



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CURSO DE CIÊNCIAS RURAIS

GABRIELA FOSSATTI

**MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE VARIEDADES DE OLIVEIRA “Arbequina” e
“Maria da fé” EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E
FITORREGULADORES**

CURITIBANOS

Junho / 2015

Gabriela Fossatti

Multiplicação *in vitro* de variedades de oliveira “Arbequina” e “Maria da fé” em diferentes meios de cultura e fitorreguladores

Projeto apresentado como exigência parcial da disciplina de Projetos em Ciências Rurais, do Curso de Ciências Rurais, ministrado pela Universidade Federal de Santa Catarina com auxílio e orientação dos professores Dr^a. Julia Carina Niemeyer e Dr. Lírio Luiz Dal Vesco, à obtenção do título de Bacharel em Ciências Rurais.

CURITIBANOS

Junho / 2015

RESUMO

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família **Oleaceae**, sendo cultivada pela sua produção de frutos para a extração do azeite de oliva e azeitonas de mesa, além da sua grande importância econômica, social e cultural. Tem ocorrência principalmente na bacia do mediterrâneo, sendo estendida para vários países do mundo. O Brasil é o segundo maior importador de azeite e o quarto maior importador de azeitonas de mesa. Dessa maneira, o desenvolvimento de pesquisas que promovam melhorias na produção e qualidade dos produtos pertinente, porém ainda são consideradas insuficientes. Como alternativa a essas limitações, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer a micropropagação de variedades de oliveira adaptadas no Estado de Santa Catarina e Sul do Brasil. Para tanto, serão utilizadas técnicas que promovam a proliferação de brotações por organogênese direta, para a produção de mudas em grande quantidade. Para iniciação das culturas serão testados diferentes métodos de desinfestação, formulações salinas, diferentes níveis e tipos de fitorreguladores para promover maiores taxas de multiplicação. Antes da aclimatização e adaptação no ambiente serão avaliados diferentes métodos de indução do enraizamento. Esse projeto possibilitará a identificação de técnicas de cultivo para otimizar e reduzir custos, obtendo altas taxas de multiplicação, disponibilidade de mudas certificadas para estimular o cultivo no Brasil e com variedades de alta produtividade para extração do óleo e dos frutos com qualidade.

Palavras-chave: Micropropagação, *Olea europaea*, organogênese, produção de mudas, cultura de tecidos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	2
3.1. CLASSIFICAÇÃO DA OLIVEIRA	2
3.2. AZEITE DE OLIVA E AZEITONAS DE MESA	3
3.3. CULTIVO COMERCIAL	4
3.4. SISTEMAS DE PROPAGAÇÃO.....	5
3.4.1. <i>Cultivo convencional</i>	5
3.4.2. <i>Micropropagação</i>	5
4. HIPÓTESE.....	7
5. OBJETIVOS	7
5.1. OBJETIVO GERAL.....	7
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
6. METODOLOGIA.....	7
6.1. MATERIAL VEGETAL E AMBIENTE DE CULTIVO.....	7
6.2. ENSAIO DE DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO IN VITRO (ESTÁDIO I)	8
6.3. MULTIPLICAÇÃO IN VITRO (ESTÁDIO II).....	9
6.4. ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DOS BROTOS (ESTÁDIO III)	10
6.5. ACLIMATIZAÇÃO DAS BROTAÇÕES	10
6.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	11
7. RESULTADOS ESPERADOS	12
8. CRONOGRAMA.....	13
9. ORÇAMENTO	14
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.), pertence à família **Oleaceae**, é cultivada mundialmente por apresentar a produção de frutos com dupla finalidade, a extração de azeite de oliva ou azeitonas de mesa. É tradicionalmente usada desde os tempos remotos pela humanidade, principalmente na culinária e uso medicinal (CROCE, 2009).

O cultivo da oliveira tem seu desenvolvimento principalmente na bacia do Mediterrâneo, e a área de distribuição foi estendida para outros países do mundo como China, Austrália e diversos países da América do Sul (PINHEIRO et al. 2013).

No Brasil, o cultivo iniciou-se há alguns séculos, sendo transportada por imigrantes europeus, porém, a espécie se manteve em cultivos restritos no país, atualmente, é o polo mais desenvolvido. Pela atividade ser considerada nova no país, é difícil encontrar estatísticas disponíveis, contudo, os cultivos recentes demonstram que algumas variedades utilizadas são adaptadas ao solo e clima brasileiros (DUTRA et al. 2004).

