great obstacle. In order to overcome this problem, the grafting technique has been used, and rootstocks are obtained through seeds, however, the seed germination is a huge bottleneck, due to the presence of a hard endocarp and the hypothesis of the presence of dormancy in the olive seeds. Thus, the objective of this work was to characterize olive cultivars, as well as to study alternatives to overcome seed dormancy. Fruits of four olive cultivars were used, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki and Maria da Fé, harvested in Maria da Fé - MG, in 2017. The image analysis of fruits, endocarps and seeds were done using the X-rays and the Ground-Eye®, in addition to the physiological evaluation of seedlings. Also, molecular analysis was performed through DNA analysis, using the ISSR molecular marker. For the study of dormancy, stratification and scarification of endocarps of olive seeds were carried out. It was used for the experiments the gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at different periods and concentrations, and also different periods of exposure of endocarps and seeds to cold (10°C). After the exposure to treatments, endocarps and seeds were submitted to the germination test and compared with the control. It was possible to differentiate the cultivars by image analysis. The variables of geometry are the ones that best distinguished the cultivars by analyzing the endocarp. Regarding seeds, the evaluation of the color allowed a better cultivar differentiation. Genetic analysis was also efficient for characterizing the cultivars. Through the dendrogram it was possible to visualize a low genetic similarity between the cultivar Arbequina with the others. For scarification and stratification treatments, the cultivars studied did not respond in a similar way. The germination of olive endocarps from the cultivars Arbequina, Koroneiki and Maria da Fé, was possible when submitted to H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 18 hours. However, the use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> itself did not allowed the germination of endocarps, requiring stratification of them combined with GA<sub>3</sub>. Stratification for 30 days allowed an increased germination of the endocarps of the cultivars Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki and Maria da Fé, indicating that the dormancy of olive seeds is physical and physiological.

**Keywords:** Olive. Image analysis. Germination.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Histórico, importância econômica e caracterização da oliveira</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Propagação</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Dormência</b> .....	<b>21</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	<b>31</b>
	<b>ARTIGO 1 - ANÁLISE DE IMAGENS E ISSR PARA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE OLIVEIRA (<i>Olea europaea</i> L.)</b> .....	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Análise morfológica de frutos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>Obtenção e análise de endocarpos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Avaliação física e fisiológica das sementes</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise molecular</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Análise morfológica dos frutos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise morfológica dos endocarpos</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise morfológica e fisiológica das sementes</b> .....	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise genética</b> .....	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>
	<b>ARTIGO 2 - ESTRATIFICAÇÃO E ESCARIFICAÇÃO PARA SUPERACÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE OLIVEIRA (<i>Olea europaea</i> L.)</b> .....	<b>70</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>74</b>
<b>2.1</b>	<b>Determinação do teor de água</b> .....	<b>74</b>
<b>2.2</b>	<b>Embebição</b> .....	<b>74</b>
<b>2.3</b>	<b>Extração dos endocarpos e estratificação das sementes</b> .....	<b>75</b>
<b>2.4</b>	<b>Escarificação química dos endocarpos</b> .....	<b>76</b>

2.5	Estratificação dos endocarpos .....	77
2.6	Análise Estatística.....	78
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
3.1	Teor de água.....	79
3.2	Embebição .....	79
3.3	Extração dos endocarpos e estratificação das sementes.....	80
3.4	Escarificação química e estratificação dos endocarpos.....	82
4	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>89</b>

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea*) é considerada uma das frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem, mas só no século XVI foi introduzida no Brasil e, só em 2004 chegou a Minas Gerais. O azeite de oliva, um dos principais produtos obtidos das oliveiras, representa cerca de 3% da produção dos óleos vegetais consumidos pelo homem, mas apresenta alto valor comercial. O ano de 2018 foi marcado por um aumento expressivo na produção de azeitonas e pela comemoração dos 10 anos da primeira extração de azeite extravirgem no Brasil.

Por se tratar de uma cultura nova ainda está em adaptação e, para garantir a continuidade do crescimento na produção de azeites no Brasil, é necessário que se invista ainda mais em pesquisas que promovam a melhoria dos pomares implantados.

A maioria das cultivares utilizadas no Brasil são de origem europeia e apresentam dificuldades na adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras. Dentre as cultivares utilizadas na zona da Mantiqueira, área de maior expansão da cultura, destacam-se, Arbequina, Ascolano, Maria da Fé e Koroneiki, as quais apresentam diferentes respostas ao enraizamento, à produtividade e à reprodução via sementes.

As sementes de oliveira, embora sejam viáveis, são envoltas por um endocarpo extremamente resistente e possuem dormência. Por esse motivo, outros métodos de propagação vêm sendo utilizados como, por exemplo, a enxertia, a qual é utilizada principalmente para cultivares com baixa capacidade rizogênica, sendo as sementes dessas cultivares utilizadas na obtenção de porta-enxertos.

Poucos trabalhos foram realizados na tentativa de quebrar a dormência e viabilizar a propagação dessa espécie via sementes. Desta forma, trabalhos visando o estudo da morfologia das sementes de diferentes cultivares e alternativas para quebra de dormência são de grande valia devido ao amplo avanço da cultura no país. Com auxílio de ferramentas, como a análise de imagens e a análise molecular, é possível produzir resultados que ajudem os produtores a tomarem decisões assertivas, com a obtenção de cultivares mais adequadas, facilitando o cultivo da oliveira e contribuindo para o aumento da produtividade dos pomares.

Devido à alta variabilidade genética e às poucas informações disponíveis sobre sementes de oliveira, a proposta da pesquisa foi gerar resultados sobre a caracterização morfológica de frutos, endocarpos e sementes de oliveira pela análise de imagens, além da análise molecular dessas cultivares, assim como o estudo da germinação e dormência de sementes de diferentes cultivares de oliveira.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico, importância econômica e caracterização da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem. Seu cultivo remota há 6000 anos atrás. A origem da oliveira se perdeu no tempo e se mistura com a evolução das civilizações na Bacia do Mediterrâneo. Por isso não se sabe ao certo a região de origem e nem quando surgiu a espécie, mas acredita-se que a oliveira tenha se originado na Ásia Menor, onde são abundantes e formam verdadeiras florestas (COI, 2018a).

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI), a produção mundial de oliveira foi de 2.754 milhões toneladas na safra 2018/2019. Para a próxima safra 2019/2020, há uma estimativa de queda de 3,2% na produção. Já o consumo deve ter um aumento de 6,4% em relação à safra passada (OLIVE OIL TIMES, 2020).

Dentre os produtos obtidos das oliveiras, o azeite e as azeitonas de mesa são os que mais se destacam. O azeite de oliva é um dos mais importantes azeites vegetais do ponto de vista econômico. Representa apenas 3% do volume mundial de óleos, porém entre 10 e 20% do valor comercial, o que ressalta o seu alto valor econômico (COUTINHO et al., 2009).

Mesmo com uma queda de cerca de 3% na produção na última safra, a Espanha continua a liderar o ranking de maior produtor, com uma produção de aproximadamente 1.260 milhões de toneladas, o que representa cerca de 40% do total mundial. Além de principal produtor, a Espanha também lidera a exportação. O azeite espanhol é exportado para cerca de 100 países, nos cinco continentes (AZEITE, 2016; OLIVE OIL TIMES, 2018).

Em relação ao consumo de azeite de oliva, os países pertencentes à União Europeia (EU), são sem dúvidas os maiores consumidores. Dentre eles, se destaca a Itália, maior consumidora, com 560,7 mil toneladas, seguida por Espanha e Grécia. Outros países como Argentina e Chile, se destacam pelo baixo consumo do óleo, com 8 e 6 mil toneladas de azeite por ano. Já no Brasil, de acordo com o COI, o consumo de azeite, ficou próximo de 70 mil toneladas no último ano de produção (2017/2018), sendo o quinto maior consumidor do produto dentre os países não pertencentes a EU (COI, 2018b).

No Brasil a história do azeite é recente, sendo que as primeiras tentativas de produção ocorreram oficialmente nos anos de 1950 no estado do Rio Grande do Sul. Mais tarde em 2008, a Empresa de Pesquisas Agronômicas de Minas Gerais (EPAMIG) iniciou trabalhos de campo

que identificaram a Serra da Mantiqueira como uma região propícia para a produção de azeitonas (ASSOOLIVE, 2016).

O consumo de azeite no país aumentou quase cinco vezes nos últimos 15 anos, e esse aumento se deu pela conscientização dos benefícios que o azeite traz para a saúde e também devido à melhora no poder aquisitivo da população brasileira (OLIBI, 2016). O azeite extravirgem representa um dos produtos alimentares mais importantes na dieta mediterrânea, sendo muito apreciado pelos consumidores devido às propriedades organolépticas, qualidades nutricionais e de saúde, e elevado tempo de vida útil.

Atualmente, 85% do azeite de oliva disponível no Brasil é proveniente de países europeus, isso garante ao país o quarto lugar de importador de azeite no mundo. As marcas mais importadas são de origem portuguesa e espanhola (AGROTYPOS, 2016).

Minas Gerais entrou para a rota da produção e processamento da azeitona há nove anos, e hoje aproximadamente 40 municípios do estado, localizados na serra da Mantiqueira, produzem não só o azeite extravirgem, mas também cosméticos à base de azeitona. Considerando apenas a região dos Contrafortes da Mantiqueira, estima-se que existam em torno de 200 olivicultores, distribuídos em 70 municípios, e uma área plantada de aproximadamente 2.500 hectares. De acordo com o Instituto Brasileiro de Olivicultura (Ibraoliva), espera-se que a produção de azeite de oliva cresça no Brasil mais de 40% em 2018, chegando a 150 mil litros. O aumento na produção será possível devido ao incremento na safra de azeitonas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. (AGÊNCIA MINAS, 2016; DCI, 2018).

No que diz respeito às azeitonas de mesa, tanto a produção quanto o consumo mundial aumentaram muito nos últimos 30 anos, 211% e 186%, respectivamente. Mesmo com uma queda de 12% na produção, o principal produtor continua sendo a Espanha, país no qual mais de 5% dos olivais são destinados a esse fim. (TERAMOTO et al., 2013; FERREIRA, 2015; CONFAGRI, 2018b).

Há potencial para que o Brasil, em médio e longo prazo, torne-se um grande produtor de azeitonas. Porém o maior desafio para que isso ocorra é possibilitar que aqueles que pretendem investir nesta cultura tenham acesso às informações técnicas. A utilização de tecnologia inadequada, isto é, sem conhecimentos básicos do sistema de produção, como zoneamento agroclimático, obtenção de mudas, qualidade de mudas, escolha e preparo da área de plantio, poda, manejo de pragas e doenças, dentre outras técnicas de manejo, torna o cultivo precário e deficiente (COUTINHO et al., 2015).

As oliveiras pertencem à família *Oleaceae*, do gênero *Olea*, o qual possui cerca de 35 espécies, sendo que a *Olea europaea* L. é a única que possui frutos comestíveis. Engloba

espécies distribuídas por regiões tropicais e temperadas e a maioria das plantas dessa família são árvores ou arbustos (COUTINHO et al., 2015).

O desenvolvimento das plantas pode ser separado em dois estádios: o juvenil e a fase adulta. As diferenças entre eles estão na capacidade de reprodução (somente na fase adulta), e no potencial de enraizamento (maior durante o período juvenil), além das diferenças morfológicas de folhas e ramos (NAVERO et al., 2017).

O sistema radicular da oliveira é determinado pela sua origem, pelas características do solo, e também pela disponibilidade de água. Plantas oriundas de sementes apresentam uma raiz pivotante central, profunda, denominada gavião ou raiz mestra, sem ocorrência de ramos laterais nos primeiros três a quatro anos. Já em plantas obtidas por estaquia, o sistema radicular é fasciculado, com a emissão de três a quatro raízes semelhantes à emitida via semente. Em ambos os casos, as raízes podem atingir de 20 a 80 cm de profundidade, dependendo, exclusivamente, das condições em que se encontram.

As azeitonas, frutos da oliveira, são pequenos, de forma elipsoidal a globular, dependendo da cultivar, medem entre 1 a 4 cm e podem ter até 2 cm de diâmetro. Possuem coloração variando de preto a preto-violáceo, mas muitos frutos são colhidos antes da maturação e por isso se encontram verdes. O fruto é do tipo drupa, possui apenas uma semente e é composto por três tecidos principais: endocarpo, mesocarpo e exocarpo (NAVERO et al., 2017).

São plantas conhecidas pela bienalidade, ou seja, os crescimentos do ano só produzem no ano seguinte. Desta forma, em anos com alto percentual de vingamento de frutos, as reservas são direcionadas para o crescimento vegetativo, o que compromete a produção da safra seguinte (RIBEIRO, 2016).

No cultivo da oliveira, as condições climáticas podem afetar sobremaneira a morfologia, o desenvolvimento e a produção, com reflexos na quantidade e na qualidade das azeitonas e, conseqüentemente, do azeite produzido. Porém, por se tratar de uma espécie tipicamente lenhosa, são capazes de tolerar vários fatores adversos como, a baixa disponibilidade de água no solo, alta salinidade e altos níveis de irradiância. A região Sul de Minas Gerais, devido à altitude, apresenta condições propícias ao cultivo e, a ocorrência de baixas temperaturas, possibilita a vernalização natural, fator limitante para que ocorra o florescimento da cultura (OLIVEIRA, 2010c).

A maioria das cultivares utilizadas no Brasil tem origem europeia e por isso apresentam dificuldades de adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras. Com mais de 1000 cultivares catalogadas pelo mundo, o Brasil conta com aproximadamente 15 que são

amplamente cultivadas. Dentre elas, destacam-se as cultivares Arbequina, Ascolano, Koroneiki e Maria da Fé (OLIVAPEDIA, 2019). Diante disso, a compreensão de fatores que podem vir a alterar o desenvolvimento morfológico e o comportamento fisiológico das oliveiras nessa região de cultivo são importantes para o manejo racional da cultura e para adaptação de tecnologias de produção como, por exemplo, o método de propagação (OLIVEIRA et al., 2015).

Com os trabalhos desenvolvidos até o momento, nota-se que a resposta de cada cultivar aos tratamentos de quebra de dormência é diferente, o que pode ser um gargalo nas pesquisas direcionadas à utilização de porta enxertos oriundos de sementes. Outro obstáculo nas pesquisas com sementes de oliveira é a diferente resposta das cultivares ao enraizamento, o que está intimamente relacionado ao potencial genético. Diante disso, conhecer as características das cultivares que serão utilizadas é muito importante para implantação e produção dos pomares.

Das 63 cultivares registradas no Ministério da Agricultura, 33 foram registradas pela EPAMIG, das quais oito foram protegidas junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, MGS ASC315, MGS GRAP556, MGS ASC322, MGS MARIENSE, MGS MISS293, MGS NEBLINA, MGS GRAP541 e MGS GRAP561 (BRASIL, 2019; SILVA, 2011).

As cultivares Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e a Maria da Fé são algumas das mais cultivadas no país (ASSOOLIVE, 2018; GUIMARAES, 2018) e, por apresentarem interesse comercial, as mesmas foram selecionadas para serem utilizadas no presente estudo.

A cultivar Arbequina tem origem espanhola e é uma das mais cultivadas no mundo. Uma cultivar considerada rústica, apresenta baixo vigor, levemente ramificada, o que permite maior adensamento em campo e, dentre as cultivares de oliveira existentes, é a que mais se adapta a diferentes condições de solo e clima. Toleram bem o frio, porém é sensível a solos encharcados. Apresenta frutos pequenos, o que dificulta a colheita mecânica, mas é muito apreciada pela precocidade com que entra na fase de produção, cerca de três anos, e também pela alta produtividade. Possui maior vocação para azeite, com bom rendimento graxo, de 17 a 19% e, excelente qualidade do azeite (COUTINHO et al., 2015; NAVERO et al., 2017).

A germinação de sementes dessa cultivar, sem nenhum tratamento para a superação da dormência, é baixíssima. Nos trabalhos já realizados, os autores obtiveram o percentual de germinação variando de 0 a 15% nos tratamentos testemunhas e, após a submissão das sementes a pelo menos um método de quebra de dormência, essa porcentagem atingiu até 69% (ACEBEDO et al., 1997; ABU-QAOU, 2005; ROSTAMI e SHASAVAR, 2009).

Com relação à aptidão ao enraizamento de estacas, a cultivar pode ser considerada como de baixa a média aptidão. Em trabalhos realizados com a cultivar Arbequina foi verificado que

o enraizamento de estacas dessa cultivar podem variar de 12 a 29% (ALVES et al., 2010; RIBEIRO, 2010; SILVA et al., 2012).

Por todas suas características positivas, principalmente para a produção de óleo, a Arbequina não é apenas a mais cultivada, mas também a mais pesquisada e estudada, principalmente para a criação de novas cultivares (OLIVAPEDIA, 2019).

Já a cultivar Ascolano, originária da Itália, produz árvores altas, com tendência à verticalização e copa densa. É uma cultivar auto incompatível, ou seja, necessita de outra cultivar para a polinização. É muito exigente quanto ao solo e clima, e possui vigor elevado. Os frutos são grandes com rápida maturação e possuem maior vocação para mesa (OLIVAPEDIA, 2018; COUTINHO et al., 2015). Não há estudos sobre a germinação de sementes dessa cultivar. Porém, no que diz respeito ao enraizamento de estacas, alguns trabalhos preliminares já realizados, alcançaram de 28 a 77% de estacas enraizadas, o que permite considerá-la uma cultivar com alto poder de enraizamento, principalmente quando comparada à cultivar Arbequina (ALVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010b SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

No caso da cultivar Ascolano 315, a qual foi utilizada no estudo em questão, pouca informação foi gerada, trata-se de uma cultivar brasileira, registrada pela EPAMIG, obtida por cruzamento espontâneo da cultivar Ascolano com outra cultivar desconhecida, por isso a importância da caracterização morfológica, com atributos de geometria, textura e coloração, assim como de estudos que forneçam metodologias para quebra de dormência e que auxiliem na propagação sexuada da cultivar.

A cultivar Maria da Fé, também brasileira, recebe esse nome em homenagem à cidade onde foi desenvolvida, Maria da Fé, Sul do estado de Minas Gerais. Essa cultivar surgiu a partir da manipulação genética da cultivar Galega, o que fez com que a árvore se tornasse mais adaptada às condições brasileiras, especialmente no Alto da Mantiqueira. A árvore pode atingir até 6 metros de altura, é muito resistente às variações climáticas e, por isso, é considerada uma planta rústica. Possui boa produtividade, principalmente quando plantada em elevadas altitudes, porém, possui baixo rendimento de óleo. Apesar de apresentar maior vocação para produção de azeites, pode ser também direcionada para consumo de mesa (OLIVAPEDIA, 2019).

Assim como a cultivar Ascolano 315, não há relatos sobre germinação de sementes da cultivar Maria da Fé. Porém, em trabalhos já realizados, a cultivar Maria da Fé foi caracterizada como de baixo potencial de enraizamento (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; MARIOSA, 2014).

Por último a cultivar Koroneiki, destinada também à produção de azeite, é a principal cultivar utilizada na Grécia, representando cerca de 60% dos olivais do país. Planta com vigor médio, copa com densidade média e aberta, resistente à seca, porém muito sensível ao frio, possui produtividade elevada e constante, os frutos são pequenos, mas possuem grande quantidade de óleo, de 20 a 25% e com características organolépticas apreciadas (COUTINHO et al., 2015; OLIVABRASIL, 2019).

No que diz respeito à germinação de sementes, essa cultivar também apresenta baixo poder germinativo, assim como a cultivar Arbequina. Em trabalhos já realizados com o intuito de verificar a germinação de sementes de oliveira da cultivar Koroneiki, autores encontraram resultados de 1 a 35% de germinação para os tratamentos testemunhas. Porém quando foram submetidas a pelo menos um tratamento de quebra de dormência, o percentual de germinação atingiu até 73% (BANDINO et al., 1999; ROSTAMI e SHASAVAR., 2009; SANTOS et al., 2015).

Já na propagação por estacas, a cultivar Koroneiki pode ser considerada como de média aptidão ao enraizamento, mas pode ser considerada de fácil enraizamento quando comparada com outras cultivares (HECHMI et al., 2013). Trabalhos já realizados mostraram que o percentual de enraizamento de estacas dessa cultivar pode variar de 14,5 a 40% (HECHMI et al., 2013, PENSO et al., 2016).

Ainda que a propagação por sementes não seja aconselhável devido à variabilidade genética e ao longo período juvenil que as plantas propagadas via sementes apresentam, o estudo sobre a germinação dessa espécie é de grande importância, principalmente no que diz respeito a programas de melhoramento genético, com a seleção de cultivares mais adaptadas às condições de cultivo no Brasil, assim como para a produção de porta-enxertos, para a produção de mudas. Porta-enxertos produzidos por sementes apresentam crescimento inicial vigoroso e sistema radicular profundo, o que os torna mais resistentes às condições adversas, principalmente ao déficit hídrico (COUTINHO et al., 2009).

Na literatura poucos trabalhos envolvendo sementes de oliveira são encontrados. Embora sejam viáveis, as sementes apresentam tanto dormência física, por serem envoltas por um endocarpo extremamente resistente, quanto dormência embrionária (BOHM, 2013).

Veloso et al. (2018) avaliando características do endocarpo como marcadores morfológicos na distinção de cultivares, afirmaram que a rugosidade da superfície e o número de feixes vasculares sobre a superfície do endocarpo eram características com pouca variação entre cultivares. No entanto, encontraram diferenças e variabilidades importantes em outras características do endocarpo, como tamanho e rugosidade.

A utilização de técnicas como, análise de imagens, podem auxiliar no estudo de características morfológicas das sementes, possibilitando o desenvolvimento de metodologias mais precisas para distinção de características morfológicas.

Medidas de caracterização morfológicas, colorimétrica e textural de muitos tipos de sementes foram relatadas para cereais e leguminosas a fim de identificar diferentes materiais genéticos. Andrade et al. (2016) utilizaram o equipamento de análise de imagens GroundEye® para distinção de cultivares de soja, já Venora et al. (2009) usando outro tipo de software fizeram a distinção entre cultivares de feijão; Lima et al. (2018) utilizaram técnicas de análise de imagens como, raios X e o *software* (GroundEye®), para caracterização morfológica de sementes de paricarana.

A identificação da diversidade genética existente é essencial para o manejo sustentável e a preservação do germoplasma de oliveiras. Esse processo começa com estudos morfológicos como, por exemplo, características do endocarpo que tem sido considerado um dos traços mais discriminativos, pois consistem de uma característica altamente herdável e com baixa sensibilidade às condições climáticas (FENDRI et al., 2010) e, com o uso de marcadores moleculares, como o SSR (Simple Sequence Repeat) e o ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Fendri et al. (2010); Trujillo et al. (2014) e Veloso et al. (2018) utilizaram o marcador SSR para identificar e caracterizar acessos de diferentes cultivares de oliveira. Nos três trabalhos, os autores encontraram alta diversidade genética, confirmando a eficiência do marcador na identificação dos acessos, e também, erros de nomenclatura e, ou classificação das cultivares. Inicialmente as cultivares de oliveira eram nomeadas de acordo com traços morfológicos, por finalidade ou por localidade de origem, isso fez com que sinônimos e homônimos surgissem. Daí a importância dos marcadores, que aliados à análise dos endocarpos, possibilitam a identificação correta das cultivares.

Outros marcadores moleculares também foram utilizados. Linos et al. (2014) utilizaram os marcadores ISSR, RAPD e também o marcador SSR, para identificar e explorar 101 cultivares de oliveira. Kaya (2015) utilizou o marcador ISSR para determinar a diversidade genética de 40 clones de oliveira obtidos de 8 cultivares e, em ambos os trabalhos, os marcadores foram eficientes e identificaram alta variabilidade genética.