Brasil é o segundo maior importador mundial de azeite de oliva e o quarto maior importador mundial de azeitonas de mesa. Porém, a área de plantio e de produção é considerada insignificante, e por não possuir plantio comercial, fica praticamente dependente da importação de seus derivados. O Chile e a Argentina, destacam-se por serem os maiores produtores e exportadores de azeitonas e azeites (SILVA et al. 2012).

Restringindo-se ao estado de Santa Catarina, o trabalho com oliveiras teve início em 2005. Em, 2008 iniciou a implantação de unidades de pesquisa, pela EPAGRI e, dois anos e quatro meses após o plantio, em algumas unidades em várias cidades, proporcionaram a primeira colheita de azeitonas. A partir destes frutos, foi produzido o primeiro óleo de oliva extra virgem do estado (CROCE, 2009).

A oliveira tem grande valor econômico, social e cultural. Técnicas de cultivo *in vitro* têm proporcionado à produção de propágulos e mudas de maior qualidade genética e fitossanitária. Além disto, esta técnica auxilia no desenvolvimento de novas cultivares e na conservação de germoplasma, importante ferramenta para o melhoramento vegetal. Contudo, a oliveira é uma espécie lenhosa e apresenta recalcitrância *in vitro*, fazendo com que a aplicação do cultivo se torne um desafio (PINHEIRO et al. 2013).

Perante as limitações, a propagação clonal *in vitro* torna-se uma opção fascinante, sendo capaz de superar as dificuldades encontradas nos processos de enraizamento de estacas e de enxertia, além de permitir a multiplicação clonal em larga

escala. Entre outras vantagens da micropropagação esta em poder associar aos estudos bioquímicos, fisiológicos e no melhoramento genético da oliveira (CANÇADO et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A oliveira é uma espécie que poderá apresentar grande potencial econômico, futuramente, no Brasil como uma alternativa de renda para pequenos e grandes agricultores. Além disto, pelo seu alto potencial de produção deve-se buscar desenvolvimento desta cultura no Brasil e também em Santa Catarina.

O fator limitante é a falta de investimentos em pesquisas na disponibilização de mudas uma vez que o processo convencional de obtenção de mudas é lento. Entre outros fatores como, o clima, aos quais as variedades atuais não se adaptam com facilidade, não demonstrando eficácia nos sistemas atual de propagação. Outros fatores incluem demasiada importação do óleo e seus derivados, elevados gastos com sua produção e não apresentar um número significativo de variedades cultivadas.

A região de Curitiba apresenta ambiente favorável para o cultivo da oliveira, porque o clima no local é do tipo Cfb temperado, mesotérmico úmido e verão ameno, com temperaturas no mês mais frio abaixo de 15°C e temperaturas no mês mais quente em torno de 25°C. Contudo, o cultivo *in vitro* dessa espécie pode reduzir o tempo do processo para a extração do fruto de alta qualidade, reduzir também a importação dos produtos advindos das oliveiras cultivadas no exterior, e tornar uma alternativa de renda para a agricultura e comércio da região, bem como, possíveis estudos de melhoramento posteriores.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Classificação da oliveira

A família **Oleaceae** é composta por 30 gêneros, destacando-se o gênero *Olea* L., e por cerca de 600 espécies, na qual, dentro desse gênero destaca-se a espécie *Olea europaea* L., mais conhecida como oliveira. Oriunda do sul do Cáucaso até todos os países do Mediterrâneo (MESQUITA et al., 2006).

As espécies desse gênero, também a oliveira, são consideradas bastante tolerantes às condições ambientais desfavoráveis, como verões intensos, que ficam sob condições de secas, ou então, doenças e fogo (PINHEIRO, 2013).

Existem também, diversos programas de melhoramento genético que estão sendo viabilizados em todo o mundo, visando ao aumento de produção, à melhoria do teor e qualidade do óleo, à modificação do comportamento do crescimento vegetativo e à tolerância a vários estresses bióticos e abióticos (PINHEIRO, 2013).

Na região mediterrânea, estão localizados os maiores plantios de oliveira do mundo, onde são produzidos 82% do azeite de oliva e mais de 90% de azeitonas de mesa (OLIVEIRA, 2003).

Devido aos poucos estudos com essa espécie, principalmente no manejo da fertilidade e nutrição da planta, a expansão do cultivo nacional tem ocorrido em ritmo lento. Em virtude disso, o Brasil é um dos maiores importadores de produtos da oliveira da América do Sul, sendo a Argentina um dos maiores fornecedores, incluindo também Chile, Espanha e Portugal (MESQUITA et al., 2006).

3.2. Azeite de oliva e azeitonas de mesa

O nome genérico *olea* vem do latim *oliva* (azeitona) ou do grego *elai* que significa óleo. O fruto maduro da oliveira é a azeitona, que pode ser consumida ou usada na extração do azeite, um líquido amarelo-esverdeado, transparente e aromático, empregado desde a antiguidade como ingrediente na culinária (MELLO; PINHEIRO, 2012).

O azeite refere-se à extração do fruto, sendo que o óleo é derivado da extração das sementes com auxílio de solventes. O processo de extração, geralmente é realizado por prensagem mecânica, o azeite de oliva é avaliado como um produto natural de alta qualidade (MESQUITA et al., 2006).

Pesquisas científicas têm mostrado que além do azeite, as folhas e ramos de oliveira apresentam propriedades antioxidantes e físico-químicas. E também, o chá da folha de oliveira apresenta ação anticancerígena, e antimicrobiana (MELLO; PINHEIRO, 2012).

O cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.) adquiriu especial importância em todo o mundo, pelo motivo do azeite de oliva trazer benefícios à saúde humana, pela sua comprovada eficácia na proteção de enfermidades cardiovasculares e por ser muito

utilizado como veículo na confecção de produtos farmacêuticos (ACEBEDO et al. 1997).

O fruto de mesa da oliveira, chamada popularmente de azeitona apresenta alto conteúdo em compostos bioativos, e seu consumo tem sido associado com o baixo risco de incidência de várias doenças, além de contribuir na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias, neurológicas e cancerígenas. Juntamente a estas propriedades funcionais, os compostos são responsáveis pelas características sensoriais do azeite e da azeitona em conserva, além de contribuírem para a sua estabilidade oxidativa durante o armazenamento (PESTANA-BAUER; GOULARTE-DUTRA; ZAMBIAZI, 2011).

A comercialização do azeite de oliva, precisa estar dentro dos padrões vigentes, com base em análise físico-químicas que o qualificarão. Essas características variam de acordo com o solo, clima, práticas culturais, variedades, estado de maturação do fruto, entre outros (PESTANA-BAUER; GOULARTE-DUTRA; ZAMBIAZI, 2011).

3.3. Cultivo comercial

Os produtos da oliveira tem aumentado seu consumo e se popularizado diante dos seus benefícios para a saúde e por sua excelente qualidade culinária. Diante deste fato, o cultivo comercial desperta grande interesse no agronegócio e em setores organizados da agricultura, como cooperativas e associações de produtores, o que tem estimulado a introdução e a expansão de pomares da espécie em todo o mundo (CANÇADO et al., 2013).

Porém, a história dessa cultura ainda tem um longo caminho a percorrer, pois o modelo da olivicultura nacional ainda carece de muitas informações científicas e tecnológicas que só podem ser originadas pela pesquisa séria e rigorosa. No Brasil, o seu cultivo comercial está iniciando, mas já se compreende que a disponibilidade de mudas de qualidade é um fator que limita a expansão no território nacional (CANÇADO et al., 2013).

Alguns fatores como o desenvolvimento de variedades adaptadas para o Brasil e a geração de material propagativo com qualidade genética e fitossanitária superior, devem ser atendidos como pilares fundamentais para apoiar o desenvolvimento sustentável e eficiente da olivicultura no país. Sendo assim, as tecnologias modernas como a micropropagação *in vitro*, a clonagem por embriogênese somática e a

transformação genética da oliveira podem ser avaliadas como grandes aliadas para o avanço tecnológico aplicado a essa cultura (CANÇADO et al., 2013).

3.4. Sistemas de propagação

3.4.1. Cultivo convencional

Algumas das formas de produção de mudas é a técnica de propagação vegetativa, que ocorre através de rebentos enraizados, enxertia ou estaquia, porém, quando são utilizados propágulos de grande tamanho, são observadas desvantagens, quanto ao menor número de mudas produzidas. Outra forma é por propagação de sementes, mas esse processo é dificultado por inúmeros motivos, desde a longa fase juvenil e o baixo nível de frutificação, além da germinação lenta até se produzir a muda (ACEBEDO, et al. 1997).