O estudo da morfologia e da variabilidade genética é de extrema importância, pois contribui para a qualidade de óleo, e determina a resiliência da cultura às condições adversas (VELOSO et al., 2018).

## 2.2 Propagação

A oliveira pode ser propagada de diversas formas e, mesmo com sementes viáveis, não possui como principal meio de propagação a reprodução sexuada.

A propagação natural, por sementes, foi a responsável pela difusão da cultura no Mediterrâneo (PENSO et al., 2016) e, nos dias atuais são de grande importância para os programas de melhoramento, na seleção de cultivares mais adaptadas às novas regiões de cultivo e também para a produção de porta-enxertos, principalmente para cultivares de difícil enraizamento. Porém, em cultivos comerciais, a propagação via sementes não é muito desejada, devido ao longo período juvenil das plantas propagadas desta forma, à grande variabilidade genética e ao baixo percentual de germinação, devido às dormências física e fisiológica presentes nas sementes (SANTOS et al., 2015).

Assim como a maioria das espécies frutíferas, a oliveira é multiplicada em grande escala por meio de estacas (NAVERO et al., 2017). O método vem sendo aprimorado desde os anos 70 e, atualmente, utiliza-se estacas semilenhosas, com quatro folhas, enraizadas sob nebulização intermitente e com mecanismos de aquecimento do substrato. É uma técnica eficiente, amplamente utilizada, mas que exige um alto investimento inicial, principalmente no que diz respeito às instalações (OLIVEIRA et al., 2010a). Além disso, essa técnica exige atenção para com determinados fatores que influenciam no enraizamento como, disponibilidade e tipo de material vegetativo a ser utilizado (VIEIRA NETO et al., 2011). Entretanto, o sucesso da estaquia depende da capacidade de formação de raízes adventícias, da qualidade do sistema radicular formado e do desempenho posterior da planta. No caso das oliveiras, o percentual de enraizamento pode variar de 50 a 80%, dependendo diretamente da cultivar utilizada (OLIVEIRA et al., 2009).

Os fatores que afetam o enraizamento das estacas podem ser divididos em exógenos, que dizem respeito à luz, temperatura, umidade e substrato e, os endógenos que envolvem por exemplo as condições fisiológicas da planta mãe e o balanço hormonal (COUTINHO et al., 2015). Outro fator que deve ser considerado no enraizamento das estacas é o potencial genético para emissão de raízes de cada cultivar. Um estudo realizado com 152 cultivares de oliveira, em Córdoba na Espanha, identificou diferenças significativas entre as cultivares quanto ao poder de enraizamento, cuja a causa parece estar relacionada com o equilíbrio endógeno que cada variedade tem entre auxinas, hormônios responsáveis pelo enraizamento e cofatores de enraizamento, tanto promotores como inibidores do processo (MOHEDANO et al., 2010).

Outro método de propagação utilizado em oliveira é a enxertia. Esse método consiste na junção de parte de tecidos de duas plantas de maneira que se unam e formem uma única planta. Poucos estudos sobre enxertia em oliveira foram realizados, por isso ainda não se sabe ao certo as melhores combinações de enxerto e porta-enxerto. O que se sabe é que em oliveira existe uma forte interação entre enxerto e porta-enxerto que determina as características agronômicas da combinação utilizada, podendo-se modificar algumas características como, produção de frutos, teor de óleo dos frutos e peso médio dos frutos. Além disso, pode-se observar alterações nas características fenológicas e vegetativas (OLIVEIRA et al., 2006).

Normalmente a enxertia é utilizada para cultivares de difícil enraizamento. Os porta-enxertos são produzidos via sementes, e por isso apresentam sistema radicular pivotante, profundo e com vigor diferenciado. O principal objetivo desses porta-enxertos são: resistência a pragas e doenças e, tolerância às condições edáficas do local de produção (RIBEIRO, 2016).

Atualmente, o método de enxertia mais utilizado é o de garfo por incrustação de topo sobre plantas obtidas via sementes. Os problemas encontrados para execução dessa metodologia é a dificuldade de germinação das sementes pela presença do endocarpo e pela dormência fisiológica do embrião. Porém, a enxertia de plantas jovens é de grande interesse para o mercado, pois possibilita a resistência da planta a fatores bióticos e abióticos como, por exemplo, a resistência ao *Verticillium dahliae*, salinidade do solo, disponibilidade de água. Além disso, essa técnica também tem sido utilizada para substituição da variedade produtora em olivais já instalados ou para reparação de árvores danificadas (MOTA-BARROSO et al., 2013).

Diante disso, pesquisas com sementes de oliveira são de grande importância para a evolução e o aprimoramento da técnica de enxertia. Sabe-se que plantas propagadas via sementes são mais vigorosas e apresentam maior longevidade, principalmente devido ao sistema radicular pivotante profundo e bem desenvolvido.

### **2.3 Dormência**

A dormência é definida pela incapacidade de germinação em um período específico de tempo, em uma ou mais condições ambientais nas quais a semente germinaria normalmente se não estivesse dormente, apresentando algum bloqueio interno à germinação. (Baskin & Baskin, 2004).

No caso de sementes de oliveira, a espécie desenvolveu mecanismos de sobrevivência, permitindo que a germinação ocorra apenas quando as condições ambientais são favoráveis.

Entre as diferentes formas de dormência, existe a evidência de que a oliveira apresente duas delas, a dormência física, comprovada pela presença do endocarpo extremamente resistente e duro e, a dormência fisiológica embrionária, que é controlada pela imaturidade do embrião e pelos tecidos que rodeiam a semente (BOHM, 2013).

O endocarpo duro, conhecido popularmente como caroço, constitui de um impedimento para a expansão do embrião e, mesmo após ser removido, o processo de germinação ainda é lento, devido à dormência endógena do embrião (MORALES-SILLERO et al., 2012). Alguns trabalhos já foram realizados com o intuito de promover a quebra de dormência em sementes de oliveira.

Crisosto e Sutter (1985a) utilizaram hidróxido de sódio (NaOH) 3% e ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) para a escarificação química de endocarpos da cultivar Manzanillo por diferentes períodos e, após a escarificação, os endocarpos foram misturados com vermiculita úmida e colocados em sacos plásticos para a estratificação a frio ( $15\text{ }^\circ\text{C}$ ) por 30 dias, em dois anos de colheita. Após o período de estratificação montou-se o teste de germinação por 30 dias à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . No primeiro ano de colheita, o  $H_2SO_4$  se mostrou mais eficiente e o período de 18 horas de exposição ao ácido foi o que proporcionou maior porcentagem de germinação, tanto sem quanto com estratificação, alcançando 94% e 98% de germinação, respectivamente. Na safra seguinte os autores obtiveram 100% de germinação submetendo os endocarpos à 20 e 30 horas de  $H_2SO_4$  aliados, com 30 dias de estratificação a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ .

Em outro trabalho realizado por Bandino et al., (1999), os autores utilizaram os seguintes tratamentos:  $H_2SO_4$  e o NaOH nas concentrações de 0,1 N e 1 N, respectivamente, por 12 e 24 horas e, ácido giberélico ( $GA_3$ ) nas concentrações de 500 e 1000 ppm durante 16 horas e, água aquecida a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  por 12 e 24 horas. Os tratamentos foram testados em três cultivares: Koroneiki, Frangivento e Pendolino. Pelos resultados encontrados verificou-se que as cultivares respondem de maneiras diferentes aos tratamentos. Para a cultivar Koroneiki, os tratamentos de 12 horas de NaOH 0,1N e 24 horas de  $H_2SO_4$  0,1N aumentaram para mais de 41% a germinação. Já para a cultivar Frangivento o melhor tratamento foi o de 12 horas de NaOH 0,1N. No caso da cultivar Pendolino, a germinação foi baixa para todos os tratamentos, ficando próximo a 10%.

Mais tarde, em 2005, Abu-Qaoud estudou a quebra de dormência para a cultivar Arbequina, testando também o  $H_2SO_4$ , NaOH, nas concentrações de 0,1N e 1,0N por 24 e 48 horas, água aquecida a 50 e  $100\text{ }^\circ\text{C}$  e, por último, temperatura ambiente por 24 e 48 horas. O autor verificou 60% de germinação aos 115 dias para endocarpos submetidos ao  $H_2SO_4$  0,1N,

afirmando que este tratamento pode ser utilizado como protocolo para aprimorar a germinação de sementes de oliveira (ABU-QAOU, 2005).

Rostami e Shasavar (2009) ao estudarem os efeitos da escarificação química e mecânica de sementes de oliveira das cultivares Arbequina e Koroneiki, testaram o  $H_2SO_4$  por 0, 3, 6 e 9 horas e também a escarificação mecânica, a qual diminuiu a espessura do endocarpo, mas não o perfurou. Verificaram que o tratamento com ácido sulfúrico por 6 e 9 horas foi eficiente para Koroneiki (73%) e Arbequina (69%), respectivamente, e que a escarificação mecânica foi eficiente somente para cultivar Arbequina, a qual apresentou 55% de germinação, contra 5% da cultivar Koroneiki. Dessa forma, os autores concluíram que a escarificação contribui positivamente para a germinação das sementes de oliveira e que o ácido  $H_2SO_4$  se mostrou mais eficiente. Porém, os autores relataram que as cultivares não respondem à escarificação química de forma similar e, por isso, os períodos de tratamento com  $H_2SO_4$  devem ser testados individualmente para cada cultivar.

Ainda sobre a escarificação em oliveira, Lal et al., (2015) testaram  $GA_3$  500 ppm por 12 e 24 horas, HCl 1N por 12 e 24 horas, NaOH 1N por 12 e 24 horas e, água por 12 e 24 horas sobre sementes de duas cultivares, Coratina e Pendolino. Os autores observaram que para ambas cultivares o melhor tratamento foi o de  $GA_3$  500 ppm por 12 horas, apresentando menor tempo de germinação e maior porcentagem de germinação, 85 e 95% respectivamente. Segundo os autores, o  $GA_3$  aumenta o percentual de germinação e reduz o tempo de germinação de sementes de oliveira.

Os trabalhos mencionados acima tratam principalmente da escarificação química para superação da dormência física de sementes de oliveira. Porém, o endocarpo não inibe a embebição e germinação das sementes, ele não apresenta inibidores e, consiste apenas de uma barreira física, uma resistência mecânica, para a germinação. O que foi confirmado por Crisosto e Sutter (1985b) que estudaram o efeito do endocarpo na germinação de sementes de oliveira estratificadas e não estratificadas. Os autores observaram que altos percentuais de germinação foram observados apenas quando o endocarpo foi completamente removido e concluíram que o endocarpo impede a germinação através da resistência mecânica, sendo superada apenas quando a estrutura do endocarpo é alterada.

Como nem sempre a escarificação química funciona bem, a remoção do endocarpo pode ser uma alternativa mais prática e rápida para a superação da dormência física e pode acelerar o processo de germinação dessas sementes. Sotomayor-Léon e Caballero (1990) relataram que a retirada da semente, antes da estratificação, por meio da quebra do endocarpo, não causa danos à mesma e constitui-se de um método rápido e simples, principalmente para viveiros

propagarem os porta-enxertos ou para germinar sementes provenientes de cruzamentos em programas de melhoramento.

A remoção do endocarpo também foi sugerida por Trancoso et al. (1998). Os autores verificaram que sementes com endocarpo levavam quase um ano para formarem plântulas, com germinações variando de 20 a 80%, enquanto sementes sem endocarpo levavam apenas 45 dias com germinações variando de 64 a 76%. Porém, como já mencionado anteriormente, a semente de oliveira não apresenta apenas a dormência física imposta pela presença do endocarpo. A dormência fisiológica também afeta negativamente o processo de germinação e, mesmo após a remoção do endocarpo a germinação dessas sementes é lenta e desuniforme.

O efeito da baixa temperatura para a superação da dormência fisiológica de sementes de oliveira parece já ser um consenso entre os pesquisadores. Alguns trabalhos já foram realizados com o intuito de verificar essa influência.

Voyiatzis e Porlingis (1987) estudaram a temperatura na germinação de sementes de oliveira. Nesse trabalho os autores testaram as temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 e 30°C por 1, 2 e 3 meses e, em seguida transferidas para 20°C. Os resultados mostraram que sementes expostas à temperatura de 10°C por 1 mês e transferidas para 20°C apresentaram maiores percentuais de germinação e que o percentual de emergência dessas sementes foi igual ou superior a 92%.

Hannachi et al. (2011) testaram o efeito do tratamento frio (4°C) na germinação de sementes de oliveira sem o endocarpo. Os autores verificaram que o tratamento a frio durante 4 a 13 dias melhorou a germinação de sementes de 20 para 47%. Após esse período de resfriamento houve decréscimo no percentual de sementes germinadas. Os tratamentos em que as sementes foram submetidas a mais de 30 dias à baixa temperatura, a germinação foi de 1%.

Morales-Sillero et al. (2012) verificaram a influência do tratamento de estratificação sobre sementes de cinco cultivares de oliveira. Os autores concluíram que a submissão das sementes por 30 dias à 14 °C parece ser o tratamento mais adequado para quebra de dormência embrionária, alcançando resultados de 40 a 73% de germinação. Os autores ainda constataram que a redução da exposição das sementes ao frio, abaixo de 18 dias, é insuficiente para superar a dormência e promover a germinação de sementes de oliveira.

Com base nos resultados dos trabalhos já realizados, percebe-se que ainda não há um consenso em relação ao método mais adequado de escarificação, nem da temperatura ideal para estratificação, bem como o tempo necessário para que haja superação da dormência de sementes de oliveira. Dessa forma, estudos que abordem a dormência dessas sementes são de grande importância para que se produzam resultados mais precisos e assertivos, contribuindo de forma significativa com programas de melhoramento e com produtores da cultura.

## REFERÊNCIAS

- ABU-QAoud, H. Germination of Arbequina olive seeds as affected by chemical scarification, hot water treatment and endosperm tissue. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 1, p. 12-17, 2005.
- ACEBEDO, M. M. et al. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. **Scientia Horticulturae**, v. 69, p. 207-215, 1997.
- AGÊNCIA MINAS. **Minas Gerais se destaca como produtor de azeite nacional**. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticia/minas-gerais-se-destaca-como-produtor-de-azeite-nacional>>. Acesso em: 26 out. 2016.
- AGROTYPUS. **Olive oil in Brazil**. Grécia, 2016. <Disponível em: <https://agrotypus.com/2016/02/25/olive-oil-in-brazil/>>. Acesso em: 26 de out. 2016.
- ALVES, T. C. et al. Aptidão ao enraizamento de estacas de diferentes cultivares de oliveira mantidas em banco de germoplasma da EPAMIG em Maria da Fé, sul de Minas Gerais. In: Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2010, Minas Gerais. Anais. 2010.
- ANDRADE, D. B. **Evaluation of the physiological quality of tobacco seeds through image analysis**. 2017. 49 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- ANDRADE, D. B. et al. Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 2, p. 26462-26465, 2016.
- ASSOCIAÇÃO DOS OLIVICULTORES DOS CONTRAFORTES DA MANTIQUEIRA (ASSOOLIVE). **Persistente, a produção de azeite no Brasil tem história de meio século**. Disponível em: <<http://assoolive.blogspot.com.br/>> . Acesso em: 25 de out. 2016.
- \_\_\_\_\_. **Minas Gerais tem safra recorde de azeitona com apoio técnico do Estado**. Disponível em: <<http://assoolive.blogspot.com/2017/05/minas-gerais-tem-safra-recorde-de.html>>. Acesso em: 06 de dez. 2018.
- AZEITE. **O papel da Espanha no comércio de azeite de oliva**. Disponível em: <[http://www.azeite.com.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1470:o-papel-da-espanha-no-comercio-do-azeite-de-oliva&catid=92:o-papel-da-espanha&Itemid=134](http://www.azeite.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1470:o-papel-da-espanha-no-comercio-do-azeite-de-oliva&catid=92:o-papel-da-espanha&Itemid=134)>. Acesso em: 25 de out. 2016.
- BANDINO, G.; SEDDA, P.; MULAS, M. Germination of olive seeds as affected by chemical scarification, hot water DIP, and gibberellic acid treatments. **Acta Horticulturae**, v. 474, p. 35-38, 1999.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Classification, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy. In Pritchard, H. (Ed.) **Seed Conservation: turning Science into practice**. The Royal Botanic Gardens. 2004.
- BOHM, J. **O grande livro da oliveira e do azeite**. Lisboa: Dinalivro, 1. ed, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 395p.

\_\_\_\_\_. **Registro Nacional de Cultivares – RNC**. Disponível em: <[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php)>. Acesso em: 12 de fev. 2019.

CASA DO AZEITE. **Dados do setor: Produção**. Lisboa, 2018. Disponível em: <<http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Dados-sector/Produ%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 24 de out. de 2018.

CAPPATO, L. P.; FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL, A. Azeitona de mesa no Brasil: mercado, tecnologia e aspectos legais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, p. 1327-1335, 2015.

CRISOSTO, C.; SUTTER, E. G. Improving manzanillo olive seed germination. **Hortscience**, v. 20, n. 1, p. 100-102, 1985a.

\_\_\_\_\_. Role of the endocarp in cultivar Manzanillo olive *olea europaea* seed germination. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 110, n. 1, p. 50-52, 1985b.

CONFAGRI. Confederação nacional das cooperativas agrícolas e do crédito agrícola de Portugal CCRL (CONFAGRI). **Agricultura: A produção mundial de azeitonas de mesa multiplicou por 3 em 30 anos**. Portugal, 2018. Disponível em: <<https://www.confagri.pt/producao-mundial-azeitonas-mesa-multiplicou-3-30-anos/>>. Acesso em: 25 de out. 2018b.

\_\_\_\_\_. **Agricultura: Produção mundial de azeite aumenta 14 por cento em 2017/2018**. Portugal, 2017. Disponível em: <<https://www.confagri.pt/coi-producao-mundial-azeite-aumenta-14-cento-20172018/>>. Acesso em: 24 de out. 2018a.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **The Olive Tree**, Madri, 2018. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>. Acesso em: 15 de out. 2018a.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **World Olive Oil Figures**, Madri, 2018. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>. Acesso em: 24 de out. 2018b.

COUTINHO, E. F. et al. **Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. Brasília/DF: Embrapa, 2015. 181 p.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. (Ed.). **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 125 p. — (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 16). 2009.

DEL RIO, C.; CABALLERO, J. M. Aptitud al enraizamiento. In: RALLO, L. et al. (Ed.). **Variedades de olivo en España**. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, 2005. Cap.4, p.277-280.

DIÁRIO, COMÉRCIO, INDÚSTRIA E SERVIÇO (DIC). **Olivicultura: Produção de azeite de oliva no Brasil deve crescer mais de 40% em 2018**. Brasil, 2018. Disponível em: <<https://www.dci.com.br/agronegocios/producao-de-azeite-de-oliva-no-brasil-deve-crescer-mais-de-40-em-2018-1.674572>>. Acesso em: 25 de out. 2018.

DORIGON, V. **Viabilidade econômica do cultivo de oliveira na região da secretaria de desenvolvimento regional de São Miguel do Oeste – SC**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **O azeite nacional cada vez mais forte em Minas Gerais**. Brasil. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1440](http://www.epamig.br/index.php?option=com_content&task=view&id=1440)>. Acesso em: 26 de out. 2016.

FENDRI, M. et al. Simple Sequence Repeat Identification na Endocarp Characterization of Olive Tree Accessions in a Tunisian Germoplasm Collection. **HortScience**, v. 45, n. 10, p. 1429-1436, 2010.

FERREIRA, A. C. E. **Caracterização da cadeia de valor da azeitona de mesa**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

GOMES JUNIOR, F. G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. **Informativo Abrates**, Curitiba, v. 20, n. 3, 2010.

GUIMARÃES, E. **Olivicultura comemora primeira década de produção no Brasil**. Jornal Estado de Minas. Disponível em: <[https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2018/04/23/interna\\_agropecuario,953512/muita-fe-na-azeitona-de-minas.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2018/04/23/interna_agropecuario,953512/muita-fe-na-azeitona-de-minas.shtml)>. Acesso em: 06 de Dez. 2018.

HANNACHI, H. et al. Stone diversity in wild and cultivated olive trees (*Olea europaea* L.). **Dendrobiology**, v. 77, p. 19-32, 2017.

HECHMI, M. et al. Performance of olive cuttings (*Olea europaea* L.) of different cultivars growing in the agro-climatic conditions of Al-Jouf (Saudi Arabia). **American Journal Of Plant Physiology**, v. 8, n. 1, p. 41-49, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Primeira extração de azeite de oliva no país completa dez anos**. Brasil, 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/21062-primeira-extracao-de-azeite-de-oliva-no-pais-completa-dez-anos>>. Acesso em: 29 de out. de 2018.

KAYA, E. ISSR analysis for determination of genetic diversity and relationship in eight Turkish Olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 1, p. 96-99, 2015.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; OLIVEIRA, C. **Anuário Brasileiro de Oliveiras 2018**. Gazeta Santa Cruz, 64p., 2018.

- LAL, S. et al. Olive (*Olea europaea* L.) seed germination as affected by different scarification treatments. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 35, p. 3570-3574, 2015.
- LIMA, J. M. E. et al. Técnicas de análise de imagens para caracterização da qualidade de sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Ciência Florestal**, v.28, n.3, p. 1202-1216, 2018.
- LINOS, A. et al. Genetic structure of the Greek olive germoplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.175, p.33-42, 2014.
- MARIOSIA, T, N. **Potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea*) inoculadas com rizobactérias**. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em meio ambiente e recursos hídricos, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2014.
- MARQUES, E. R. et al. Distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. por análise de imagem e citometria de fluxo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2018.
- MOHEDANO, D. P.; MAIZ, F. R.; RODRIGUEZ, J. C. Eficacia del enraizamento por nebulización em variedades de olivo. **Vida Rural**. n. 1, 2010.
- MORALES-SILLERO, A. et al. Olive seed germination and initial seedling vigor as influenced by stratification treatment and the female parente. **American Society for Horticultural Science**, v. 47, n. 12, p. 1672-1678, 2012.
- MOTA BARROSO, J. et al. Evolução tecnológica da olivicultura. In: BOHM, J. **O grande livro da oliveira e do azeite**. Lisboa: Dinalivro, p. 80-167, 1. ed, 2013.
- NAVERO, D. B.; ESCOBAR, R. F.; ROMERO, L. R. **El cultivo del olivo**. Ed. Isabel Hernández Úbeda. 7. ed. 962p. 2017.
- OLIBI. **O Boom das fazendas de oliveira e do consumo de azeite no Brasil**. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.olibi.com.br/blog/o-boom-das-fazendas-de-oliveiras-e-do-consumo-de-azeite-no-brasil/>>. Acesso em: 26 de out. 2016.
- OLIVABRASIL. **Mudas**. Disponível em: <<http://www.olivabrasil.com.br/?conteudo=mudas>>. Acesso em: 22 de jan. 2019.
- OLIVAPEDIA. **Oliveiras no Brasil: Ascolana Tenera**. Brasil, 2018. Disponível em: <<https://olivapedia.com/oliveiras-no-brasil-ascolana-tenera/>>. Acesso em: 28 de nov. 2018.
- \_\_\_\_\_. **Principais oliveiras no Brasil**. Brasil, 2019. Disponível em: <<https://olivapedia.com/principais-oliveiras-no-brasil/>>. Acesso em 08 de jan. 2019.
- OLIVE OIL TIMES. **Olive oil production up more than 25 percent, consumption on edges higher**. Madri, 2018. Disponível em: <<https://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-business/olive-oil-production-up-more-than-25-percent-consumption-edges-higher/64683>>. Acesso em: 24 de out. 2018.

\_\_\_\_\_. **Produção Global de Azeite para Mergulhar no 2018/2019**. Portugal, 2020. Disponível em: <<https://www.oliveoiltimes.com/pt/business/global-olive-oil-production-to-dip-in-2018-19/66039>>. Acesso em: 15 de fev. 2020.

OLIVEIRA, A. F.; ANTUNES, L. E. C.; SCHUCH, M. W. Caracterização morfológica de cultivares de oliveira em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. **Informe Agropecuário**. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, v. 27, n. 231, p. 55-62, 2006.

OLIVEIRA, D. L. **Multiplicação da oliveira através da enxertia, estaquia e ácido indolbutírico**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras. 2007.

OLIVEIRA, A. F. et al. Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluídos em NaOH e álcool. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p.79-85, 2009.

OLIVEIRA, D. L. Paclobutrazol e restrição hídrica na vegetação e florescimento da oliveira (*Olea europaea*). 2010. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2010c.

OLIVEIRA, M. C. et al. Enraizamento de estacas de duas cultivares de oliveira submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 99-103, 2010a.

\_\_\_\_\_. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 337-344, 2010b.

\_\_\_\_\_. Enraizamento de estacas em cultivares de oliveiras promissoras para a Serra da Mantiqueira. **Rev. Ceres**, v. 59, n.1, p. 147-150, 2012.

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**, v. 63, n. 3, p. 335-360, 2016.

RIBEIRO, F. C. **Estaquia e enxertia de garfagem em oliveira**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

RIBEIRO, A. V. A. P. **Simplificação do processo de multiplicação *in vitro* de oliveira “*Olea europaea* L.”**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Escola de Ciências e Tecnologia. Departamento de Fitotecnia. Universidade de Évora. Portugal. 2016.

ROSTAMI, A. A.; SHASAVAR, A. Effects of seed scarification on seed germination and early growth of olive seedlings. **Journal of Biological Science**, v.9, n.8, p.825-828, 2009.

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 Biociência**, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.

SILVA, L. F. O. **Caracterização agroindustrial de cultivares de oliveira com potencial econômico para o sul de Minas Gerais**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SILVA, L. F. O. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. **Bragantia**, v.71, n.4, p.488-492, 2012.

SILVA, V. N. et al. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1158-1169, 2013.

SOTOMAYOR-LÉON, E. M.; CABALLERO, J. M. An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy. **Acta Horticultural**, v. 286, p. 113-116, 1990.

TERAMOTO, J. R. S.; BERTONCINI, E. I.; PANTANO, A. P. Mercado dos produtores da oliveira e desafios brasileiros. **Informações Econômicas**, v. 43, n. 2, p. 24-32, 2013.

TRUJILLO, I. et al. Identification of the worldwide Olive germoplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, p. 141-155, 2014.

ÚBEDA, J. R. **Estudio de la fenología floral del olivo (*Olea europaea* L.) y su relación com las variables ambientales**. 2014. Tese (Doutorado) – Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica/ Universidad de Castilla - La Mancha. Toledo/ES. 2012.

VELOSO, M. M. et al. Olive Tree (*Olea europaea* L.) Diversity in traditional small farms of ficalho, Portugal. **Diversity**, v. 10, n. 5, p. 1-13, 2018.

VENORA, G. et al. Identification of Italian landraces of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an image analysis system. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p. 410-418, 2009.

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

VOYIATS, D. G.; PORLINGIS, I. C. Temperature requirements for the germination of olive seeds (*Olea europaea* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 62, n. 3, p. 405-411, 1987.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGOS**

## ANÁLISE DE IMAGENS E ISSR PARA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

### RESUMO

O plantio da oliveira (*Olea europaea* L.) é recente no Brasil. Um dos entraves encontrados para a disseminação da cultura no país é a adaptação das cultivares às condições climáticas locais. Embora as sementes de oliveira sejam viáveis, geralmente não são utilizadas para propagação devido ao longo período juvenil e pelo elevado grau de dormência. Porém, a utilização de sementes é de grande importância, tanto para produção de porta-enxertos vigorosos quanto para programas de melhoramento para manipulação de novas variedades. Poucos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de estudar e caracterizar sementes de oliveira até o momento e ferramentas como a análise de imagens digitais, de sementes e plântulas, permitem avaliar características morfológicas essenciais tanto para a caracterização quanto para avaliação da qualidade fisiológica. Devido à variabilidade genética e aos poucos trabalhos realizados até o momento para caracterização das cultivares de oliveira, principalmente as desenvolvidas no Brasil, objetivou-se com esse trabalho, caracterizar cultivares de oliveira, por meio de frutos, endocarpos, sementes, plântulas e marcadores moleculares ISSR. Foram utilizados frutos de quatro cultivares de oliveira, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, colhidos na fazenda experimental da Epamig, em Maria da Fé -MG. Os frutos foram avaliados quanto à geometria, em seguida despolidos e os endocarpos e sementes avaliados quanto à geometria, coloração e textura. Os endocarpos foram abertos e as sementes também avaliadas quanto à geometria, coloração e textura. Foram realizadas análises de imagens com equipamento de raios X e Ground-Eye<sup>®</sup>, além das fisiológicas pela emergência de plântulas. As plântulas obtidas foram avaliadas quanto ao comprimento do hipocótilo, radícula e comprimento total. A análise molecular foi feita por meio da análise de DNA, com a utilização de marcador molecular ISSR, identificando diferenças entre a cultivar Arbequina e as demais cultivares. A análise de frutos, endocarpos e sementes permitiu a diferenciação das cultivares em relação ao formato e tamanho dos frutos e endocarpos, e a coloração das sementes. Características que não foram identificadas pela análise dos endocarpos, foram visualizadas na análise morfológica das sementes. Pelos resultados encontrados foi possível caracterizar as cultivares quanto aos aspectos morfológicos e também pela similaridade genética.

**Palavras-chave:** Raios-X. Ground-Eye<sup>®</sup>. Análise molecular.

## ABSTRACT

The planting of olive (*Olea europaea* L.) is recent in Brazil. One of the obstacles found for the dissemination of olive culture in the country is the adaptation of cultivars to local climatic conditions. Even though olive seeds are viable, they are generally not used for propagation due to their long youth period and high degree of dormancy. However, using seeds is highly important, both for the production of vigorous rootstocks and for breeding programs of manipulation of new varieties. So far, few studies have been developed in order to study and characterize olive seeds. Additionally, tools such as the analysis of digital images, of seeds and seedlings, allow the evaluation of essential morphological characteristics both for the characterization and for the assessment of physiological quality. Due to the genetic variability and the low number of studies carried out until now to characterize olive cultivars, especially those developed in Brazil, the objective of this work was to characterize olive cultivars, through fruits, endocarps, seeds, seedlings and ISSR molecular markers. Fruits of four olive cultivars were used, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki and Maria da Fé, harvested at Epamig's experimental farm, in Maria da Fé - MG. The fruits were evaluated for geometry, then pulped and the endocarps and seeds were evaluated for geometry, color and texture. The endocarps were opened and the seeds were also evaluated for geometry, color and texture. Image analyzes were performed using X-ray equipment and the system Ground-Eye®, in addition to physiological analyzes due to seedling emergence. The obtained seedlings were evaluated for the length of the hypocotyl, radicle and total length. Molecular analysis was performed through DNA analysis, using the ISSR molecular marker, identifying differences between the cultivar Arbequina and the other cultivars. The analysis of fruits, endocarps and seeds allowed the differentiation of cultivars in relation to the shape and size of fruits and endocarps, and the color of the seeds. Characteristics that were not identified by the analysis of the endocarps, were visualized in the morphological analysis of the seeds. Based on the results found, it was possible to characterize the cultivars in terms of morphological aspects and also by genetic similarity.

**Keywords:** X-rays. Ground-Eye®. Molecular analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

A olivicultura no Brasil é recente e, um dos entraves encontrados para o cultivo é, justamente, a adaptação das cultivares às condições climáticas brasileiras (COUTINHO et al., 2015), já que a espécie tem como centro de origem a Bacia do Mediterrâneo (COI, 2018a).

Com mais de 2600 cultivares catalogadas pelo mundo (KAYA, 2015), o Brasil conta com aproximadamente 15 que são mais amplamente cultivadas (OLIVAPEDIA, 2019) e, dentre as mais indicadas para as regiões brasileiras destacam-se a Arbequina, Maria da Fé, Arbosana, Grappollo, Koroneiki e Ascolano. Com exceção da Ascolano, todas são destinadas à produção de azeites (OLIVEIRA, 2012; KIST et al., 2018). O percentual médio do teor de óleo extraído dessas cultivares pode variar de 7 kg de azeite por kg de azeitonas a 25 kg de azeite por kg de azeitona (OLIVAPEDIA, 2019). Dessas cultivares citadas, a Maria da Fé e a Ascolano 315 foram desenvolvidas no Brasil pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG (OLIVEIRA, 2012) e ainda não há relatos da caracterização dos endocarpos, sementes e plântulas de ambas.

Inicialmente, a identificação de cultivares era feita por meio de características agronômicas, morfológicas e regiões de cultivo e, por isso, são comuns erros de classificação, assim como sinônimos e homônimos. Dessa forma, a caracterização de cultivares de oliveira tornou-se necessária devido, justamente, à alta variabilidade genética presente na cultura e aos erros de nomenclatura (VELOSO et al., 2018). Métodos como a análise de imagens e a análise molecular auxiliam muito na identificação correta e caracterização das cultivares (GOMES et al., 2012; TRUJILLO et al., 2014).

Embora sejam viáveis, as sementes de oliveira, geralmente, não são utilizadas para propagação, devido ao longo período juvenil de plantas propagadas sexuadamente e ao alto grau de dormência que apresentam. Porém, a utilização de sementes é de grande importância tanto para programas de melhoramento genético, quanto para produção de porta-enxertos, visando à propagação de cultivares de difícil enraizamento, à produção de plantas mais vigorosas e resistência às doenças e pragas (BOHM, 2013).

Poucos trabalhos foram desenvolvidos até hoje com o intuito de estudar e caracterizar as sementes de oliveira, principalmente para cultivares desenvolvidas no Brasil e mais adaptadas às regiões de cultivo no país.

A análise de imagens digitais, de sementes e plântulas, seja por meio da utilização de raios X ou por equipamentos de captação de imagens, é uma ferramenta moderna, que permite avaliar características morfológicas, dimensionais, como área e comprimento e, atributos de

coloração e textura. É possível visualizar estruturas internas, determinar a qualidade física, a ocorrência de ataques de pragas, má formação e a identificação de sementes vazias (LIMA et al., 2018).

Resultados obtidos com outras espécies mostram a eficiência da análise de imagens na caracterização de sementes. Xueguan et al. (2016) utilizaram os raios X para determinação do vigor de sementes de tomate; Borges et al. (2019) também com sementes de tomate, associaram os raios X com germinação e vigor; Abud et al. (2018), utilizaram raios X para avaliar a relação da morfologia interna com o potencial fisiológico de sementes de brócolis; Javorski e Cícero (2017) também utilizaram os raios X para avaliação da morfologia interna de sementes de sorgo; Lima et al. (2018) utilizaram as técnicas de raios X e o equipamento de análise de imagens GroundEye®, para caracterização da qualidade de sementes de paricarana; Andrade et al. (2016) utilizaram o equipamento GroundEye® para adequar a metodologia e avaliar a eficiência do sistema na detecção de sementes esverdeadas em lotes de soja; e, Marques et al. (2019) fizeram a distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. utilizando o mesmo equipamento.

Assim como a análise de imagens, a utilização de marcadores na identificação de cultivares também tem sido amplamente empregada. Os marcadores moleculares são ferramentas que auxiliam na detecção de variações no genoma e auxiliam na identificação correta dos acessos (TRUJILLO et al., 2014; LINOS et al., 2014; KAYA, 2015). Além disso, geram grande quantidade de informações sobre a variabilidade genética do germoplasma utilizado pelo melhorista (GIUSTINA et al., 2017), sendo um complemento à caracterização morfológica das cultivares (VELOSO et al., 2018).

Entre os vários tipos de marcadores moleculares, um dos mais utilizados para detectar a variabilidade genética é o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (SOLANO et al., 2019). Baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os ISSR são uma classe de marcadores baseados na amplificação de regiões entre duas sequências de microssatélites, sem a utilização do sequenciamento do DNA (DUARTE et al., 2018). São recomendados para análise de espécies relacionadas evolutivamente e também para a diferenciação rápida de indivíduos aparentados. Além disso, a utilização desse marcador tem inúmeras vantagens, entre elas, o baixo custo, elevado grau de polimorfismo e a reprodutividade (DOMINGUES et al., 2017).

Em oliveira, o ISSR tem sido amplamente utilizado com o intuito de caracterizar e identificar diferentes cultivares ao redor do mundo. Brake et al. (2014) utilizaram os marcadores ISSR para caracterização de cultivares de oliveira na Jordânia. Os autores relataram que o ISSR foi capaz de distinguir 6 das 13 cultivares avaliadas. Segundo os autores, consiste em uma

poderosa ferramenta que permite a caracterização precisa, o que pode contribuir no processo de seleção de variedades ideais. Kaya (2015) utilizou o ISSR na detecção da variabilidade genética de 40 clones de oliveira na Turquia. O autor relatou que a análise por meio do ISSR apresentou alto nível de variabilidade genética, indicando ser recurso potencial para programas de seleção clonal. Em outro trabalho realizado no Iran, Ghanbari e Estaji (2018), utilizaram o ISSR para determinar a diversidade genética de 29 cultivares de oliveira. Com os resultados encontrados os autores sugeriram que o germoplasma mediterrâneo é estruturado em dois grupos genéticos principais, que correspondem a duas regiões geográficas distintas do Mediterrâneo. Mostrando que a ferramenta é de grande potencial para caracterização e identificação de cultivares de oliveira.

Diante de tantos resultados já obtidos, objetivou-se com este trabalho caracterizar cultivares de oliveira, avaliando endocarpos, sementes e plântulas por meio da análise de imagens e também utilizando o marcador molecular ISSR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, em parceria com o Núcleo Tecnológico Epamig Azeitona e Azeite sediado em Maria da Fé - MG.

O município fica localizado no Sul de Minas Gerais, a 1258 metros de altitude, com temperatura mínima média de 10,1°C e máxima média de 23,3°C, precipitação anual de 1738,6 mm e, clima do tipo Cwb, de acordo com Köppen, também chamado de subtropical de altitude (WIKIPEDIA, 2020).

Os frutos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, foram colhidos manualmente, de forma aleatória e em diferentes alturas e ramos da planta, em março de 2017, no ponto de colheita para azeite, com a cor dos frutos tendendo do verde ao amarelo (Figura 1a), no Banco de Germoplasma da Fazenda Experimental da EPAMIG em Maria da Fé-MG.

### 2.1 Análise morfológica de frutos

Após serem colhidos, os frutos foram encaminhados ao Laboratório Central de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras, onde foram fotografados e pesados. Posteriormente foram avaliados no equipamento de análise de imagens Groundeye®, versão S800, composta por um módulo de captação, que possui uma bandeja de acrílico, uma câmera de alta resolução e, um *software* integrado para avaliação. Os frutos foram avaliados quanto às características de geometria, diferencial entre as cultivares.

### 2.2 Obtenção e análise de endocarpos

Em seguida os frutos foram despulpados manualmente, friccionados contra a malha de uma peneira de arame (55 cm de diâmetro, malha 4), água e detergente. Os endocarpos cheios com as sementes, nessa pesquisa denominados endocarpos para diferenciação das sementes, foram lavados em água corrente e detergente para eliminação completa da polpa (Figura 1), e secos sobre papel à sombra, onde permaneceram por 48 horas até armazenamento em câmara fria a 10 °C ± 2, até a realização dos ensaios.

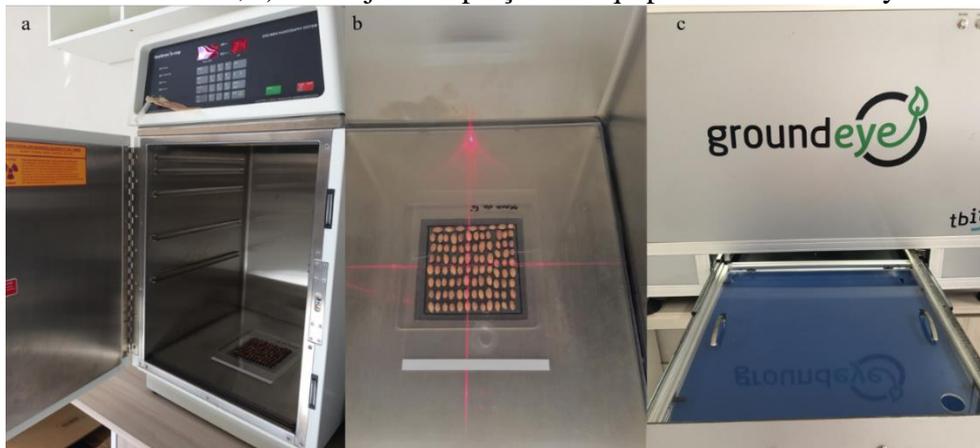
Figura 1 - Lavagem dos endocarpos em água e detergente após a despolpa dos frutos de oliveira (*Olea europaea* L.) com o auxílio de peneira.



Fonte: Do autor (2020).

Os endocarpos foram pesados para determinação do peso de mil endocarpos, adaptado das Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009) e submetidos ao teste de raios X no qual foram dispostos sobre fitas adesivas transparentes de dupla face, aderidas a um filme de poliéster 100/115 microns ultraclear, sendo as radiografias digitais obtidas utilizando o equipamento Faxitron® HP MX-20 digital (Figura 2). Os endocarpos foram analisados também pelo equipamento de análise de imagens Groundeye®.

Figura 2 - a) Equipamento de raios X Faxitron® HP MX-20 digital; b) Visão interna do equipamento de raios X e posicionamento da placa de raios X; c) Bandeja de captação do equipamento GroundEye® S800.



Fonte: Do autor (2020).

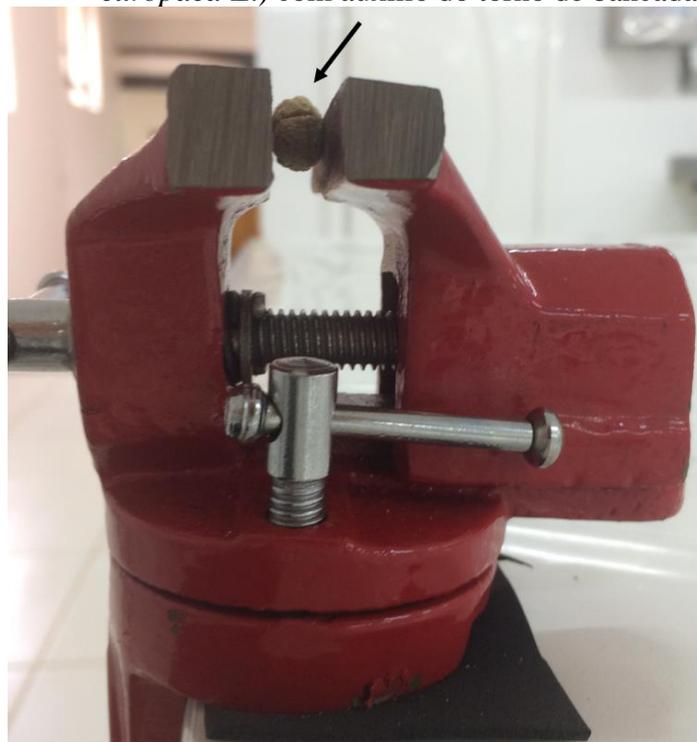
Foi utilizada uma configuração específica de calibração, utilizando o modelo de cor YCbCr, com os padrões de cor luma variando de 0,00 a 1,00, azul variando de 0,01 a 0,17 e vermelho variando de -0,13 a 0,03. Determinou-se o tamanho mínimo igual a 0,0800 cm<sup>3</sup>. Os parâmetros avaliados pelo sistema foram cor, geometria e textura. Para cor avaliou-se dominância de cor, matiz, intensidade, luminosidade, saturação e brilho. Para geometria avaliou-se área, circularidade, esfericidade da forma, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e afinamento. Na textura avaliou-se o fator Haralick para Homogeneidade. Para as avaliações foram utilizados o total de 100 endocarpos, separados em 4 repetições de 25.

### 2.3 Avaliação física e fisiológica das sementes

Para a obtenção das sementes foram selecionados 100 endocarpos cheios, abertos com o auxílio de um torno de bancada 3 polegadas, 75 mm (Figura 3).

As sementes obtidas foram avaliadas pelo teste de raios X e pelo sistema GroundEye®, avaliando os parâmetros de cor, geometria e textura, com a mesma calibração e componentes da avaliação dos endocarpos.

Figura 3 - Abertura de endocarpos de oliveira (*Olea europaea* L.) com auxílio do torno de bancada.



Fonte: Do autor (2020).

A avaliação da emergência das sementes foi efetuada em substrato vermiculita, previamente esterilizado em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 4 horas e umedecido com água destilada até atingir 60% da capacidade de retenção de água.

As bandejas com as sementes foram acondicionadas em BOD a  $10^{\circ}\text{C}$  por 45 dias para estratificação, e avaliadas pelo sistema GroundEye®, com a seguinte configuração, modelo de cor YCbCr, com os padrões de cor luma variando de 0,00 a 1,00, azul variando de 0,01 a 0,14 e vermelho variando de -0,24 a -0,01 e determinou-se o tamanho mínimo igual a  $0,0800\text{ cm}^3$ .

Como foram utilizadas as mesmas sementes para as avaliações de raios X, GroundEye® e semeadura em bandeja, montou-se uma comparação entre as imagens e análises obtidas.

## **2.4 Análise molecular**

A análise molecular foi feita por meio da análise de DNA, com a utilização de marcador molecular ISSR.

Para a extração de DNA foi utilizado aproximadamente 1g de sementes de cada cultivar. As sementes foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) até a obtenção de um pó bem fino, que foi transferido para um eppendorf, no qual acrescentou-se  $800\text{ }\mu\text{L}$  de CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) 2x a  $65^{\circ}\text{C}$ . O eppendorf com o material foi mantido a  $65^{\circ}\text{C}$  em banho maria por 60 minutos, sendo homogeneizado a cada 10 minutos.

Os eppendorfs foram resfriados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida adicionou-se  $800\text{ }\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e com inversões lentas foram homogeneizados por 5 minutos e então centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, no qual foi adicionado isopropanol gelado, na proporção de 1:1 (isopropanol:sobrenadante). Os microtubos foram homogeneizados com inversão lenta e incubados a  $4^{\circ}\text{C}$ , overnight.

As amostras foram novamente centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante descartado. Foi adicionando ao pellet  $50\text{ }\mu\text{L}$  de TE (tampão de extração), mais  $2\text{ }\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/mL), mantendo-o em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos.

Após resfriarem em temperatura ambiente, adicionou-se aos microtubos  $100\text{ }\mu\text{L}$  de etanol 95%, os quais foram homogeneizados com inversões lentas e centrifugados a 14000 rpm

por 10 minutos a 4°C. O etanol foi descartado e adicionou-se etanol 70% e então os microtubos foram incubados a -20°C por 10 minutos.

Em seguida, os microtubos foram centrifugados novamente por 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois de seco, o pellet foi dissolvido em 50 µL de TE (tampão de extração) (Tris-HCl 1M pH 8; EDTA 0,5 M pH8). As soluções contendo os DNA's foram armazenadas em freezer até a realização das reações de amplificação.

As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 2 µL, contendo 0,5 µL de enzima *Taq* DNA polimerase, 2 µL de tampão da enzima 1x, 1 µL de dNTP, 1 µL de iniciador e 1 µL DNA genômico.

O programa consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do Oligo a 49,7–58°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão final por 7 min a 72°C.