3.4.2. Micropropagação

As técnicas de cultura de tecidos com o objetivo de melhorar a lucratividade das cultivares, tem-se destacado como um instrumento importante que pode ser explorado, produzindo plantas com elevada qualidade sanitária. A micropropagação é afrontada como a opção mais adaptada para espécies de plantas, na qual a dificuldade de propagação por métodos convencionais é considerada limitante para a sua multiplicação em larga escala (SOUZA et al., 2006).

Dentre todas as formas, um método bastante utilizado para a cultura da oliveira é a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é incontestavelmente a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos. Esse método utiliza de explantes de segmento nodal, e sua principal vantagem é a diminuição do tempo de formação das mudas e a obtenção de material genético com qualidade genética e sanitária superior aos outros métodos de produção de mudas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A forma mais utilizada para esse tipo de produção é através de segmento nodal, que, pode ser um fragmento de raiz, caule, folha ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas no seu desenvolvimento (ANDRADE, 2002).

A potência da regeneração *in vitro* em qualquer espécie é determinada pelo genótipo da planta matriz, fatores ambientais *in vitro* e o meio de cultura, reguladores de

crescimento, porém outros fatores físicos importantes também estão presentes (RODRIGUES et al., 2011).

Em contrapartida, a propagação de estacas lenhosas pelo cultivo *in vitro*, que é a técnica mais comum de ocorrer em espécies como a oliveira, é limitada devido à interferência de contaminantes, que são bactérias e fungos, também, pela oxidação dos explantes por compostos fenólicos, baixa multiplicação e crescimento das plântulas e sensibilidade às trocas gasosas (RODRIGUES et al., 2011).

Na fase do estabelecimento *in vitro*, a adição de fitorreguladores tem o objetivo de suprir as possíveis carências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que encontram-se isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Respectivamente, a adição de fitorreguladores instiga certas respostas como o alongamento ou a multiplicação da parte aérea. Através da adição de citocinina pode ser favorável e variar bastante em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Portanto, para a oliveira que é uma espécie lenhosa, a propagação vegetativa por métodos convencionais é ineficiente e limitada pela influência do clima e pela necessidade de grandes quantidades de material vegetativo para formação das estacas. Então a micropropagação assume uma posição de destaque na multiplicação da oliveira (Figura 1). Contudo, alguns problemas já identificados em experimentos realizados com oliveiras anteriormente, estão à oxidação por compostos fenólicos exsudados pela própria espécie, a elevada taxa de contaminação por microrganismos endossimbiontes e a recalcitrância para o enraizamento *in vitro* (CANÇADO, 2013).

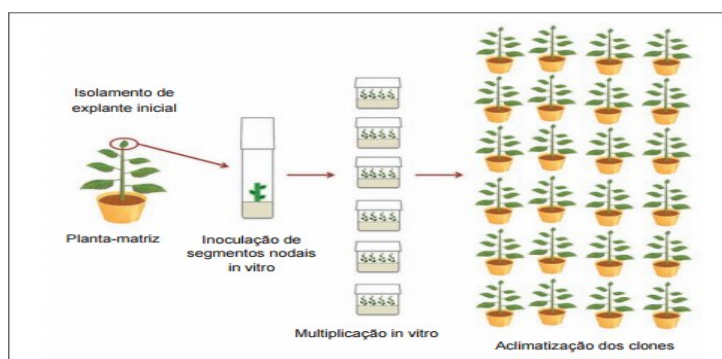


Figura 1. Representação esquemática utilizado na micropropagação da oliveira. **Fonte:** Cançado, et al. (2013).

4. HIPÓTESE

O uso das estratégias de cultivo *in vitro* de oliveira permitirá a redução no tempo do processo de produção das mudas, com qualidade fitossanitária e em grande escala, permitindo com isto um aumento na área de cultivo de oliveira no Brasil, e conseqüentemente, redução na importação do óleo e de azeitona em conserva.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo estabelecer a micropropagação de variedades de oliveira (*Olea europaea* L.), adaptadas no Estado de SC e Sul do Brasil, como alternativa ao sistema convencional de produção de mudas e disponibilizar grande quantidade de mudas de alta qualidade fitossanitária.

5.2. Objetivos específicos

- a) Selecionar plantas matrizes a partir de variedades promissoras para o cultivo em Santa Catarina e conduzir sob ambiente controlado em casa de vegetação;
- b) Testar métodos de desinfestação dos explantes (segmentos nodais e meristemas) para a introdução *in vitro*;
- c) Avaliar formulações salinas e tipos de fitorreguladores para promover a multiplicação *in vitro*;
- d) Testar métodos de indução do enraizamento e aclimatização das mudas para posterior transferência a campo;
- e) Publicar os resultados em revistas e eventos científicos.