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose a 1% com TBE 0,5X (90mM Tris - Borato, 0,5X 1mM EDTA, pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídeo, submetidos à eletroforese e visualizado sob luz UV. A qualidade do DNA foi estimada pela intensidade das bandas.

Foram testadas 24 combinações de primers para cada cultivar. As sequências de bases dos 12 primers se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados na análise molecular por microssatélite ISSR e suas respectivas sequências de bases.

Primers	Sequências de bases
1	ATTTGAACTGGTGACACGAG
2	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
3	ATGTCCCGTTATCGAGGACCT
4	GGTTC AAGTCCCTCTATCCC
5	AGGAACCCTTACCGAGCTC
6	CATTACAAATGCGATGCTCT
7	CGAAATCGGTAGACGGTACG
8	GTGGGGCATTACCCCGCC
9	TAGACATATTTAGTTAATGG
10	CAATATCGTATTCGTCTAGAA
11	TCTACCGATTTGCGCCATATC
12	GGARGTACCAGTSATCATGTT

Fonte: Do autor (2020).

Por meio do pacote estatístico NTSYS-pc versão 2.1 (Sistema de Taxonomia Numérica e Análise Multivariada) (Rohlf, 2000) as similaridades foram obtidas. Assim, o dendrograma

foi gerado pelo método UPGMA a partir do complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard (1908).

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma a partir da estimativa do valor máximo de similaridade, representado pela linha de corte, acima da qual os indivíduos são considerados similares (Hagiwara et al., 2001). O valor máximo de similaridade significativo ( $Sgm$ ) foi estimado pelo Teste de  $t$ , ao nível de 0,01% de probabilidade:

$$Sgm = 1 - \left( t \times \bar{S}Sg_{ij} \right)$$

Onde:

$t$  = valor Tabelado (Tabela de  $t$ -Student) de  $t$  com  $n-2$  graus de liberdade;

$\bar{S}Sg_{ij}$  = erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Para estimar os padrões de similaridade genética com o uso de marcadores moleculares, frequentemente são utilizadas técnicas multivariadas, como as análises de agrupamento e a ordenação de uma representação simplificada dos resultados. Uma dessas análises é a construção de uma matriz de similaridade entre os indivíduos que estão sendo avaliados, obtida a partir de um coeficiente de similaridade específico (Duarte, 1998).

Na avaliação dos géis, a presença (1) e ausência (0) de bandas foram usadas para a construção da matriz binária. As estimativas das similaridades genéticas ( $Sg_{ij}$ ) entre cada par de indivíduos foram efetuadas empregando os coeficientes de Jaccard por meio da expressão:

$$Sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c} \times 100$$

	Indivíduo $i$		
	1	0	
Indivíduo $j$	1	a (1, 1)	b (1, 0)
	0	c (0, 1)	d (0, 0)

Onde:

a = presença de bandas em ambos os indivíduos;

b = presença de banda no primeiro indivíduo e ausência no segundo;

c = presença no segundo e ausência no primeiro;

d = a ausência em ambos os indivíduos.

## **2.5 Análise estatística**

Para análise estatística dos dados obtidos no teste de raios X e as análises realizadas pelo equipamento GroundEye®, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). As análises foram realizadas por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000) e, para a comparação das médias foi utilizado o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao peso total de frutos e endocarpos, peso de 100 frutos, de 100 endocarpos e o número total de frutos e endocarpos se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 - Peso total (PT) de frutos e de endocarpos de 4 cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), peso médio de 100 (P100) frutos e endocarpos, número total de frutos (F), número total de endocarpos (E) e relação fruto/endocarpo (F/E) obtidos de cultivar

Cultivares	Frutos			Endocarpos			F/E
	PT (kg)	P100 (g)	Total F	PT (kg)	P100 (g)	Total E	
Arbequina	12,75	117,58	10847	2,304	21,85	10543	5,38
Ascolano 315	10,48	372,00	2817	1,537	62,16	2472	5,98
Koroneiki	10,48	78,06	13431	1,834	14,81	12384	5,27
Maria da Fé	7,96	87,75	9076	1,491	21,03	7092	4,17

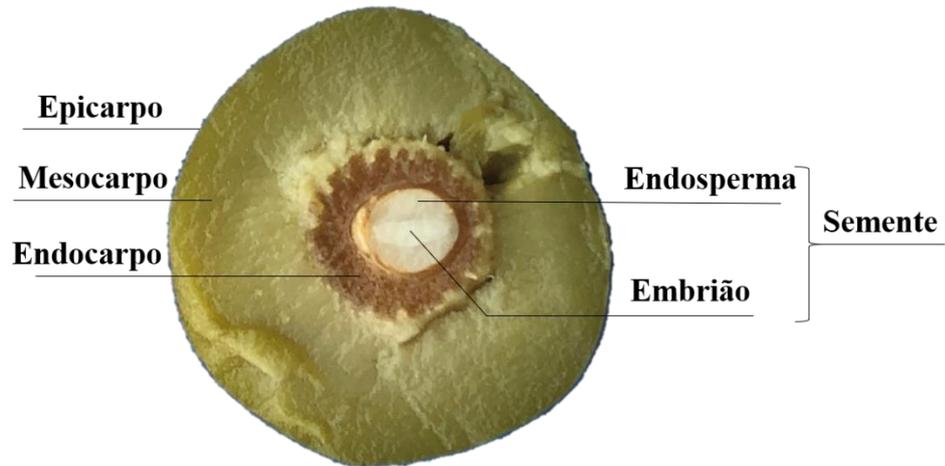
Fonte: Do autor (2020).

A cultivar Ascolano 315 apresentou o maior peso de 100 frutos, característica importante para a cultivar, pois esta, ao contrário das demais, é destinada à mesa.

Dentre as cultivares produtoras de óleo, destacam-se as cultivares Arbequina e Koroneiki, com o rendimento de óleo variando de 17% a 25% respectivamente, as quais apresentam maior rendimento de óleo quando comparadas à cultivar Maria da Fé, que rende cerca de 7% de óleo. Essa característica se torna mais evidente quando se avalia a quantidade de polpa nos frutos dessas cultivares pela relação fruto/endocarpo. A cultivar Maria da Fé apresenta menor relação, o que conseqüentemente leva a um menor rendimento de óleo.

Para melhor entendimento das partes que compõe os frutos da oliveira foi feito um corte transversal (Figura 4) com suas respectivas estruturas identificadas. A estrutura utilizada como propágulo da oliveira, popularmente conhecida como caroço, é o resultado da combinação endocarpo mais semente.

Figura 4 - Corte transversal no fruto de oliveira (*Olea europaea* L.) e suas estruturas.



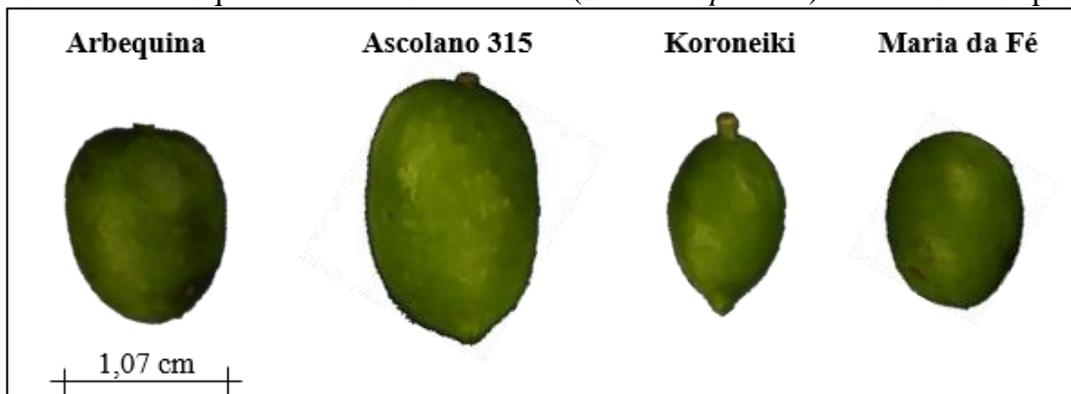
Fonte: Do autor (2020).

A análise morfológica realizada nos frutos, endocarpos e sementes de oliveira por meio do GroundEye® foi feita com o intuito de capturar e identificar diferenças entre as cultivares.

### 3.1 Análise morfológica dos frutos

Na Figura 5 são destacadas as imagens dos frutos das quatro cultivares de oliveira estudadas. Pela análise visual já é possível notar diferenças de formato e tamanho identificadas pelo software.

Figura 5 - Frutos das quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) avaliados nessa pesquisa.



Fonte: Do autor (2020).

Foi possível identificar diferenças significativas entre as cultivares em todos os parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de parâmetros de geometria para frutos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).

Cultivar	A	Área(cm <sup>2</sup> )	C	Ømax(cm)	Ømin(cm)	E	P(cm)	H
Arbequina	0,83 C	1,22 B	0,77 A	1,41 B	1,07 B	15,27 A	4,49 B	0,48 A
Ascolano 315	0,67 A	2,39 A	0,66 B	2,16 A	1,37 A	20,14 B	7,16 A	0,47 A
Koroneiki	0,76 B	0,83 D	0,61 C	1,31 D	0,83 D	16,55 A	3,77 D	0,45 B
Maria da Fé	0,81 C	1,08 C	0,74 A	1,36 C	0,99 C	15,56 A	4,20 C	0,46 B
CV (%)	3,58	4,72	3,21	1,16	3,25	8,55	4,56	1,91

**Nota.** Entende-se como A (Afinamento); C (Circularidade); Ømax (Diâmetro máximo); Ømin (Diâmetro mínimo), E (Esfericidade da forma), P (Perímetro), H (Textura: Haralick: Homogeneidade). Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

O afinamento (A) ou alongamento calcula o fator de afinamento do fruto e varia de 0 a 1. À medida que o valor de afinamento se afasta de 1, o fruto é considerado mais fino (Viana et al., 2016). Para as cultivares avaliadas, a cultivar Ascolano 315 foi a que apresentou maior afinamento, seguida pela cultivar Koroneiki e por último e menos afinadas, as cultivares Arbequina e Maria da Fé.

Para a área, a cultivar Ascolano 315 foi estatisticamente superior, seguida pelas cultivares Arbequina, Maria da Fé e por último Koroneiki. Para os fatores diâmetro máximo (Dmax), diâmetro mínimo (Dmin) e perímetro (P), as cultivares apresentaram o mesmo comportamento que foi observado para a área: a cultivar Ascolano 315 com maiores valores, seguida pelas cultivares Arbequina, Maria da Fé e, por último e inferior, a cultivar Koroneiki.

Circularidade se refere ao fator de forma circular menos sensível ao alongamento do fruto com menor dependência à suavidade do contorno. Os valores também variam de 0 a 1, porém, para esse parâmetro, valores próximos a 1 significam maior circularidade (Ferreira et al., 2018), ou seja, é inversamente proporcional ao afinamento. Das cultivares avaliadas, a Arbequina e Maria da Fé foram as que apresentaram maiores valores para a circularidade seguidas pela cultivar Ascolano 315 e por último, a menos circular, a cultivar Koroneiki.

O fator esfericidade da forma, diz o quão um objeto é circular. Quanto mais o valor se aproxima de  $4\pi$ , mais o objeto se aproxima da forma de uma circunferência. Ou seja, as cultivares que mais se aproximam de uma circunferência foram Arbequina, Maria da Fé e Koroneiki, que foram estatisticamente semelhantes e com valores mais próximos ao referencial, e por último a Ascolano 315, que é a cultivar que menos se aproxima da forma de uma circunferência perfeita.

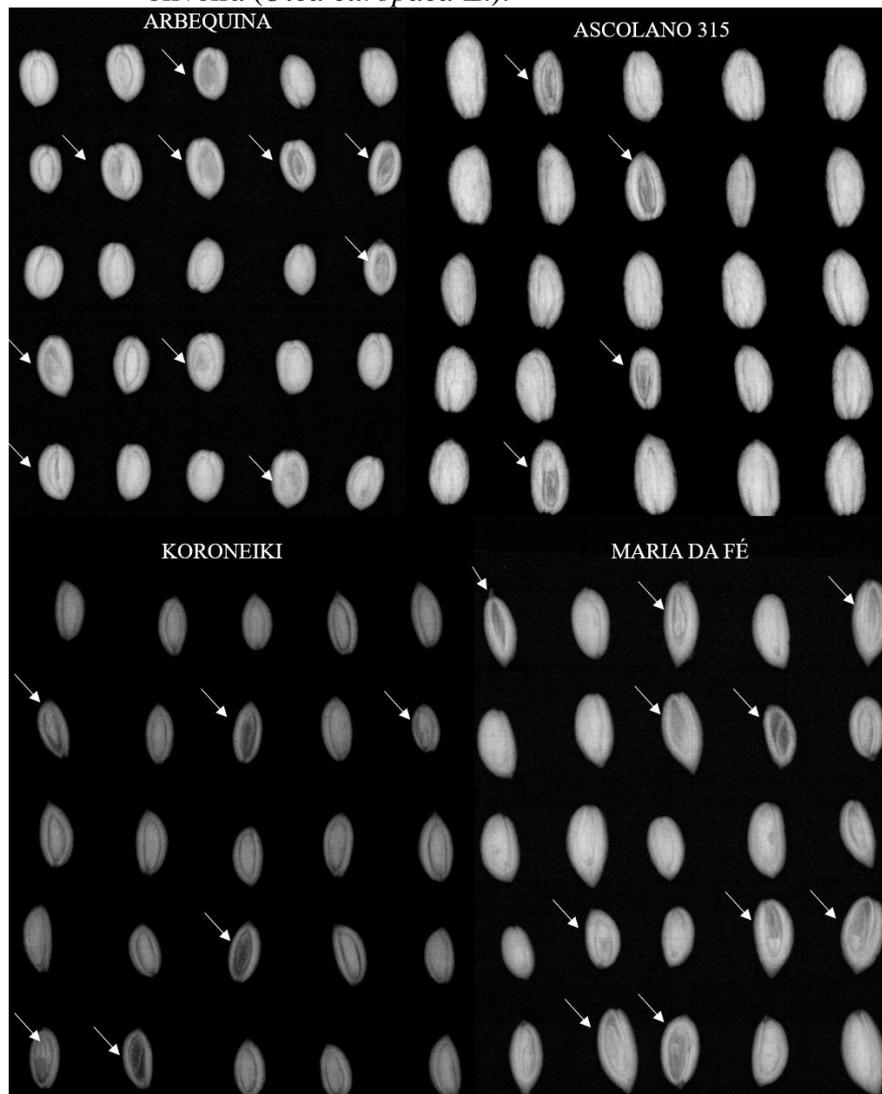
Para textura, foi avaliado o fator Haralick, para homogeneidade, o qual avalia a variação dos tons de cinza de uma superfície, variando de 0 a 1, sendo 1 uma superfície de imagem

completamente homogênea. Esse descritor, classificou as cultivares em dois grupos, Arbequina e Acolano 315 como semelhantes e mais homogêneas em relação à superfície do fruto quando comparadas às cultivares Koroneiki e Maria da Fé, as quais foram semelhantes e mais heterogêneas em relação à aparência da superfície dos frutos.

### 3.2 Análise morfológica dos endocarpos

Na análise dos endocarpos, após a despolpa, o teste de raios X foi significativo para diferenciação das cultivares quanto ao número de endocarpos vazios ou com sementes mal formadas (Figura 6).

Figura 6 - Identificação de endocarpos vazios ou com sementes mal formadas pelo teste de raios X de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).



Fonte: Do autor (2020).

As cultivares Arbequina e Maria da Fé são estatisticamente semelhantes, apresentando maiores números de endocarpos indesejados, sem sementes, seguidas pelas cultivares Koroneiki e, por último, a Ascolano 315, que apresentou menor número de endocarpos com essas características (Tabela 4).

Tabela 4 - Número médio de endocarpos vazios (sem semente) e sementes mal formadas de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) pelo teste de raios X.

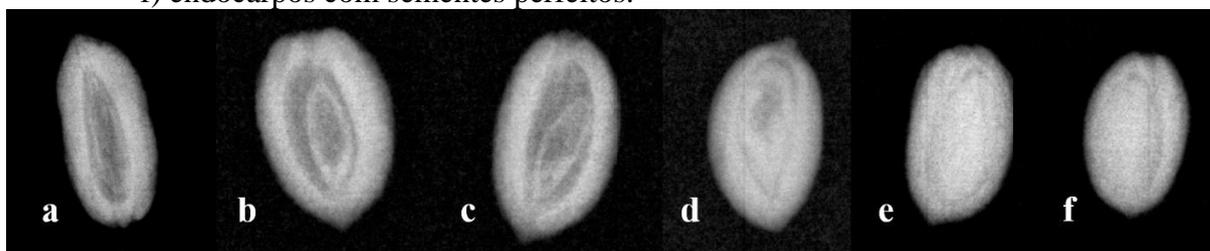
Cultivar	Endocarpos	Sementes
Arbequina	8 A	6 B
Ascolano 315	2 C	10 A
Koroneiki	5 B	3 C
Maria da Fé	8 A	5 B
CV (%)	24,61	20,39

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

Fonte: Do autor (2020).

A hipótese para tentar justificar o maior número de sementes mal formadas da cultivar Ascolano 315 se baseia na espessura dos endocarpos, o que pode dificultar a visualização da semente ainda dentro do endocarpo pelas imagens de raios X, contribuindo para a subestimação do número de endocarpos vazios ou com sementes mal formadas. Na Figura 7 estão os exemplos de endocarpos e sementes encontrados no teste de raios X.

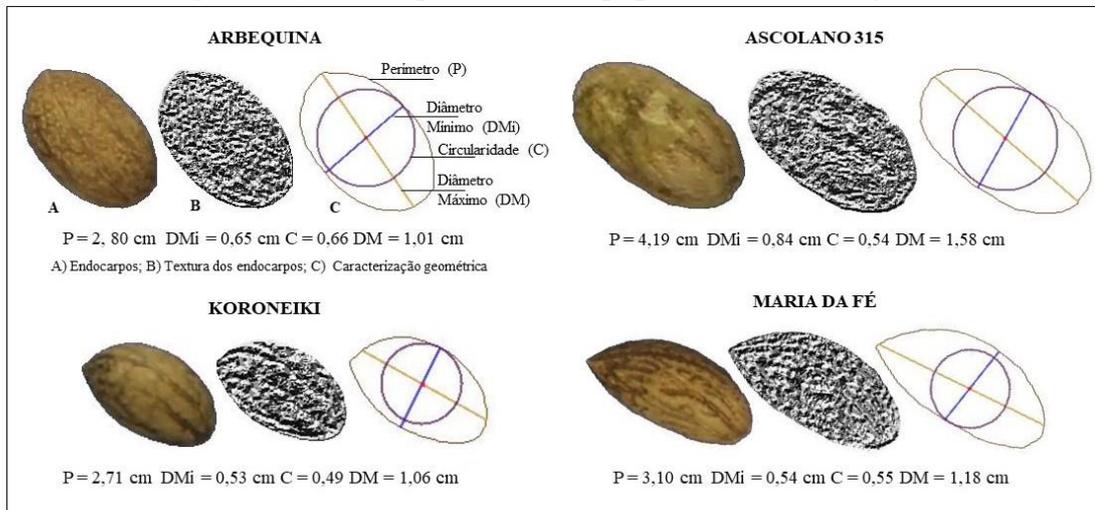
Figura 7 - Exemplos de endocarpos e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.) encontrados nas radiografias obtidas no teste de raios X. a) endocarpo vazio (sem semente); b) e c) endocarpos com sementes mal formadas; d) endocarpo com semente com dano; e) e f) endocarpos com sementes perfeitos.



Fonte: Do autor (2020).

A avaliação dos endocarpos, das quatro cultivares de oliveira, realizada no equipamento Groundeye®, também permitiu a separação das cultivares, quanto aos parâmetros de cor, geometria e textura. Com essa avaliação, foram obtidos dados individuais de cada endocarpo e das repetições (Figura 8 e Tabela 4).

Figura 8 - Dados de perímetro (cm), diâmetro mínimo (cm), diâmetro máximo (cm) e circularidade (cm) de endocarpos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) obtidos por meio do equipamento GroundEye®.



Fonte: Do autor (2020).

Tabela 5 - Valores obtidos por meio do equipamento GroundEye® para os parâmetros de cor e geometria para endocarpos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).

CULTIVAR	PARÂMETROS COR (ENCOARPOS)								
	AMA. (%)	LAR. (%)	PRE. (%)	VERM. (%)	B	I	LUMA	L	M
ARBEQUINA	1,26 C	93,91 A	0,78 B	0,41 B	0,48 A	0,35 A	0,39 A	0,34 A	46,06 B
ASCOLANO 315	3,94 A	92,27 B	1,46 B	0,15 C	0,48 A	0,35 A	0,39 A	0,34 A	46,13 B
KORONEIKI	2,08 B	90,77 C	2,94 A	0,24 C	0,43 B	0,31 B	0,34 B	0,30 B	47,54 A
MARIA DA FÉ	0,68 C	91,75 B	4,00 A	0,65 A	0,44 B	0,32 B	0,34 B	0,31 B	45,42 B
CV (%)	22,8	0,8	33,27	37,61	1,78	1,93	1,92	2,06	0,98
CULTIVAR	PARÂMETROS GEOMETRIA (ENDOCARPOS)								
	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	C	Ø MÍNIMO (cm)	Ø MÁXIMO (cm)	E	P (cm)	A	H	
ARBEQUINA	0,52 C	0,65 A	0,65 B	1,01 D	15,00 A	2,80 C	0,79 B	0,23 B	
ASCOLANO 315	1,07 A	0,54 B	0,84 A	1,58 A	16,49 B	4,19 A	0,73 A	0,22 B	
KORONEIKI	0,44 D	0,49 C	0,53 C	1,06 C	16,85 C	2,71 C	0,70 A	0,24 A	
MARIA DA FÉ	0,60 B	0,55 B	0,64 B	1,18 B	16,19 B	3,36 B	0,73 A	0,25 A	
CV (%)	3,95	2,94	2,34	2,63	1,31	3,48	3,43	3,77	

**Nota.** Entende-se como AMA (amarela), LAR (laranja), PRE (preta); VERM (vermelha), B (brilho), I (intensidade), L (luminosidade), M (matiz), C (circularidade), Ø MÍNIMO (diâmetro mínimo), Ø MÁXIMO (diâmetro máximo), E (esfericidade da forma), P (perímetro), A (afinamento) e H (textura Haralick:Homogeneidade). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Foi possível pela cor a diferenciação significativa dos endocarpos. A cor laranja foi observada com maior predominância e intensidade para todas as cultivares avaliadas. As cores amarela, preta e vermelha também foram representativas e diferenciaram as cultivares, mas em menores quantidades. É importante frisar que o equipamento identificou as diversas cores que compõem os endocarpos e o somatório dessas cores deve ser igual a 100%. Nesse caso, as demais cores identificadas pelo equipamento foram desconsideradas devido aos baixos valores encontrados.

A cor amarela foi maior para a cultivar Ascolano 315. De forma oposta as cultivares Arbequina e Maria da Fé apresentaram menor porcentagem desse tom. Já para a cor preta, as cultivares com maior percentual foram a Koroneiki e Maria da Fé, e a menor expressão nas cultivares Ascolano 315 e Arbequina. Para o tom vermelho a cultivar Maria da Fé apresentou maior porcentagem, e as cultivares Koroneiki e Ascolano 315 menores porcentagens.

A avaliação de cor tem sido amplamente empregada no setor sementeiro como uma ferramenta na identificação de cultivares e também na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. Trabalhos nesse sentido vêm sendo desenvolvidos a fim de fomentar a importância da análise. Ribeiro et al. (2016) utilizaram as cores para avaliar a qualidade de sementes de café. Lima et al. (2018) também utilizaram a análise de imagens envolvendo cor para caracterizar a qualidade de sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth). No entanto, esse parâmetro é pouco utilizado para diferenciação de cultivares.

Outros atributos de cor também foram avaliados como, brilho, intensidade, luma, luminosidade, nos quais as cultivares se diferenciaram de forma semelhante para todas essas variáveis, sendo as cultivares Arbequina e Ascolano 315 estatisticamente semelhantes e superiores às cultivares Maria da Fé e Koroneiki. O brilho é a quantidade de luz emitida pela superfície e está diretamente relacionado com a intensidade da cor. Já a luma é a primeira componente no sistema de cores YCrCb e é responsável pela luminância, que é a quantidade de energia que o observador percebe da fonte de luz (SILVA, 2006). A luminosidade é a intensidade de luz refletida pela superfície, e é influenciada por sombras e reflexos, separa o claro do escuro (SAMPAIO, 2016).

Para a variável matiz, que está associada ao comprimento de onda da cor dominante (ALBANEZ, 2017), a cultivar Koroneiki se destacou perante as outras, sendo estatisticamente superior às demais.

De forma geral, os parâmetros envolvendo cor, foram eficientes na separação das cultivares quando avaliados separadamente. Porém quando avaliados conjuntamente não houve um padrão de repetição, o que não permitiu classificar as quatro cultivares.

A análise de geometria também diferenciou as cultivares em todos os parâmetros avaliados. A área distinguiu todas as cultivares, sendo a Ascolano 315 a que apresentou maior valor, seguida pelas cultivares Maria da Fé e Arbequina e por último a Koroneiki.

Para a circularidade, que apresenta valores entre 0 e 1, como mencionado anteriormente, a cultivar Arbequina foi a que apresentou maior valor e menor circularidade foi observada para a cultivar Koroneiki.

O diâmetro mínimo foi capaz de agrupar as cultivares em três categorias, a cultivar Ascolano 315 foi a que apresentou maiores valores, seguida pelas cultivares Arbequina e Maria da Fé, e com menores valores, a cultivar Koroneiki. De forma semelhante, o diâmetro máximo diferenciou as cultivares, sendo o maior valor atribuído à cultivar Ascolano 315, seguida das cultivares Maria da Fé, Koroneiki e Arbequina.

Para a esfericidade da forma, a cultivar Arbequina foi estatisticamente a mais esférica, seguida pelas cultivares Ascolano 315 e Maria da Fé, que foram estatisticamente semelhantes e, por último a cultivar Koroneiki, menos esférica. Vale ressaltar que a esfericidade da forma avaliou o quão os endocarpos se aproximam da forma de círculo. São classificados como mais esféricos os valores que mais se aproximam de  $4\pi$ .

Assim como a maioria das características de geometria analisadas, o perímetro também classificou as cultivares em três grupos distintos. A cultivar Ascolano 315 foi a que apresentou maior valor para essa variável, seguida pela cultivar Maria da Fé e, por último as cultivares Arbequina e Koroneiki que foram estatisticamente semelhantes.

O afinamento, inversamente proporcional à circularidade, também varia de 0 a 1, porém quanto mais distantes de 1 mais finos são os endocarpos. A cultivar Arbequina apresenta menor afinamento e as cultivares Koroneiki, Maria da Fé e Ascolano 315 maiores afinamentos.

Já a textura, que foi avaliada pelo descritor de textura Haralick, o qual avaliou a homogeneidade da superfície, que é medida pela distribuição dos pixels, também foi eficiente para diferenciar as cultivares, as quais foram divididas em dois grupos, Koroneiki e Maria da Fé estatisticamente semelhantes e com maior homogeneidade da superfície, quando comparadas às cultivares Ascolano 315 e Arbequina que também foram estatisticamente semelhantes com menor homogeneidade da superfície.

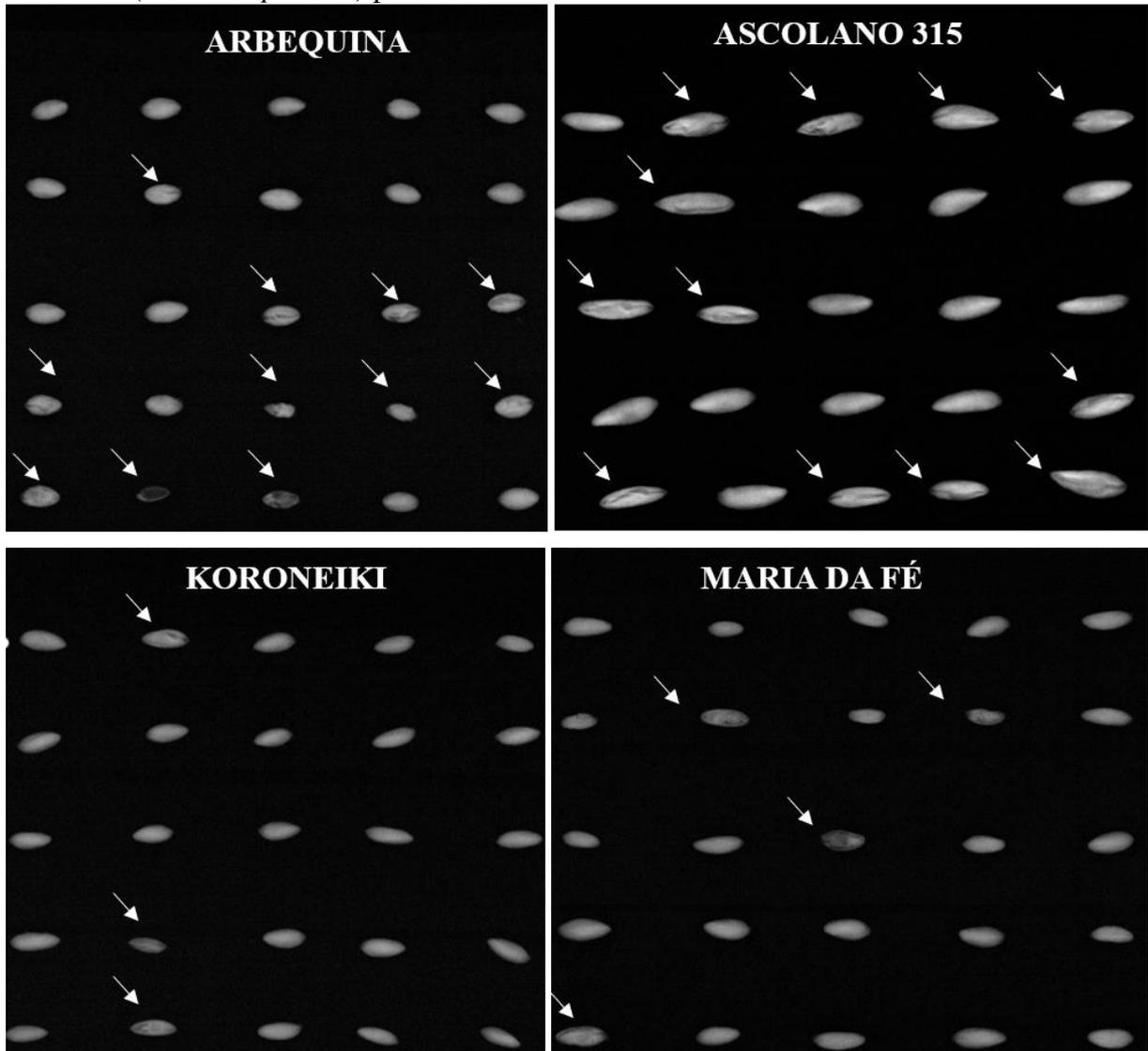
O parâmetro geometria, ao contrário da cor, foi um bom parâmetro para diferenciar os endocarpos das quatro cultivares de oliveira. Dos sete parâmetros avaliados, a cultivar Ascolano 315 foi superior para cinco deles. De forma inversa, a cultivar Koroneiki se destacou como inferior em cinco dos sete parâmetros avaliados, o que pode ser confirmado visualmente pela Figura 8, onde se encontram as imagens dos endocarpos e suas respectivas dimensões.

A análise de parâmetros envolvendo a geometria das sementes também tem grande importância. O conhecimento das propriedades físicas como forma, tamanho, diâmetros, circularidade, esfericidade e textura, podem auxiliar nos processos de tratamento químico e recobrimento de sementes, secagem e dimensionamento de secadores e silos no processo de beneficiamento das sementes e no ajuste de máquinas e implementos agrícolas para o plantio, garantindo um produto com qualidade física, homogêneo e um plantio uniforme, como foi relatado por Schmidt (2019).

### **3.3 Análise morfológica e fisiológica das sementes**

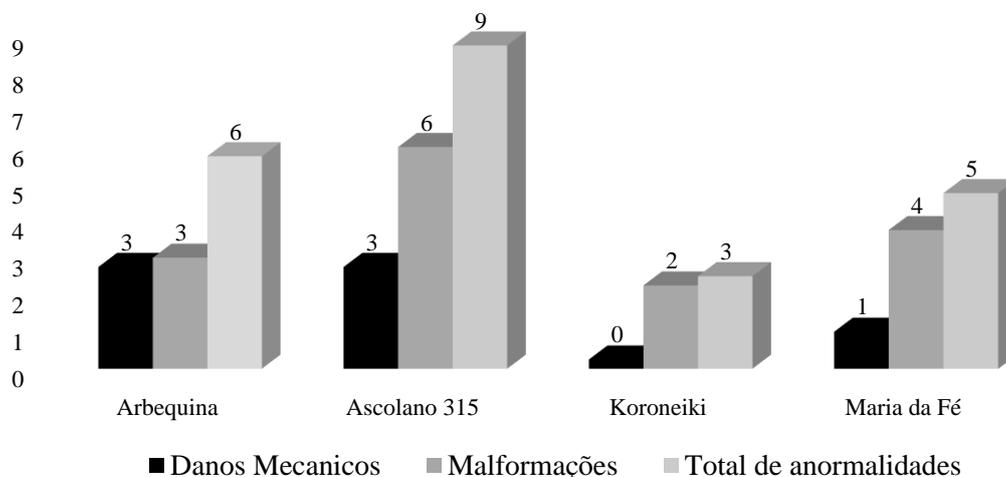
Na avaliação das sementes, pelo teste de raios X, foi possível identificar sementes vazias e com danos no tegumento (Figura 9). Pelas imagens analisadas foi possível verificar maior incidência de danos mecânicos e má formações em sementes da cultivar Ascolano 315, seguida por Arbequina, Maria da Fé e Koroneiki (Gráfico 1). Os danos mecânicos presentes nas sementes, provavelmente se devem ao método utilizado para abertura dos endocarpos, o torno de bancada. Dependendo da força exercida com o torno sobre o endocarpo, as sementes ou quebravam ou tinham seus tegumentos danificados, como já mencionado anteriormente. As sementes de oliveira são macias e frágeis sendo facilmente danificadas, então deve-se ter muita cautela na extração das mesmas.

Figura 9 - Identificação de danos e má formações em sementes de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) pelo teste de raios X.



Fonte: Do autor (2020).

Gráfico 1 - Número de danificações mecânicas e má formações em sementes de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) identificadas pelo teste de raios X.



Fonte: Do autor (2020).

No GroundEye® as avaliações dos parâmetros de cor também mostraram algumas diferenças entre as sementes das quatro cultivares de oliveira (Tabela 5).

Na análise de composição de cores, notou-se grande dominância apenas das cores laranja e preta. A cor laranja predominou em maior porcentagem na cultivar Koroneiki, seguida pela cultivar Arbequina, em seguida Ascolano 315 e por último a Maria da Fé. A cor preta foi predominante em maior quantidade na cultivar Maria da Fé, seguida pela cultivar Ascolano 315, depois Arbequina e por último Koroneiki. As outras cores identificadas pelo equipamento apresentaram valores insignificantes e por isso foram desconsideradas, mas vale lembrar que o somatório de todas as cores deve ser igual a 100%, como já mencionado anteriormente.

O brilho, a intensidade, a luma e a luminosidade classificaram, estatisticamente, as quatro cultivares da mesma maneira. A cultivar Koroneiki foi a que apresentou maiores valores para todos esses componentes, seguida pela cultivar Arbequina, depois a cultivar Ascolano 315 e por último a cultivar Maria da Fé. A matiz foi o parâmetro que menos diferenciou as cultivares. A cultivar Maria da Fé foi a que se destacou e apresentou maior valor.

Ao contrário do que foi apresentado para os endocarpos, o parâmetro cor para as sementes, foi um bom classificador e diferenciador das cultivares. Na análise conjunta dos parâmetros observou-se um comportamento semelhante para cinco dos sete componentes avaliados, porcentagem da cor laranja, brilho, intensidade, luma e luminosidade. A cultivar Koroneiki foi estatisticamente superior às demais cultivares e a cultivar Maria da Fé foi estatisticamente inferior às demais.

Tabela 6 - Valores obtidos por meio do equipamento GroundEye® para os parâmetros de cor e geometria para sementes de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).

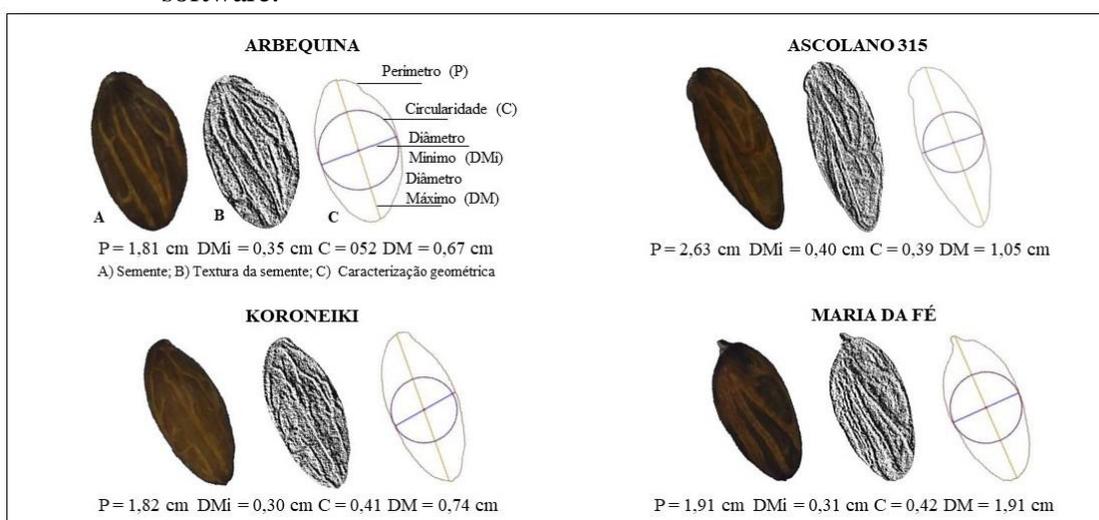
CULTIVAR	PARÂMETROS COR (SEMENTES)							
	LAR. (%)	PRE. (%)	B	I	LUMA	L	M	
ARBEQUINA	34,12 B	65,85 C	0,23 B	0,16 B	0,17 B	0,17 B	36,17 B	
ASCOLANO 315	26,73 C	73,24 B	0,21 C	0,15 C	0,16 C	0,15 C	39,61 B	
KORONEIKI	58,43 A	41,49 D	0,26 A	0,18 A	0,19 A	0,18 A	35,80 B	
MARIA DA FÉ	12,12 D	87,87 A	0,18 D	0,14 D	0,14 D	0,14 D	61,48 A	
CV (%)	9,81	4,18	3,10	3,35	3,22	2,36	7,39	
CULTIVAR	PARÂMETROS GEOMETRIA (SEMENTES)							
	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	CIRC.	Ø MÍNIMO (cm)	Ø MÁXIMO (cm)	E	P (cm)	A	H
ARBEQUINA	0,18 B	0,52 A	0,35 B	0,67 C	17,91 A	1,81 C	0,71 D	0,43 B
ASCOLANO 315	0,33 A	0,39 C	0,40 A	1,04 A	21,94 C	2,65 A	0,59 B	0,47 A
KORONEIKI	0,17 B	0,41 B	0,30 C	0,73 B	19,07 B	1,81 C	0,66 C	0,42 B
MARIA DA FÉ	0,18 B	0,43 B	0,30 C	0,73 B	24,10 D	1,97 B	0,56 A	0,46 A
CV (%)	5,23	2,14	1,94	2,75	3,27	3,27	2,27	2,38

**Nota.** Entende-se como LAR (laranja), PRE (preta);, B (brilho), I (intensidade), L (luminosidade), M (matiz), CIRC (circularidade), Ø MÍNIMO (diâmetro mínimo), Ø MÁXIMO (diâmetro máximo), E (esfericidade), P (perímetro), A (afinamento) e H (textura: Fator Haralick: Homogeneidade). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Os parâmetros de geometria também foram avaliados nas sementes das quatro cultivares (Tabela 5) e, por meio deles, também foi possível diferenciar as cultivares, obtendo dados individuais de cada semente e das repetições (Figura 10).

Figura 10 - Dados de perímetro (cm), diâmetro mínimo (cm), diâmetro máximo (cm) e circularidade (cm) de endocarpos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) obtidos por meio do equipamento GroundEye®. A) semente; B) textura da superfície da semente; C) parâmetros avaliados pelo software.



Fonte: Do autor (2020).

Para a área, a cultivar Ascolano 315 se destacou com o maior valor, e foi estatisticamente superior às outras três cultivares, Arbequina, Koroneiki e Maria da Fé, que foram estatisticamente semelhantes.

A circularidade foi superior para a cultivar Arbequina, seguida pelas cultivares Koroneiki e Maria da Fé, que foram estatisticamente semelhantes, e por último a Ascolano 315. Para esse fator, os valores variam de 0 a 1, e para as cultivares avaliadas, o valor máximo obtido foi de 0,52, mostrando que sementes dessas cultivares não apresentam formato circular, o que pode ser visualizado claramente na Figura 10. Isso fica ainda mais evidente quando analisamos a variável esfericidade da forma, na qual a cultivar que apresentou sementes mais próximas de um círculo foi a Arbequina, seguida por Koroneiki, Ascolano 315 e por último Maria da fé, com valores variando de 17,91 a 24,10, bem distantes de um círculo perfeito que é evidenciado quando os valores se aproximam  $4\pi$ .

A cultivar Ascolano 315 também apresentou maiores valores para os fatores diâmetro mínimo, diâmetro máximo e perímetro, sendo estatisticamente superior às demais cultivares. Para diâmetro mínimo, os menores valores encontrados foram para as cultivares Maria da Fé e

Korokeiki, estatisticamente semelhantes. Já para variável diâmetro máximo, a cultivar Arbequina foi a que apresentou menor valor, e para o perímetro foram as cultivares Arbequina e Koroneiki, estatisticamente semelhantes.

O afinamento, que é inversamente proporcional à circularidade, foi estatisticamente superior para a cultivar Maria da Fé, ou seja, essa cultivar é a que mais se distancia da forma de um círculo, seguida pela cultivar Ascolano 315, Koroneiki e por último, e a mais circular das sementes, a cultivar Arbequina.

O último atributo avaliado foi a textura, determinada pelo descritor de textura Haralick para homogeneidade da superfície. A textura foi capaz de separar as cultivares em dois grupos, Ascolano 315 e Maria da Fé, estatisticamente semelhantes e superiores as outras duas cultivares avaliada, Arbequina e Koroneiki.

Para as características de geometria, área, diâmetro mínimo e máximo e perímetro, a cultivar Ascolano 315 se mostrou superior às demais cultivares, o que já era esperado para a cultivar já que também apresentou maior peso de frutos e maior endocarpo.

Como já mencionado anteriormente, a cultivar Ascolano 315 é destinada ao consumo de mesa e a preferência do consumidor é sempre por frutos maiores (CAPPATO et al., 2015).

Sabe-se que a determinação das características físicas de produtos agrícolas é de extrema relevância e que informações sobre área e forma, como circularidade e esfericidade, são utilizadas para determinar tamanho de transportadores, esteiras, elevadores e outros equipamentos de processamento pós-colheita (GOMES et al., 2018).

É interessante que para a diferenciação das cultivares, nem todos os parâmetros avaliados foram eficientes. Para os frutos e endocarpos não houve um padrão de diferenciação, não sendo suficientes para classificar as cultivares. Já com a análise das sementes foi possível captar diferenças de cor e geometria não detectadas nos frutos e endocarpos.

A Tabela 6 apresenta os resultados da avaliação fisiológica das sementes das quatro cultivares. Avaliou-se a emergência de plântulas e também outras variáveis analisadas pelo equipamento GroundEye®, como tamanho do hipocótilo (H), razão raiz primária/hipocótilo (RP/H), tamanho da raiz primária (RP) e tamanho total da plântula (PLÂNTULA).

Tabela 7 - Emergência (E) de sementes de oliveira (*Olea europaea*) após semeadura em bandeja, tamanho do hipocótilo (cm), razão raiz primária/hipocótilo (RP/H) (cm), raiz primária (RP) cm e comprimento de plântula (cm) de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).

CULTIVAR	E	H (cm)	RP/H (cm)	RP (cm)	PLÂNTULA (cm)
Arbequina	14 A	5,78	0,77 B	4,31 B	10,10
Ascolano 315	14 A	6,04	0,84 B	4,67 B	11,00
Koroneiki	13 A	5,69	1,25 A	6,71 A	12,40
Maria da Fé	7 B	5,51	1,12 A	6,03 A	11,38
CV (%)	18,77	13,74	22,58	19,14	11,76

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

Fonte: Do autor (2020).

Não houve diferença significativa entre as cultivares tanto para tamanho do hipocótilo quanto para comprimento de plântula. Para os outros fatores avaliados houve diferença significativa.

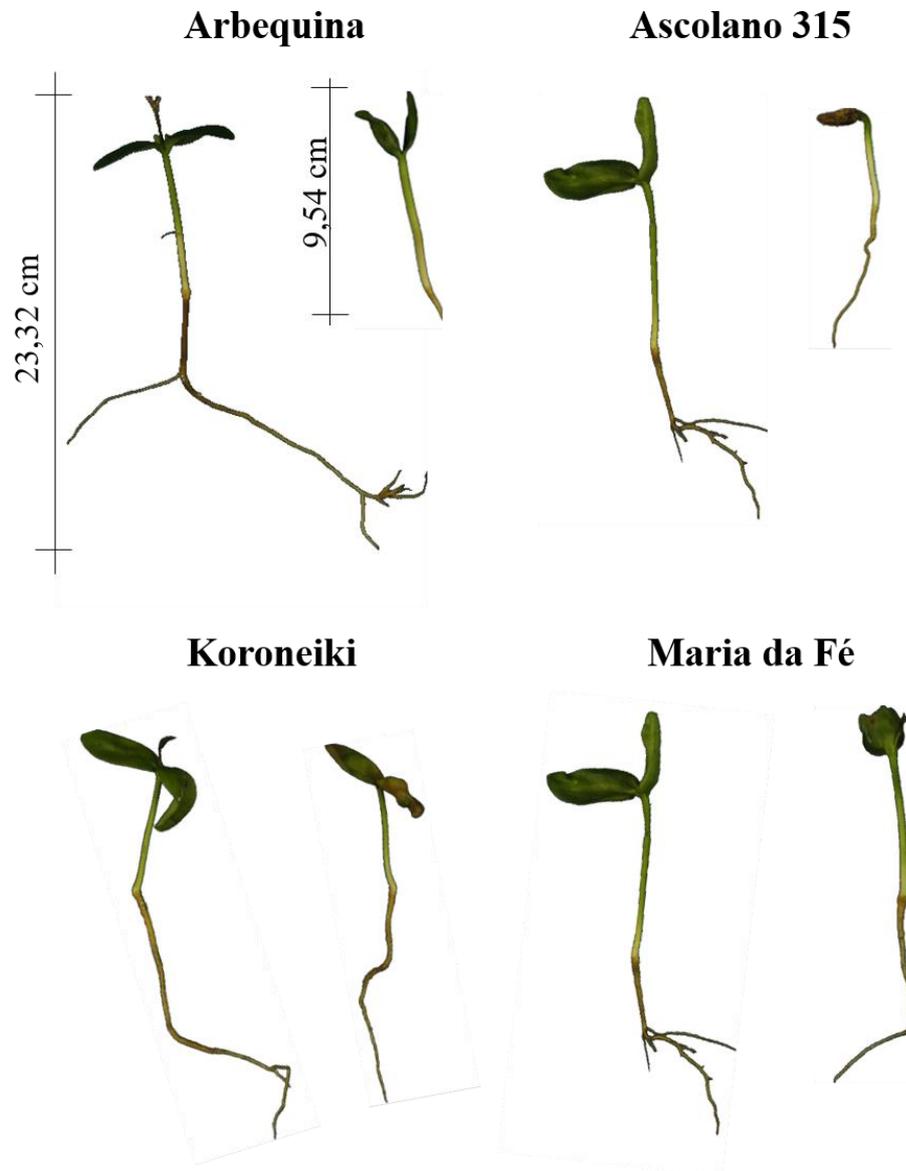
Para a emergência de plântulas, as cultivares Arbequina, Ascolano 315 e Koroneiki foram semelhantes e estatisticamente superiores à cultivar Maria da Fé. Esse resultado sugere que sementes da cultivar Maria da Fé apresentam qualidade fisiológica inferior às demais cultivares.

Para as variáveis RP/H e RP, as cultivares apresentaram comportamento semelhante, Arbequina e Ascolano 315 foram estatisticamente semelhantes e inferiores às cultivares Koroneiki e Maria da Fé que apresentaram maiores valores e também foram estatisticamente semelhantes, ou seja, as cultivares Koroneiki e Maria da Fé apresentaram maiores comprimentos de raiz primária e menores comprimentos de hipocótilo, embora o tamanho do hipocótilo não tenha sido significativo.

A cultivar Ascolano 315, não tem resultados de emergência de sementes publicados, mas obteve bons resultados, assim como as cultivares Arbequina e Koroneiki.

Na Figura 11 se encontram as imagens das plântulas das quatro cultivares de oliveira estudadas, Arbequina, Ascolano 315, Maria da Fé e Koroneiki capturadas e avaliadas pelo GroundEye®.

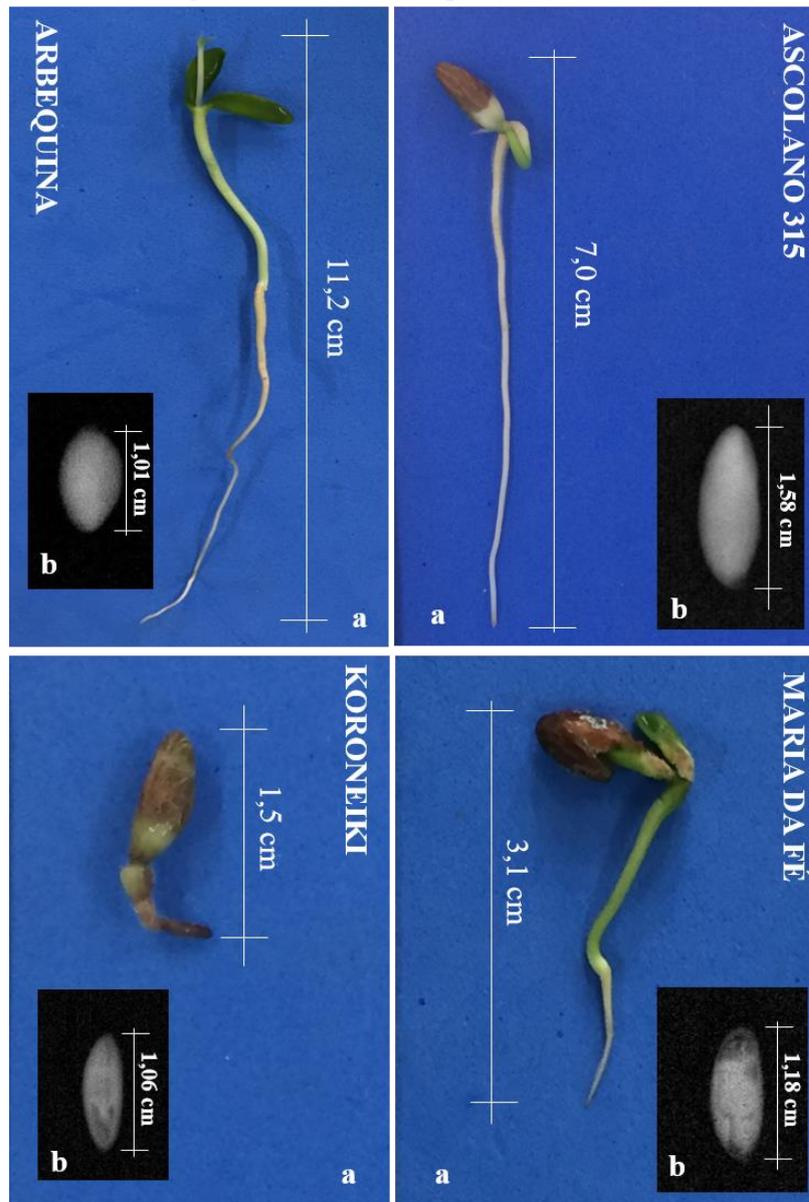
Figura 11 - Plântulas de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L) capturadas pelo equipamento GroundEye®.



Fonte: Do autor (2020).

Como as sementes foram enumeradas e as plântulas oriundas dessas sementes foram fotografadas e analisadas, foi possível comparar as plântulas e imagens radiográficas. Na Figura 12 estão exemplos de sementes encontradas no teste de raios X e suas respectivas plântulas.

Figura 12 - Plântulas (A) de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) e radiografias (B) das sementes que originaram as mesmas plântulas.

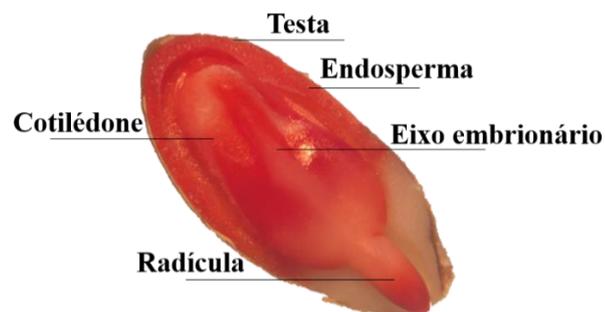


Fonte: Do autor (2020).

Por meio da Figura 12, é possível notar como as más formações e os danos no tegumento podem afetar a formação de plântulas normais, isso fica evidente quando analisamos as plântulas formadas para as cultivares Koroneiki e Maria da Fé. Na cultivar Koroneiki, a semente apresentava má formação na região da radícula, originando uma plântula anormal, com engrossamento da raiz primária. Já para a cultivar Maria da Fé, a semente apresentava danos no tegumento, atingindo o embrião na região da plúmula, originando uma plântula anormal, com lesão nas folhas cotiledonares.

As sementes de oliveira apresentam um embrião grande, que ocupa quase todo o volume da semente (Navero et al., 2017), que possui o formato reto e espatulado, com estrutura típica de cotilédones e radícula (ZAFRA et al., 2018) (Figura 13).

Figura 13 - Representação dos tecidos de uma semente de oliveira (*Olea europaea* L.) submetida ao teste de tetrazólio, em corte longitudinal.



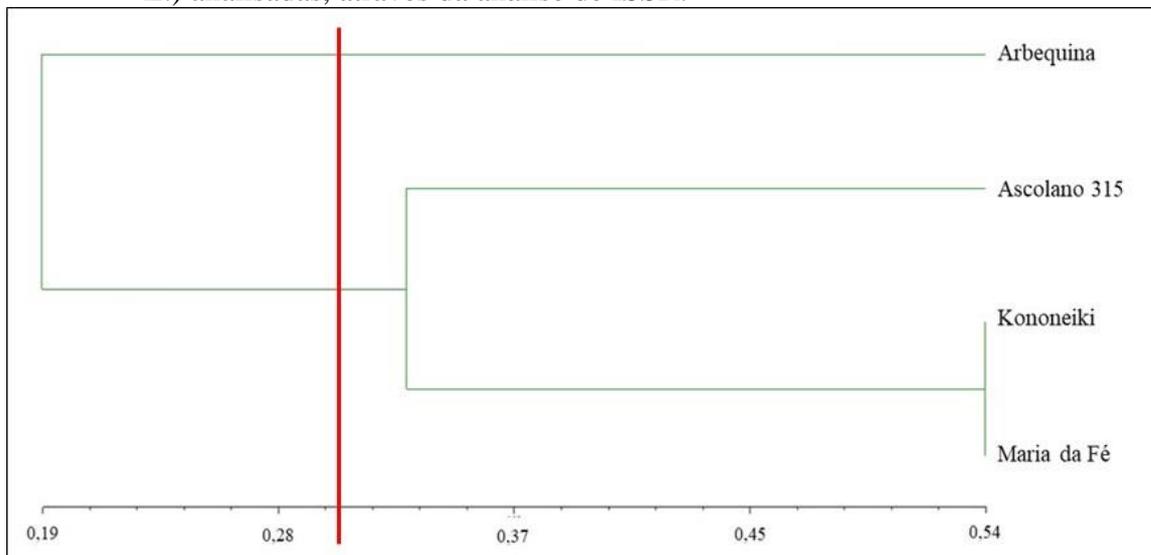
Fonte: Do autor (2020).

Essa estrutura facilita a ocorrência de danos, tanto no tegumento quanto no embrião, principalmente ao remover os endocarpos com o auxílio do torno de bancada. A semente é muito frágil e macia, sendo facilmente danificada. Por isso, estudos envolvendo a superação dessa barreira física são de grande importância para obtenção de sementes de qualidade e consequentemente produção de mudas mais vigorosas e porta-enxertos mais vigorosos.

### 3.4 Análise genética

Na avaliação genética, representada na Figura 14, foi possível identificar que a cultivar Arbequina é geneticamente diferente das demais cultivares. Já a cultivar Ascoloano 315 apresenta cerca de 25% de similaridade com as cultivares Koroneiki e Maria da Fé, sendo as duas últimas, as cultivares de maior semelhança genética, com cerca de 54% de similaridade genética.

Figura 14 - Dendrograma, com a linha de corte ao nível do Sgm representada (31%), obtido com base na similaridade genética entre 4 cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) analisadas, através da análise de ISSR.



Fonte: Do autor (2020).

A cultivar Arbequina que tem origem espanhola, é considerada autopolinizante, diferentemente das outras três cultivares (Olivapedia, 2019). Isso pode explicar a diferença encontrada no material genético dessa cultivar com relação às demais, que dependem da polinização cruzada.

Já a cultivar Ascolano 315, de origem brasileira, necessita de cultivares polinizadoras no pomar (Coutinho et al., 2015). Não há informações na literatura sobre a polinização dessa cultivar, mas de acordo com o Olivapedia (2020), a cultivar Ascolano pode ser polinizada por várias cultivares, incluindo as cultivares Arbequina e Frantoio, presentes na região de cultivo.

Embora a cultivar Koroneiki produza grande quantidade de pólen, é também indicado a utilização de cultivares polinizadoras compatíveis e que tenham o mesmo período de florescimento (OLIVAPEDIA, 2019). As cultivares mais indicadas são Arbequina, Galega e Arbosana (COUTINHO et al., 2015). Já a cultivar Maria da Fé, outra cultivar brasileira, é oriunda da manipulação genética da cultivar Galega, mas de acordo com Do Val (2011), não há distinção genética entre as cultivares Maria da Fé e Galega. A cultivar Galega necessita de cultivares polinizadoras no pomar, sendo indicado o plantio de cultivares compatíveis, como a cultivar Arbequina (COUTINHO et al., 2015).

O fato da cultivar Koroneiki ser polinizada pela cultivar Galega e da cultivar Maria da Fé ter origem genética também da cultivar Galega, pode ser uma explicação para a similaridade genética entre essas cultivares, de aproximadamente 54%, encontrada nessa pesquisa.

Pelo dendrograma também é possível visualizar uma baixa similaridade genética entre a cultivar Arbequina e as demais. Isso pode ser explicado pelo fato da cultivar Arbequina ser polinizadora das outras três cultivares estudadas, mas as cultivares Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé não polinizam a cultivar Arbequina.

Esses resultados nos mostram a eficiência do marcador molecular ISSR na identificação da similaridade genética entre cultivares de oliveira, corroborando com os resultados encontrados por Ghanbari e Estaji (2018), trabalho no qual os autores determinaram a diversidade genética de 29 cultivares de oliveira.

#### 4 CONCLUSÕES

A diferenciação das cultivares analisadas pode ser realizada, no caso dos endocarpos, pela geometria em relação à área, circularidade, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, esfericidade da forma e afinamento, e também pela textura mais irregular das cultivares Arbequina e Ascolano 315.

As sementes são caracterizadas pela intensidade da coloração laranja, brilho, intensidade, luma e luminosidade, sendo que a cultivar Koroneiki apresenta maiores valores, seguida pela Arbequina, Ascolano 315 e Maria da Fé.

É possível identificar o grau de similaridade genética entre as cultivares de oliveira com o uso de ISRR, sendo as cultivares Koroneiki e Maria da Fé as que apresentam maior similaridade genética.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; CICERO, S. M.; JUNIOR, F. G. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum**, v. 40, e34950, 2018.
- ALBANEZ, D. O. **Redes neurais artificiais aplicadas à segmentação de imagens**. 2017. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. Programa de pós-graduação em modelagem e otimização. Catalão/GO. 2017.
- ANDRADE, D. B. et al. Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 2, p. 26462-26465, 2016.
- BOHM, J. **O grande livro da oliveira e do azeite**. Lisboa: Dinalivros, 1. ed., 2013.
- BORGES, S. R. S. et al. Tomato seed image analysis during the maturation. **Journal of seed Science**, v. 42, n. 1, p. 22-31, 2019.
- BRAKE, M. et al. Characterization of Jordanian olive cultivars (*Olea europaea* L.) using RAPD and ISSR molecular markers. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 282-289, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.
- BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Teoria: Processamento de imagens**. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/spring/teoria/rgbihs/rgbihs.htm>. Acesso em: 27 de março de 2019.
- CAPPATO, L. P.; FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL, A. Azeitonas de mesa no Brasil: mercado, tecnologia e aspectos legais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, 2015.
- CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **The Olive Tree**, Madri, 2018. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>. Acesso em: 15 de out. 2018a.
- COUTINHO, E. F. et al. **Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. Brasília/DF: Embrapa, 2015, 181p.
- DOMINGUES, S. D. et al. Seleção de *primers* para análise de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia e Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.
- DO VAL, A. D. B. **Caraterização genética de oliveira utilizando marcadores moleculares**. 2011. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Agronomia / Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2011.
- DUARTE, A. B. et al. Genetic diversity between and within full-sib families of *Jatropha* using ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 899-905, 2018.

ESTADO DE MINAS. Olivicultura comemora primeira década de produção no Brasil. Disponível em: <[https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2018/04/23/interna\\_agropecuaria,953512/muita-fe-na-azeitona-de-minas.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2018/04/23/interna_agropecuaria,953512/muita-fe-na-azeitona-de-minas.shtml)>. Acesso em: 14 de fev. 2019.

FERREIRA, A. F. N. et al. Seleção de descritores de sementes de maracujazeiro azedo utilizando fenotipagem digital. **Agrarian Academy**, v. 5, n. 10, p. 181-190, 2018.

GHANBARI, A.; ESTAJI, A. ISSR analysis for determination of genetic diversity in 29 olive (*Olea europae* L.) cultivars. **Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 7, n. 1, 2018.

GIUSTINA, L. D. et al. Variabilidade genética em genótipos de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) baseada em marcadores moleculares ISSR e caracteres morfológicos. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1311-1324, 2017.

GLOBO RURAL. **Azeites brasileiros são premiados na Itália**. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2018/06/azeites-brasileiros-sao-premiados-na-italia.html>>. Acesso em: 25 de fev. 2019.

GOMES, F. H. F. et al. Tamanho e forma de grãos de feijão-caupi em função de diferentes teores de água. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 5, p. 407-416, 2018.

GOMES, S.; MARTINS-LOPES, P.; GUEDES-PINTO, H. Olive tree genetic resources characterization through molecular markers. **Genetic Diversity in Plants**, p. 15-28, 2012.

JAVORSKI, M., CICERO, S. M. Utilização de raios x na avaliação da morfologia interna de sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 16, n. 2, p. 310-318, 2017.

KAYA, E. ISSR analysis for determination of genetic diversity and relationship in eight Turkish Olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 1, p. 96-99, 2015.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; OLIVEIRA, C. **Anuário Brasileiro das Oliveiras 2018**. Editora Gazeta Santa Cruz, 64p., 2018.

LIMA, J. M. E. et al. Técnicas de análise de imagens para caracterização da qualidade de sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1202-1216, 2018.

LINOS, A. et al. Genetic structure of the Greek olive germoplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 175, p. 33-42, 2014.

MARQUES, E. R. et al. Distinção de espécies e estádios de maturação de sementes de *Comanthera* spp. por análise de imagem e citometria de fluxo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2019.

NAVERO, D. B.; ESCOBAR, R. F.; ROMERO, L. R. **El cultivo del olivo**. Hernández Úbeda: Ed. Isabel, 7. ed. 962p. 2017.

OLIVAPEDIA. **Principais oliveiras no Brasil**. Brasil, 2019. Disponível em: < <https://olivapedia.com/principais-oliveiras-no-brasil/>>. Acesso em 08 de jan. 2019.

OLIVEIRA, A. F. **Oliveira no Brasil: Tecnologias de produção**. Ed. EPAMIG. 772p. 2012

OLIVEIRA, A. F. et al. Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 4, p. 317-322, 2010.

RIBEIRO, B. G. et al. Image analysis of coffee seeds submitted to the Lercafe test. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 3, 2016.

RIBEIRO, T. P. **Caracterização de texturas com o auxílio de redes complexas, projeções topológicas e padrões semânticos**. 2019. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciência da computação. Uberlândia. 2019.

SAMPAIO, D. A. **Caracterização anatômica e físico-química do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais. Seropédica/RJ. 2016.

SILVA, R. H. P. **Algoritmo para extração de imagens de fundos não-homogêneos usando o espaço de cores YCbCr**. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Engenharia e Informática. Campina Grande/Paraíba. 2006.

SILVA, V. N. et al. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1158-1169, 2013.

SHMIDT, F. Physical seed grading quality and field plantability of vaeriety corn lots. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 8591-8602, 2019.

SOLANO, M. C. P. et al. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assesment of somaclonal variants at diferente subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 2, p. 561-567, 2019.

TRUJILLO, I. et al. Identification of the worldwide Olive germoplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, p. 141-155, 2014.

VELOSO, M. M. et al. Olive Tree (*Olea europaea* L.) Diversity in traditional small farms of ficalho, Portugal. **Diversity**, v. 10, n. 5, 2018.

VIANA, J. H. M.; CLEMENTE, E. P.; OLIVEIRA, A. P. Procedimento operacional padronizado para quantificação e mensuração de areias via análise de imagens. **Comunicado Técnico 73**. Rio de Janeiro, 2016.

WIKIPÉDIA, **Maria da Fé**. Disponível em: < [https://pt.wikipedia.org/wiki/Maria\\_da\\_F%C3%A9](https://pt.wikipedia.org/wiki/Maria_da_F%C3%A9)>. Acesso em: 11 de fev. 2020.

XUEGUAN, Z. et al. Research on tomato seed vigor based on x-ray digital image. **Optoelectronic Imaging and Multimedia Technology IV**, v. 10020, 2016.

ZAFRA, A. et al. Histological Features of the Olive Seed and Presence of tS-Type seed Storage Proteins as Hallmarks of the Olive Fruit Development. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1481, 2018.

## ESTRATIFICAÇÃO E ESCARIFICAÇÃO PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

### RESUMO

A utilização de sementes de oliveira (*Olea europaea* L.) é importante para programa de melhoramento genético e para produção de porta-enxertos no caso de cultivares de difícil enraizamento. Há evidências de que as sementes dessa espécie exibam não apenas a dormência mecânica imposta pelo endocarpo, mas também a dormência embrionária, resultante da imaturidade do embrião. Pesquisas relacionadas ao uso do ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH) e giberelina ( $GA_3$ ) na tentativa de superação da dormência física, e de baixas temperaturas para superação da dormência fisiológica foram realizadas. Contudo, os resultados parcialmente positivos, indicam haver uma maior complexidade na superação da dormência dessa espécie. Objetivou-se com essa pesquisa, determinar o tipo de dormência e os métodos de escarificação e estratificação para a superação da dormência de sementes de oliveira. Foram utilizados endocarpos e sementes de quatro cultivares de oliveira, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, mais cultivadas no Sul de Minas Gerais. Os frutos foram colhidos em bancos de germoplasma *in vivo*, despulpados manualmente e parte dos seus endocarpos foram submetidos aos tratamentos de 0, 12 e 18 horas de  $H_2SO_4$  e estratificação úmida pelos períodos de 0, 15 e 30 dias de, a 10 °C, além dos tratamentos com  $GA_3$  500 ppm, por imersão dos endocarpos ou aplicação de  $GA_3$  no substrato, estratificando ou não por 30 dias. Outra parte dos endocarpos foi utilizada para determinação do teor de água e avaliação do ganho de água por diferentes métodos de escarificação e substrato de embebição. Em outro experimento, as sementes foram extraídas e submetidas à estratificação úmida pelos períodos de 0, 15 e 30 dias. O teor de água dos endocarpos variou de 11,8 a 11,5% e o ganho de água variou de 29 a 54%. Quando os endocarpos foram imersos por 18 horas em  $H_2SO_4$ , as cultivares Arbequina, Koroneiki e Maria da Fé apresentaram os melhores percentuais de germinação, em todos os períodos de estratificação. Esse mesmo período parece ter sido insuficiente para promover a germinação da cultivar Ascolano 315. Na estratificação dos endocarpos em vermiculita úmida a 10 °C com  $GA_3$  500 ppm, a porcentagem de germinação aumentou significativamente para todas as cultivares, variando de 18 a 33%. A germinação de sementes foi superior a obtida com os endocarpos, quando submetidas a 30 dias de estratificação, variando de 22 a 43%. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que as cultivares avaliadas não responderam de forma semelhante aos tratamentos de escarificação e estratificação. A germinação de sementes com endocarpo é possibilitada quando os endocarpos são submetidos por 18 horas em  $H_2SO_4$ , e a combinação de  $GA_3$  e estratificação por 30 dias possibilitaram incrementos na germinação de sementes com endocarpos. O  $H_2SO_4$  por si só não possibilitou a germinação.

**Palavras-chave:** Endocarpos. Ácido Sulfúrico. Ácido Giberélico.

## ABSTRACT

The use of olive (*Olea europaea* L.) seeds is important for the breeding program and for the production of rootstocks mainly to those cultivars with rooting limitations. There are evidences that seeds from this specie present not only mechanical dormancy, due to the presence of a hard endocarp, but also embryonic dormancy, due to the embryo immaturity. Researches related to the use of sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ), sodium hydroxide (NaOH), gibberellin ( $GA_3$ ), and low temperatures, for overcoming the physical and physiological dormancy, were realized. However, the results showed a higher complexity in the mechanisms of dormancy in these specie seeds. Thus, the objective of this work was to determine the dormancy type and the methodologies for scarification and stratification to overcome de dormancy of olive seeds. Were used endocarps and seeds of four olive cultivars, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki and Maria da Fé, harvested at Epamig's experimental farm, in Maria da Fé - MG. The fruits were harvested at in vivo germplasm bank, then, manually pulped, with part of their endocarps submitted to the treatments of 0, 12 and 18 hours of  $H_2SO_4$  and humidity stratification by the periods of 0, 15 and 30 days at 10 °C, beyond the treatments using  $GA_3$  500 ppm, which was used with the endocarps immersion and also with the application in the substrate, stratifying or not, by 30 days. Other quantity of endocarps was used to determine the water content and to evaluate the water gain by different methods of scarification and imbibition substrate. In other experiment, seeds were exposed and submitted to the humidity stratification by the periods of 0, 15 and 30 days. The water content of endocarps ranged from 11,5% to 11,8% and the water gain from 29 to 54%. When the endocarps where immersed by 18 hours in  $H_2SO_4$ , the cultivars Arbequina, Koroneiki and Maria da Fé showed the higher percentage of germination in all the stratification periods. This same period showed be promising to promote the germination of Ascolano 315 cultivar. In the endocarp stratification using humid vermiculite at 10 °C with  $GA_3$  500 ppm, the percentage of germination increase significantly for all cultivars, ranging from 18 to 33%. The seeds germination was higher to the obtained with endocarps, when submitted to 30 days of stratification, ranging from 22 to 43%. For scarification and stratification treatments, the cultivars studied did not respond in a similar way. The germination of olive endocarps from the cultivars Arbequina, Koroneiki and Maria da Fé, was possible when submitted to  $H_2SO_4$  for 18 hours and the combination of  $GA_3$  and stratification bu 30 days allowed the increase of germination of seeds with endocarps. The use of  $H_2SO_4$  itself did not allowed the germination.

**Keywords:** Endocarps. Sulfuric acid. Gibberellic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) apesar de apresentar sementes viáveis, não possui como principal meio de propagação a propagação sexuada, devido à variabilidade genética e ao longo período juvenil apresentado por plantas propagadas sexuadamente (SANTOS et al., 2015), sendo a utilização de estacas o principal meio de propagação da espécie (NAVERO et al., 2017).

No entanto, sabe-se que estacas das cultivares de oliveira apresentam variação quanto à aptidão ao enraizamento (ALVES et al., 2010; SILVA et al., 2012; HECHMI et al., 2013; MARIOSA, 2014), e por isso a produção de porta-enxertos via sementes é uma alternativa, principalmente para cultivares de difícil enraizamento. Segundo Coutinho et al. (2009), porta-enxertos produzidos por sementes apresentam crescimento inicial vigoroso e sistema radicular profundo, o que os torna mais resistentes às condições climáticas adversas. Além disso, a utilização de sementes de oliveira também é importante para programas de melhoramento genético, principalmente com relação à seleção de cultivares mais adaptadas às regiões de cultivo.

A utilização de sementes de oliveira ainda é dificultada, pois há evidências de que as sementes apresentem dormência mecânica e dormência embrionária. Diversos autores têm se dedicado ao estudo da superação da dormência mecânica com a utilização de diferentes produtos como o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (CRISOSTO e SUTTER, 1985a; BANDINO et al. 1999; ABU-QAOUUD 2005; LAL et al., 2015), o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (BANDINO et al. 1999; LAL et al., 2015); o ácido clorídrico (HCl) (LAL et al., 2015) e a água aquecida a 40°C (BANDINO et al. 1999; ABU-QAOUUD, 2005).

Os resultados dos trabalhos citados são, em sua maioria, conflitantes. Segundo Rostami e Shasavar (2009), as cultivares não respondem de forma idêntica quando submetidas à escarificação química. Além disso, Crisosto e Sutter (1985b) descreveram que o endocarpo não inibe a embebição e a germinação das sementes, ele não apresenta inibidores, mas quando os endocarpos foram completamente removidos houve elevação do percentual de germinação. Os autores concluíram que o endocarpo consiste apenas de uma barreira física que impede a germinação através da resistência mecânica.

Nesse sentido, Voyiatzis (1995), expôs que as sementes de oliveira não apresentam apenas essa dormência ou impedimento físico, apresentando também uma dormência fisiológica. Segundo Voyiatzis e Porlingis (1986), a baixa germinação de sementes de oliveira está associada à presença de inibidores encontrados no endosperma, corroborando com os

resultados encontrados por Bohm (2013), de que dormência fisiológica deve ser controlada pelo embrião e pelos tecidos que o rodeiam.

Essa dormência fisiológica, decorrente da imaturidade do embrião, também tem sido objeto de pesquisa, e apesar dos diversos trabalhos realizados, o efeito da baixa temperatura para a superação dessa dormência parece ser o único consenso entre os pesquisadores (CRISOSTO e SUTTER, 1985a; VOYIATZIS e PORLINGIS, 1987; HANNACHI et al., 2011; MORALES-SILLERO et al., 2012). Porém, ainda não há uma definição sobre a temperatura ideal ou o tempo no qual as sementes devem ser submetidas ao frio.

De acordo com Riachy (2007), essa exigência a baixas temperaturas pode estar relacionada às condições climáticas da área de origem de cada cultivar. Cultivares com origem em regiões mais frias necessitam de mais frio quando comparadas com as cultivares de regiões mais quentes (VOYIATZIS, 1984; SOTOMAYOR, 1989).

As pesquisas com esse intuito, de superação de dormência de sementes de oliveira, são fundamentais para obtenção de plantas mais vigorosas, com sistema radicular mais profundo e mais tolerante a condições adversas (RIBEIRO, 2016). Esses fatores são importantes tanto para a produção de porta enxertos no caso de cultivares de difícil enraizamento, quanto para programas de melhoramento genético.

Objetivou-se com este trabalho testar métodos e períodos de estratificação para a germinação de sementes de oliveira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, foram colhidos do Banco de Germoplasma da Fazenda Experimental da EPAMIG em Maria da Fé – MG.

O município fica localizado no Sul do estado de Minas Gerais, a 1276 metros de altitude, com precipitação anual de 1738,6 milímetros e as temperaturas médias variam de 10,1°C nos meses mais frios a 23,3°C nos meses mais quentes. O clima da cidade é do tipo Cwb, de acordo com Köppen, também chamado de subtropical de altitude (WIKIPEDIA, 2020).

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, em parceria com o Núcleo Tecnológico Epamig Azeitona e Azeite, sediado em Maria da Fé - MG.

A colheita foi manual, feita de forma aleatória, em diferentes alturas e ramos da planta, em março de 2017, no ponto de colheita para azeite, quando os frutos apresentam coloração verde amarelado. Os frutos foram encaminhados ao Laboratório Central de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras, onde foram despulpados e secos sobre papel à sombra, onde permaneceram por 48 horas até armazenamento em câmara fria a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , até a realização dos ensaios.

### 2.1 Determinação do teor de água

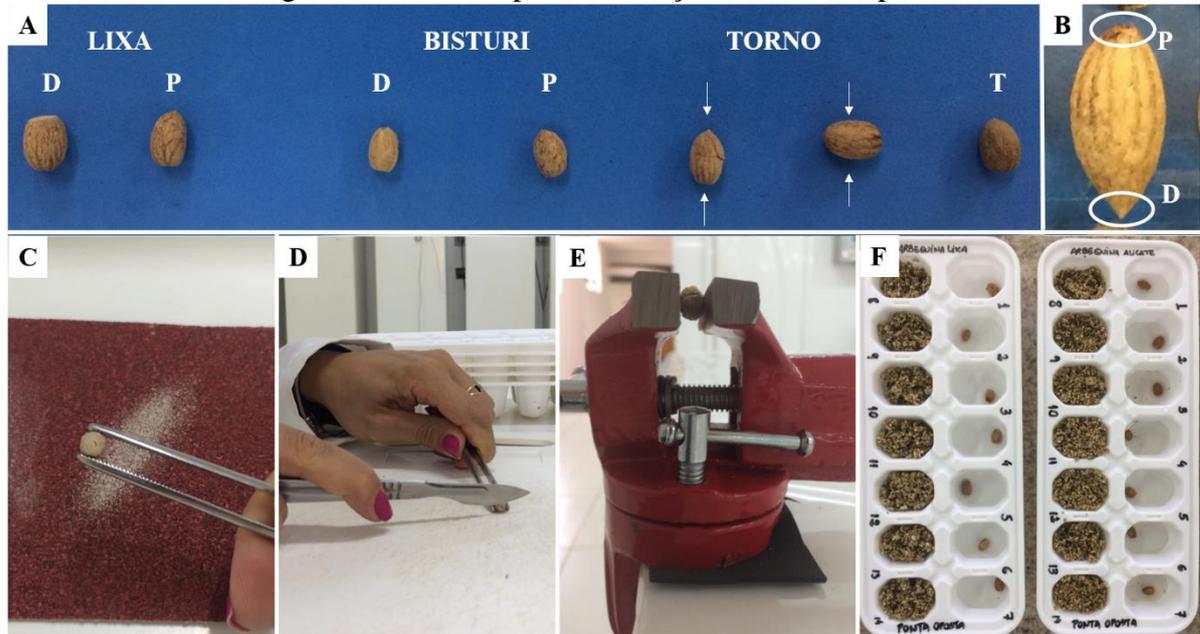
Determinou-se o teor de água dos quatro materiais, utilizando-se o método da estufa a 105°C por 24 horas, conforme descrito nas Regras para Análise de Sementes (RAS). (BRASIL, 2009). Foram utilizadas 4 repetições de 25 endocarpos para cada cultivar.

### 2.2 Embebição

Para a avaliação do ganho de água, os endocarpos intactos e os submetidos a corte com bisturi em duas extremidades, lixa na região proximal e distal do pedúnculo, e rachadura longitudinal e transversal no endocarpo com o torno de bancada, foram individualizados, previamente pesados, e mantidos em câmaras tipo BOD, sob luz constante, a 25 °C (Figura 1).

Realizou-se a pesagem individual de cada endocarpo, diariamente até a estabilização do peso para o cálculo do ganho de água.

Figura 1 - Diferentes metodologias de escarificação mecânica em endocarpos de oliveira (*Olea europaea* L.). A) Métodos de escarificação utilizados, lixa, corte com bisturi e torno de bancada e suas posições; B) Região distal (D) e proximal (P) do endocarpo, em relação ao pedúnculo; C) Escarificação do endocarpo com lixa; D) Corte do endocarpo com bisturi; E) Rachadura no endocarpo com torno de bancada e F) Substratos água e vermiculita para embebição dos endocarpos.

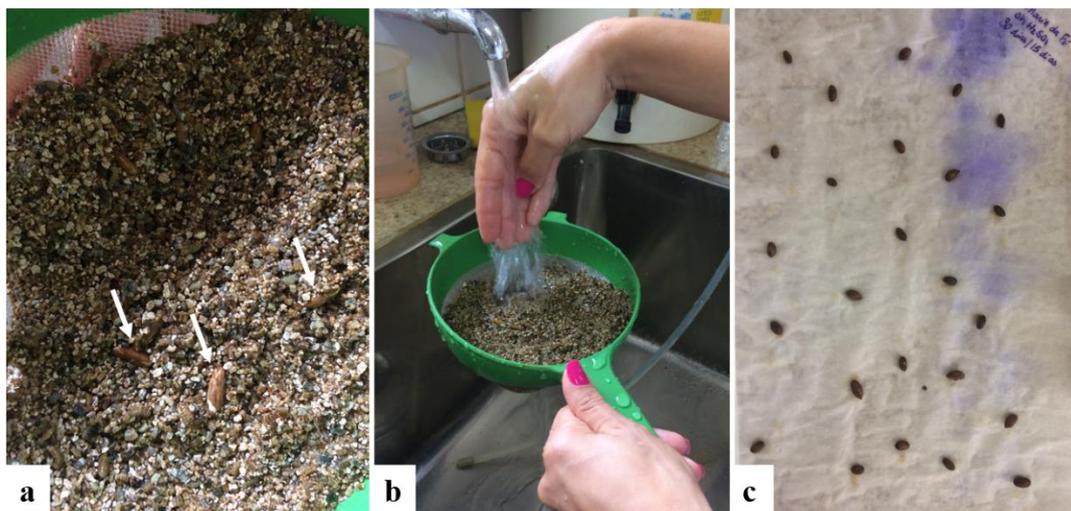


Fonte: Do autor (2020).

### 2.3 Extração dos endocarpos e estratificação das sementes

Os endocarpos das quatro cultivares de oliveira, foram removidos manualmente com o auxílio de um torno de bancada e as sementes submetidas à estratificação úmida pelos períodos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias e submetidas ao teste de germinação, o qual foi avaliado pelos períodos de 7, 15 e 30 dias (Figura 2).

Figura 2 - Estratificação de sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). a) sementes em substrato vermiculita b) retirada das sementes do substrato vermiculita após o período de estratificação; c) teste de germinação com sementes de oliveira após a estratificação.



Fonte: Do autor (2020).

Na estratificação úmida utilizou-se o substrato vermiculita previamente esterilizado em estufa a 105°C por 4 horas. Para o cálculo da quantidade de água necessária na estratificação das sementes, realizou-se o cálculo da capacidade de retenção de água. Com base no resultado obtido, o substrato foi mantido com 70% da capacidade de retenção de água.

Paralelamente aos tratamentos de estratificação foram realizados os tratamentos envolvendo baixas temperaturas:

1) Armazenamento de endocarpos e sementes das quatro cultivares em *deep freezer* por 24 horas e por 7 dias;

2) Imersão de endocarpos e sementes das quatro cultivares em nitrogênio líquido.

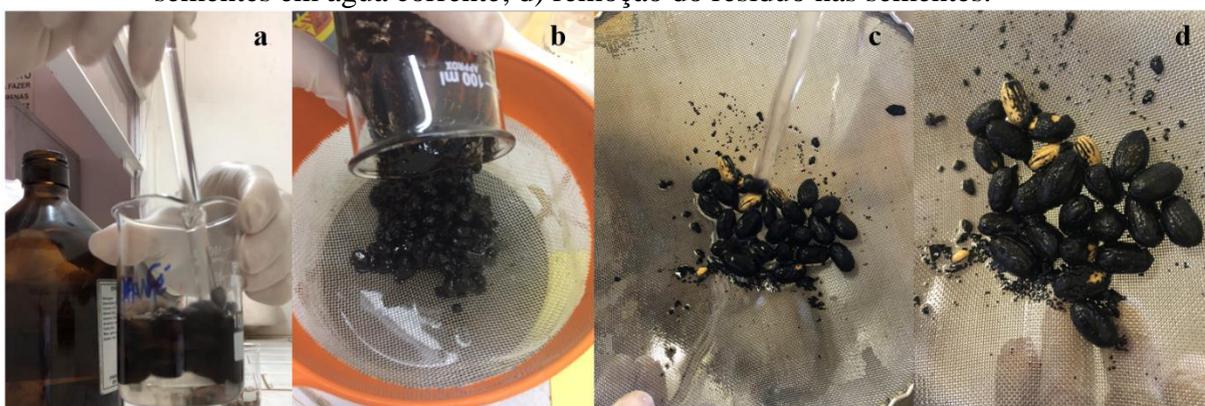
Após cada tratamento, endocarpos e sementes foram submetidos ao teste de germinação, com quatro repetições de 25 sementes, semeadas entre papel, tipo *germitest*, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel com água destilada.

#### 2.4 Escarificação química dos endocarpos

A escarificação química consistiu na imersão dos endocarpos, das quatro cultivares, em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pelos períodos de 0, 12 e 18 horas. Foram utilizados 100 endocarpos de cada cultivar, divididos em 4 repetições de 25.

Os endocarpos foram colocados em beckers de vidro e o ácido adicionado até o cobrimento total dos endocarpos. A solução foi agitada, com o auxílio de um bastão de vidro e após cada período de imersão, os endocarpos foram retirados do ácido e lavados em água corrente (Figura 3) para serem submetidos à estratificação e parte dos endocarpos submetidos ao teste de tetrazólio.

Figura 3 - Processo de escarificação química com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) em sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). a) sementes mais o ácido sulfúrico e agitação com bastão de vidro; b) retirada das sementes do ácido sulfúrico; c) lavagem das sementes em água corrente; d) remoção do resíduo nas sementes.



Fonte: Do autor (2020).

Para realização do teste, os endocarpos permaneceram no  $H_2SO_4$  por 12 horas, em seguida foram abertos com o auxílio de um torno de bancada e as sementes cortadas em um terço no sentido longitudinal. As sementes foram imersas em solução de sal de tetrazólio 0,5% em frascos escuros, mantidos em câmeras do tipo BOD, reguladas a 30 °C pelo período de 3 horas. As sementes foram lavadas e avaliou-se a coloração dos tecidos das sementes, as quais foram classificadas como viáveis e inviáveis.

## 2.5 Estratificação dos endocarpos

A estratificação foi realizada conforme acima. Os endocarpos foram acondicionados em câmaras tipo BOD a 10°C, pelos períodos de 0, 15 e 30 dias. Ao final de cada período, os endocarpos foram retirados da vermiculita e submetidos ao teste de germinação.

Os endocarpos foram semeados entre papel, utilizando papel tipo *germitest*, umidecidos com 2,5 vezes o peso do papel com água destilada e mantidos em câmaras de germinação, reguladas a 25°C, realizando avaliações aos 7, 15, 30 e 45 dias após a semeadura, considerando como germinadas as sementes protruídas.

Posteriormente realizou-se um experimento adicional com o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>); com os tratamentos:

- 1) Imersão dos endocarpos em GA<sub>3</sub> 500ppm por 12 horas sem estratificação;
- 2) Imersão dos endocarpos em GA<sub>3</sub> 500ppm por 12 horas, com 30 dias de estratificação;
- 3) Aplicação de GA<sub>3</sub> 500 ppm no substrato vermiculita no caso dos tratamentos submetidos à estratificação de 30 dias;
- 4) Aplicação de GA<sub>3</sub> 500 ppm no substrato papel tipo *germitest* no caso dos tratamentos sem estratificação.

Após cada tratamento, os endocarpos foram submetidos ao teste de germinação, com quatro repetições de 25 sementes, semeadas entre papel tipo *germitest*, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel com água destilada, com exceção do tratamento o qual o GA<sub>3</sub> foi aplicado no papel.

## **2.6 Análise Estatística**

Para todos os tratamentos foram realizadas apenas a contabilização dos dados, com a indicação do melhor resultado encontrado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teor de água

As sementes das diferentes cultivares apresentaram teor de água inicial variando de 11,8 a 11,5% e foram mantidas em ambiente de laboratório até a execução dos testes e uniformização da umidade.

#### 3.2 Embebição

Para a embebição, houve grande variação do ganho de água dentro de cada cultivar e como não houve um padrão em relação aos diferentes métodos e substratos. Realizou-se apenas a porcentagem média do ganho de água (Tabela 1), com intuito de verificar se o endocarpo era realmente um impedimento à absorção de água.

Tabela 1 - Porcentagem média de ganho de água de quatro cultivares de *Olea europaea* L.

Cultivar	Ganho de água (%)
Arbequina	38
Ascolano 315	29
Koroneiki	54
Maria da Fé	32

Fonte: Do autor (2020).

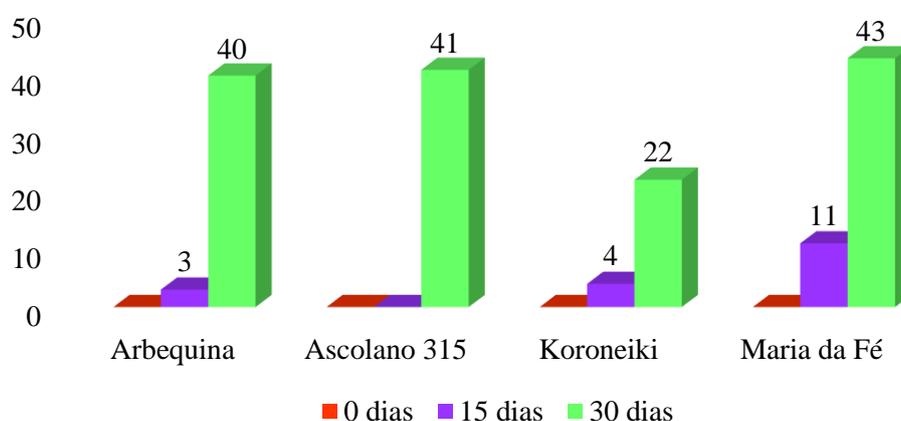
A cultivar Ascolano 315 foi a cultivar que teve o menor percentual de ganho de água, provavelmente pela maior espessura do endocarpo em relação às outras cultivares. Além disso, essa cultivar apresenta maior dureza do endocarpo verificada pela pressão realizada com o torno de bancada para abertura dos endocarpos e extração das sementes. De acordo com Silva et al. (2012), essa cultivar apresenta endocarpos com maior volume e maior largura, ou seja, mesmo com a escarificação, a captação de água é dificultada. Esse resultado pode ser confirmado com o percentual de germinação das sementes da cultivar Ascolano 315 quando o endocarpo é removido.

Já para a cultivar Koroneiki observou-se maior ganho de água. Segundo Silva et al. (2012) essa cultivar apresenta o endocarpo mais fino, fato também observado nessa pesquisa, o que pode ter facilitado a absorção de água por essa cultivar.

### 3.3 Extração dos endocarpos e estratificação das sementes

Para avaliação dos resultados considerou-se como germinação a protrusão radicular. O tratamento em que as sementes não foram estratificadas não houve germinação para nenhuma das cultivares avaliadas. Já com 15 dias de estratificação, as cultivares Arbequina, Koroneiki e Maria da Fé germinaram 3%, 4% e 11%, respectivamente. Mas os maiores percentuais foram obtidos após submeter as sementes das quatro cultivares a 30 dias de estratificação (gráfico 2).

Gráfico 1 - Percentual de protrusão de sementes de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) após 0, 15 e 30 dias de estratificação úmida a frio (10 °C). Entende-se como zero os tratamentos sem valores no gráfico.



Fonte: Do autor (2020).

O período de estratificação de 30 dias, mostrou ser o mais eficiente para a superação da dormência fisiológica de sementes de oliveira, dentre os tempos testados. Esse resultado confirma os encontrados por Voyiatzis (1995). O autor relatou que embora tenha obtido resultados de germinação satisfatórios submetendo as sementes a 3 semanas de estratificação, o período de 30 dias de estratificação aumentou significativamente esse resultado e que esse percentual melhorou com o aumento do resfriamento.

Ao associar dados de germinação, com os de ganho de água (Gráfico 1) e às imagens radiográficas do teste de raios X mencionado no artigo anterior (Figura 8, gráfico 1, página 41), nota-se que a cultivar Koroneiki, apesar de ter o maior percentual de ganho de água e o menor número de sementes com anormalidades identificadas pelas radiografias, apresentou a menor porcentagem de germinação. Isso sugere que a cultivar Koroneiki tenha a dormência fisiológica mais acentuada, quando comparada com as outras cultivares. O período de 30 dias de estratificação para essa cultivar pode ser insuficiente para a superação completa dessa

dormência, ou ainda, a baixa germinação pode estar associada à presença de inibidores encontrados no endosperma como foi relatado por Voyiatzis e Porlingis (1986).

A cultivar Ascolano 315, apesar de apresentar o menor ganho de água, quando comparada às outras cultivares, e maior porcentagem de sementes com anormalidades, apresentou maior porcentagem de germinação quando o endocarpo foi removido. Ou seja, para essa cultivar, o endocarpo age como uma barreira física, limitando a absorção de água. De acordo com Voyiatzis (1995), umas das causas da baixa germinação de sementes de oliveira é a restrição da absorção de água imposta pelo endocarpo. No entanto, quando essa barreira é eliminada, a cultivar apresenta bom desempenho na germinação.

Vale lembrar também que a água é o fator mais importante para o processo de germinação, necessária para reativação dos processos metabólicos da semente, incluindo a síntese e a atividade de enzimas e hormônios como, por exemplo, a giberelina, que ativa enzimas responsáveis pela digestão de reservas culminando com a retomada do crescimento do embrião (BEWLEY & BLACK, 1978).

Os testes realizados com baixas temperaturas, *deep freezer* e nitrogênio líquido, não apresentaram resultados de germinação. Para todos os tratamentos e cultivares, a germinação foi de 0%. Esse resultado sugere que a baixa temperatura isoladamente não é suficiente para promover a superação da dormência de sementes de oliveira.

Em trabalhos realizados até o momento com diferentes cultivares, os autores utilizaram 30 dias de estratificação (VOYIATZIS, 1995; MORALES-SILLERO et al., 2012; VOYIATZIS & PORLINGIS, 1986) e os resultados indicaram que esse período promove a germinação de sementes de oliveira. Na Espanha, o protocolo padrão do programa de melhoramento de oliveira, também utiliza 30 dias de estratificação (RALLO et al., 2008), ou seja, o tempo de exposição das sementes às baixas temperatura parece ser um fator determinante para a superação da dormência fisiológica. Períodos inferiores aos mencionados são insuficientes para superação dessa dormência.

Os requisitos de temperatura para a germinação das sementes de oliveira são muito variáveis de acordo com a cultivar. Segundo Riachy (2007), essas exigências de temperatura podem estar relacionadas com as condições climáticas da área de origem de cada cultivar.

A cultivar Koroneiki é originária de regiões mais quentes da Grécia e por isso não são tão exigentes a baixas temperaturas (VOYATZIS, 1984). Provavelmente essa seja a justificativa para a germinação das sementes dessa cultivar mesmo quando não submetidas a estratificação. Como as sementes ficaram armazenadas em câmara fria a 10°C até a realização dos ensaios, esse período pode ter contribuído para diminuição dos efeitos da dormência fisiológica. Mas

mesmo assim, a cultivar ainda apresenta dormência, facilmente identificada pelos baixos percentuais de germinação em todos os tratamentos realizados.

A Arbequina é uma cultivar originária de zonas mais frias da Espanha, e por isso apresenta maior necessidade de frio (SOTOMAYOR e CABALLERO, 1990). O período necessário de exposição das sementes dessa cultivar ao frio deve ser maior do que o testado, justificando os baixos percentuais de germinação obtidos para essa cultivar.

Já a cultivar Maria da Fé é de origem brasileira e provavelmente necessita de menor exposição às baixas temperaturas. Além disso, essa cultivar apresenta cerca de 54% de similaridade genética com a cultivar Koroneiki (cf. p. 60 - Dendrograma de similaridade genética), a qual também parece não ser tão exigente às baixas temperaturas.

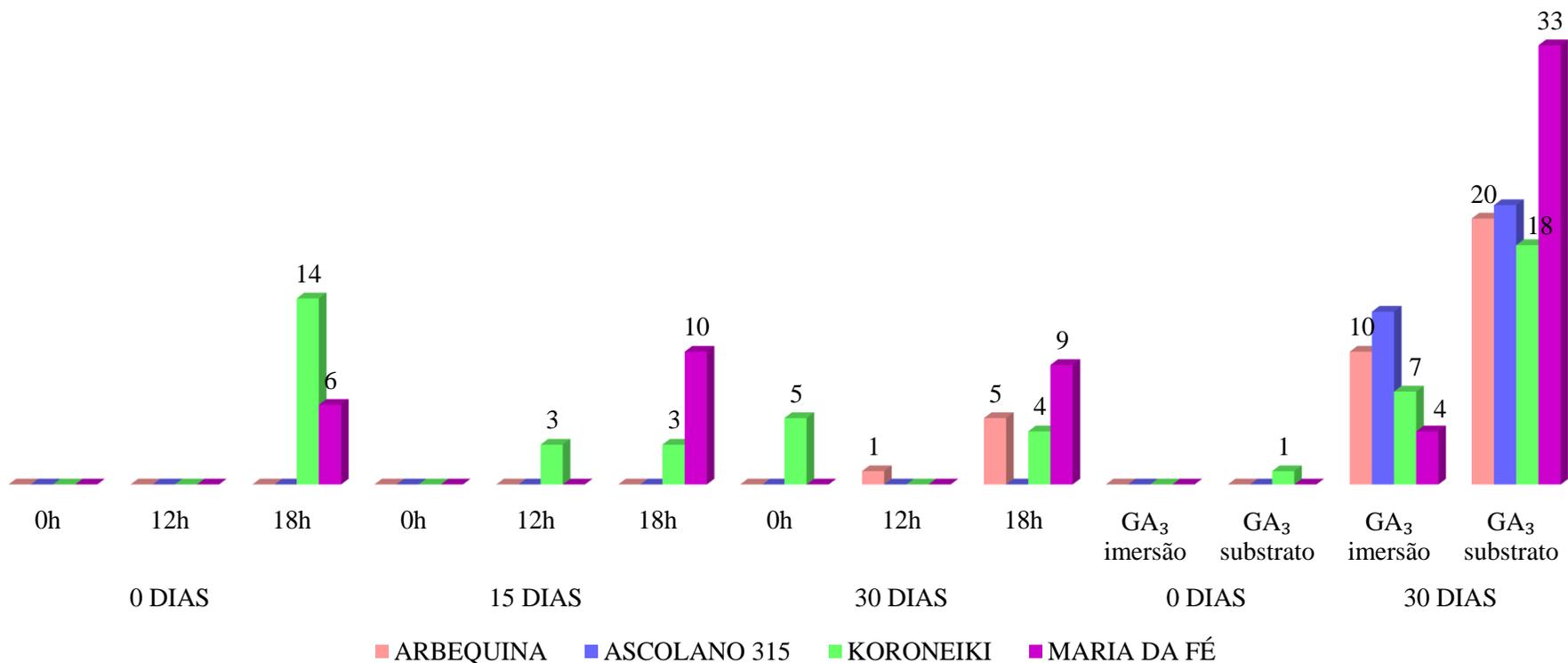
### **3.4 Escarificação química e estratificação dos endocarpos**

Os resultados de germinação dos endocarpos submetidos à escarificação química e estratificação úmida e os tratamentos com GA<sub>3</sub> mais estratificação se encontram no gráfico 2.

Para os tratamentos sem escarificação química, as cultivares apresentaram comportamento semelhante, com 0% de germinação, mesmo quando estratificadas, com exceção da cultivar Koroneiki, a qual após 30 dias de estratificação apresentou 5% de germinação. Esses resultados coincidem com os encontrados para embebição, no sentido de essa cultivar apresentar maior permeabilidade e menor espessura do endocarpo, e mesmo não escarificada, consegue absorver água suficiente para que haja retomada do crescimento do embrião.

Quando os endocarpos foram imersos por 12 horas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as cultivares Arbequina e Koroneiki responderam aos períodos de 30 e 15 dias de estratificação, respectivamente. A Arbequina com apenas 1% de germinação e a cultivar Koroneiki com 5% de germinação. Esses resultados confirmam os resultados encontrados por Rostami e Shasavar (2009), trabalho no qual os autores relataram que a cultivar Koroneiki apresenta maior velocidade de crescimento de plântulas do que a cultivar Arbequina após os endocarpos serem submetidos ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As cultivares Ascolano 315 e Maria da Fé não germinaram após às 12 horas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e quando não houve estratificação dos endocarpos, nenhuma das cultivares apresentou germinação, ou seja, 12 horas de ácido sulfúrico são insuficientes para superação da dormência física de endocarpos das cultivares Arbequina e Maria da Fé.

Gráfico 2 - Porcentagem de germinação de sementes de quatro cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 0, 12 e 18 horas e 0, 15 e 30 dias de estratificação úmida a 10 °C e tratamentos com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), por imersão ou no substrato, aos 0 e 30 dias de estratificação úmida a 10 °C.



Fonte: Do autor (2020).

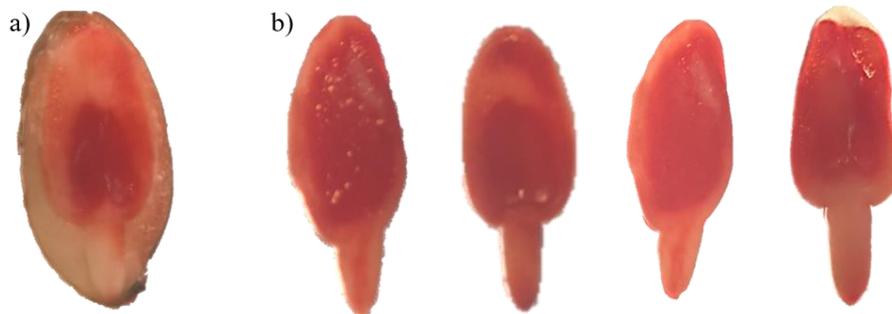
Já para 18 horas em  $H_2SO_4$ , as cultivares responderam positivamente ao tratamento. A cultivar Arbequina germinou 5% após os endocarpos serem estratificados por 30 dias, já as cultivares Koroneiki e Maria da Fé germinaram em todos os períodos de estratificação avaliados. A Koroneiki apresentou maior porcentagem de germinação quando não estratificada, 14%, e a cultivar Maria da Fé após estratificação de 15 dias com 10% de germinação.

É interessante observar que as cultivares Maria da Fé e Koroneiki respondem de forma semelhante aos tratamentos de escarificação e estratificação e, além das necessidades de temperaturas semelhantes, essas cultivares apresentam também endocarpos menores e mais finos quando comparadas às demais (SILVA et al., 2012; BLAZAKIS et al., 2017), o que provavelmente contribuiu para uma germinação mais rápida e uniforme quando foram submetidas ao tratamento de 18 horas em  $H_2SO_4$ .

Já para a cultivar Ascolano 315 os tratamentos com  $H_2SO_4$  parecem ter sido insuficientes para a superação da dormência física. Como mencionado anteriormente, essa cultivar apresenta endocarpos mais espessos e duros e precisariam de maior tempo de exposição ao ácido sulfúrico para a superação da dormência. Crisosto e Sutter (1985) relataram que o endocarpo consiste em uma barreira física à captação de água e à difusão de oxigênio, e que é também uma resistência mecânica à expansão embrionária, o que justifica a ausência de germinação para as sementes dessa cultivar para todos os tratamentos de escarificação química avaliados.

O teste de tetrazólio realizado nas sementes submetidas ao ácido sulfúrico por 12 horas confirmou que o tempo de exposição dos endocarpos ao  $H_2SO_4$  não é suficiente para danificar ou matar as sementes de oliveira. Os embriões permaneceram viáveis após a realização do teste (Figura 4).

Figura 4 - a) Corte transversal de uma semente de oliveira (*Olea europaea* L.) e b) embriões de sementes de oliveira submetidos ao teste de tetrazólio.



Fonte: Do autor (2020).

A viabilidade dos embriões era esperada visto que houve acréscimo no percentual de germinação de sementes de oliveira após os endocarpos terem sido submetidos a tratamentos com  $H_2SO_4$ . Crisosto e Sutter (1985); Abu-Qoaud (2005) e Rostami e Shasavar (2009), conseguiram a quebra da dormência imposta pelo endocarpo de diferentes cultivares de oliveira com a exposição ao  $H_2SO_4$  por diferentes tempos, de acordo com a necessidade de cada cultivar.

Todos os resultados apresentados corroboram com os encontrados por Bandino et al. (1999) de que diferentes cultivares não reagem de forma semelhante aos tratamentos de quebra de dormência. De acordo com Morales-Sillero et al. (2012), as cultivares têm mostrado grande variabilidade em relação aos seus requisitos de tempo de estratificação das sementes, assim como de escarificação do endocarpo.

Por outro lado, quando se compara os tratamentos com e sem ácido giberélico ( $GA_3$ ), nota-se que o  $GA_3$  exerce um efeito extremamente positivo sobre a germinação das cultivares, ficando claro que a dormência de sementes de oliveira não é exclusivamente física, mas também fisiológica, e pode apresentar diferentes graus intensidades.

A combinação de  $GA_3$  no substrato com 30 dias de estratificação úmida a  $10^\circ C$  aumentou significativamente o percentual de germinação de todas as cultivares. Resultados semelhantes foram encontrados por D'Este et al. (2019) com sementes de *Angelica arcangélica* e por Mir et al. (2018) com sementes de *Betula utilis*, trabalhos nos quais os autores associaram a estratificação a frio com o  $GA_3$  e obtiveram maiores percentuais de germinação das sementes estudadas.

#### 4 CONCLUSÕES

As cultivares Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé não respondem de forma semelhante aos tratamentos de escarificação e estratificação.

A germinação de endocarpos de oliveira, das cultivares Arbequina, Koroneiki e Maria da Fé, é possibilitada quando os endocarpos são submetidos ao ácido sulfúrico por 18 horas. Porém, a utilização do ácido sulfúrico por si só, não possibilita a germinação de endocarpos de lotes de oliveira que apresentam dormência fisiológica, sendo necessária a estratificação dos endocarpos.

A combinação de ácido giberélico e estratificação por 30 dias possibilitam incrementos na germinação dos endocarpos das cultivares Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, indicando que a dormência de sementes de oliveira é física e também fisiológica.

## REFERÊNCIAS

- ABU-QAOD, H. Germination of Arbequina olive seeds as affected by chemical scarification, hot water treatment and endosperm tissue. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 1, p. 12-17, 2005.
- BANDINO, G.; SEDDA, P.; MULAS, M. Germination of olive seeds as affected by chemical scarification, hot water DIP, and gibberellic acid treatments. **Acta Horticulturae**, v. 474, p. 35-38, 1999.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination**. Berlin: Springer Verlag, 1978. v. 1, 306 p.
- BLAZAKIS, K. N. et al. Description of olive morphological parameters by using open access software. **Plant Methods**, v. 13, n. 111, 2017.
- BOHM, J. **O grande livro da oliveira e do azeite**. Lisboa: Dinalivro, 1. ed., 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 395p.
- CRISOSTO, C.; SUTTER, E. G. Improving manzanillo olive seed germination. **Hortscience**, v. 20, n. 1, p. 100-102, 1985a.
- \_\_\_\_\_. Role of the endocarp in cultivar Manzanillo olive *olea europaea* seed germination. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 110, n. 1, p. 50-52, 1985b.
- D'ESTE, V. R. et al. Stratification and gibberellic acid treatments of Garden angelica (*Angelica arcangélica*) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 243-247, 2019.
- HANNACHI, H. et al. Stone diversity in wild and cultivated olive trees (*Olea europaea* L.). **Dendrobiology**, v. 77, p. 19-32, 2017.
- LAL, S. et al. Olive (*Olea europaea* L.) seed germination as affected by different scarification treatments. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 35, p. 3570-3574, 2015.
- MIR, N. A. et al. Determination of effect of stratification duration and GA<sub>3</sub> on germination and growth of *Betula utilis* D. Don under temperate conditions of Kashmir Himalayas. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 3, p. 536-542, 2018.
- MORALES-SILLERO, A. et al. Olive seed germination and initial seedling vigor as influenced by stratification treatment and the female parent. **American Society for Horticultural Science**, v. 47, n. 12, p. 1672-1678, 2012.
- RIBEIRO, A. V. A. P. **Simplificação do processo de multiplicação *in vitro* de oliveira “*Olea europaea* L.”**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Escola de Ciências e Tecnologia. Departamento de Fitotecnia. Universidade de Évora. Portugal. 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 Biociência**, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.

SOTOMAYOR, E. M. L.; CABALLERO, J. M. An easy method of breaking olive stone to remove mechanical dormancy. **Acta Horticulturae**, v. 286, p. 113-116, 1990.

SOTOMYOR LEON, E. M.; DURAN ALTIESENT, J. M. Breaking of dormancy in olive (*Olea europaea* L.) seeds. **Acta Horticulturae**, n. 356, p. 137-142, 1994.

RALLO, P. et al. Possible early selection of short juvenile period olive plants based on seedling traits. **Journal of Agricultural research**, v. 59, p. 933-940, 2008.

ROSTAMI, A. A.; SHASAVAR, A. Effects of seed scarification on seed germination and early growth of olive seedlings. **Journal of Biological Science**, v. 9, n. 8, p. 825-828, 2009.

RIACHY, M. E. **Técnicas de propagação y de acortamiento del período juvenil e el programa de mejora del olivo**. 2007. Tese (Master) – Olivicultura y Elaiotecnica, Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba. Córdoba. 2007.

SILVA, L. F. O. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. **Bragantia**, v. 71, n. 4, p. 488-492, 2012.

VOYIATZIS, D. G. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 444-448, 1995.

VOYIATZIS, D. G.; PORLINGIS, I. C. Quantitative changes of endogenous growth substances in olive seeds subjected to low temperature from breaking their dormancy. **Acta Horticultural Science**, 1986.

\_\_\_\_\_. Temperature requirements for the germination of olive seeds (*Olea europaea* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 62, n. 3, p. 405-411, 1987.

WIKIPÉDIA, **Maria da Fé**. Disponível em: < [https://pt.wikipedia.org/wiki/Maria\\_da\\_F%C3%A9](https://pt.wikipedia.org/wiki/Maria_da_F%C3%A9)>. Acesso em: 11 de fev. 2020.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise de imagens realizada nos frutos das quatro cultivares de oliveira, Arbequina, Ascolano 315, Koroneiki e Maria da Fé, as características de geometria, envolvendo tamanho, diâmetro e circularidade, confirmam o que é possível identificar pela análise visual. Frutos da cultivar Ascolano 315 apresentaram maiores valores para esses atributos, o que é importante para essa cultivar, já que é destinada ao consumo de mesa.

Quando se analisou os endocarpos também por imagens, além da geometria que foi capaz de classificar as cultivares, a textura também foi capaz de separar as cultivares, pela homogeneidade da superfície dos endocarpos. As cultivares Ascolano 325 e Arbequina apresentaram maior uniformidade da superfície.

Com relação aos parâmetros de geometria, os endocarpos da cultivar Ascolano 315 apresentaram os maiores valores e, embora possuam maior área, embebem menos água que as demais cultivares. Os endocarpos dessa cultivar são espessos e duros, constituindo de uma barreira física à penetração da água, e o efeito da baixa absorção de água é evidenciado pelo resultado do teste de germinação de endocarpos, que mesmo sendo escarificados com ácido sulfúrico e estratificados a 10°C por 30 dias, não permitiram o desenvolvimento do eixo embrionário. O inverso ocorre quando o endocarpo é removido, e o percentual de germinação passa de 0% a 41%.

Já a cultivar Koroneiki, a qual apresentou os menores valores para os parâmetros de geometria dos endocarpos, apresentou maior ganho de peso por absorção de água, o que permite deduzir que essa cultivar tem a embebição facilitada por apresentar o endocarpo mais fino. Porém, isso não significa que essa cultivar tenha bom desempenho germinativo, pois foi a cultivar com menor percentual de germinação quando os endocarpos foram removidos, o que indica que a cultivar Koroneiki apresenta maior intensidade da dormência embrionária.

As demais cultivares, Arbequina e Maria da Fé, não apresentaram um padrão na avaliação dos endocarpos. A cultivar Arbequina apresentou o maior valor de esfericidade da forma, indicando que ela é a cultivar que mais se aproxima de um círculo perfeito, característica que pode ser notada facilmente pela análise visual. A germinação de endocarpos dessas cultivares também foi baixa, sendo o maior valor encontrado para a Maria da Fé, quando submetida a 18 horas de ácido sulfúrico e 15 dias de estratificação.

Outro resultado interessante foi observado quando os endocarpos foram submetidos aos tratamentos de estratificação a 10°C por 30 dias e à aplicação de ácido giberélico. Nessas condições, a porcentagem de germinação elevou consideravelmente quando comparada aos

resultados encontrados com ácido sulfúrico. A cultivar Arbequina passou de 5% de germinação para 20% de germinação. Já a cultivar Ascolano 315, passou de 0% para 21%. A cultivar Koroneiki foi a que obteve menor percentual, 18%, e a cultivar Maria da Fé, o maior percentual, 33%.

Nota-se que as cultivares de oliveira não reagem de forma semelhante à escarificação química com ácido sulfúrico. De acordo com a literatura, a baixa germinação de sementes de oliveira não está associada só ao impedimento físico mecânico e físico imposto pelo endocarpo, está também relacionada com a necessidade de baixas temperaturas que promovem o amadurecimento embrionário e também com a presença de inibidores no endocarpo das sementes.

As sementes de oliveira, depois de extraídos os endocarpos, foram avaliadas por análise de imagens. Os fatores relacionados à coloração, como a intensidade da cor laranja, o brilho, a intensidade, a luma e a luminosidade, caracterizaram as sementes das quatro cultivares de oliveira, sendo a cultivar Koroneiki a que apresentou maiores valores e a Maria da Fé os menores valores.

Quando as sementes foram estratificadas a 10°C por 30 dias, os resultados de germinação foram elevados, sendo a cultivar Maria da Fé com o maior percentual, 43%, seguida pelas cultivares Ascolano 315, Arbequina e Koroneiki, com 41, 40 e 22% de germinação.

Com os resultados obtidos até esse momento, foi possível concluir que realmente o endocarpo consistia de uma barreira física, impedindo a retomada do crescimento do embrião, mas que também existia uma dormência fisiológica, que foi superada quando as sementes foram estratificadas. Porém, as cultivares também não respondem de forma semelhante à estratificação. A necessidade de frio para superação da dormência fisiológica parece estar diretamente relacionada com a cultivar e com a sua região de origem, sendo que as cultivares com origem em regiões mais frias necessitam de maior quantidade de frio, e as com origem em regiões mais quentes, necessitam de menor exposição ao frio.

A análise de plantas permitiu apenas a avaliação fisiológica das cultivares, como comprimento de plântula, de hipocótilo e raiz primária. Mas não houve a caracterização morfológica das plantas por cultivar.

Já a análise molecular de DNA, também caracterizou as cultivares e permitiu a construção de um dendrograma, no qual foi possível verificar a similaridade genética das cultivares. A cultivar Arbequina foi classificada como geneticamente diferente das demais. A cultivar Ascolano 315 apresentou cerca de 25% de similaridade com as cultivares Koroneiki e Maria da Fé. Essas duas últimas apresentaram maior grau de similaridade genética, cerca de

54%. A diferença ou a similaridade genética entre as cultivares pode estar relacionada ao modo como são polinizadas.

A cultivar Arbequina é autoploinizante, isso pode justificar a diferença dela em relação às demais cultivares. Para as outras cultivares a indicação é a utilização de cultivares compatíveis para a polinização. No caso da cultivar Koroneiki, uma das cultivares indicadas para polinização é a Galega, a qual deu origem à cultivar Maria da Fé. Isso pode explicar a alta similaridade genética entre essas cultivares.

A Ascolano 315 e a Maria da Fé são cultivares de origem brasileira, resultado da manipulação de cultivares estrangeiras, Ascolano e Galega, o que justificaria em parte a similaridade genética de 25% entre essas cultivares.

Como conclusão tem-se que há diferenças morfológicas entre frutos, endocarpos e sementes das quatro cultivares de oliveira avaliadas. Com relação à dormência, é possível afirmar que as cultivares não reagem de forma semelhante aos tratamentos de escarificação e estratificação. Isso provavelmente se deve à variabilidade genética encontrada pela análise de DNA e à região de origem de cada cultivar avaliada.

O ácido sulfúrico utilizado para escarificar os endocarpos, por si só, não é eficiente para superação da dormência física. Para a cultivar Ascolano 315 ficou evidente que o endocarpo consiste realmente de uma barreira física, impedindo a absorção de água e conseqüentemente a germinação. A aplicação do ácido giberélico associada à estratificação por 30 dias a 10°C promovem a superação da dormência embrionária e incrementam o percentual de germinação de todas as cultivares.

Quando os endocarpos são removidos e as sementes estratificadas por 30 dias a 10°C a germinação aumenta significativamente para todas as cultivares, permitindo concluir que a baixa temperatura é essencial para a promoção da germinação.