6. METODOLOGIA

6.1. Material vegetal e ambiente de cultivo

O presente trabalho será desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos que, localiza-se a uma latitude de 27°16'58" sul e a uma longitude de 50°35'04" oeste, estando a uma altitude de 1100 metros. As plantas matrizes de duas cultivares de *O. europaea*, 'Arbequina', que é muito empregada para a

produção de azeite, e ‘Maria da Fé’, serão adquiridas nas Estações Experimentais da Epagri de Caçador e de Chapecó. Mudanças destas plantas serão transplantadas para vasos e conduzidas em casa de vegetação, sob controle de temperatura e umidade, para promover a proliferação de brotações jovens (Estádio 0) para utilizar como fonte de explantes para a introdução *in vitro*.

O meio de cultura básico (MCB) será composto por uma formulação salina, a exemplo da MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (Lloyd, McCown, 1980) e DSD1 (DA SILVA & DOAZAN, 1995). A este MCB será adicionado de vitaminas de Morel (2 ml/L), sacarose (30g/L) ágar (7,5g/L) e suplementado com fitorreguladores em equilíbrio de citocininas, auxinas e giberelinas para indução, multiplicação e alongamento das brotações. Para ajuste do pH indicado de 5,8 com NaOH e HCl a 0,5N. Em seguida, 10 mL de meio de cultura será transferido para tubos de ensaio (25 x 150 mm) e autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. O processo de inoculação das culturas ocorre em condições assépticas de câmara de fluxo laminar. E as culturas mantidas em ambiente de sala de crescimento ou câmara BOD com temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

6.2. Ensaio de desinfestação e introdução *in vitro* (Estádio I)

Para reduzir a taxa de contaminação por microrganismos endosimbiontes, em câmara de fluxo laminar (Figura 2), os segmentos nodais serão submetidos a diferentes processos de desinfestação; 1) Imersão em álcool 70% por cerca de um minuto, água sanitária comercial a 40%, com pH ajustado para 7, por 15 minutos, mais três enxagues em água destilada e autoclavada, todos sob agitação constantes; 2) Imersão em álcool 70% por cerca de um minuto, água sanitária comercial a 40% com pH ajustado para 7,0, por 15 minutos, adicionar Agrimicina® produto comercial 300 mg/L por 10 minutos e três enxagues em água destilada e autoclavada, todos sob agitação constantes; 3) Imersão em álcool 70% durante 30 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% de princípio ativo), adicionado de uma gota de Tween 20, durante 15 minutos, todos sob agitação constantes e mais três enxagues em água destilada e autoclavada.



Figura 2 – Preparação dos explantes (segmentos nodais) de oliveira em câmara de fluxo laminar, antes da inoculação *in vitro*. **Fonte:** EPAMIG Sul de Minas, Fazenda Experimental de Caldas, Laboratório de Biotecnologia Vegetal 2010.

Após a desinfestação os segmentos nodais, contendo aproximadamente 1 cm de comprimento, com a retirada das extremidades e pecíolos, ficando apenas com um a dois segmentos nodais. Em seguida serão inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm), sobre pontes de papel filtro e 10 ml dos meios de cultura básico para promover proliferação múltipla das brotações na introdução *in vitro* (estádio I), para isto serão testados diferentes meios de cultivos. O delineamento do experimento será um fatorial (2x3x2), com 12 tratamentos, sendo duas cultivares, combinados com três métodos de desinfestação citados acima, e a suplementação aos meios de cultura (MCB) duas combinações de fitorreguladores para a indução das brotações: 1) Suplementação de 20 μM de zeatina (ZEA) + 10 μM de ácido giberélico (GA_3); 2) Suplementação de BAP (4 μM) + 10 μM de ácido giberélico (GA_3). Cada unidade experimental será composta 5 tubos de ensaio, com dois explantes por tubos, arranjadas na forma blocos completos casualizados (BCC), com três repetições. Dados de número de brotos, altura de brotos, número de segmentos nodais e formação de calo, serão coletados após 4, 6, 8 e 10 semanas da inoculação.

6.3. Multiplicação *in vitro* (Estádio II)

Brotações com dois segmentos nodais, obtidas no ensaio de indução serão inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm), sobre pontes de papel filtro e 10 ml dos meios de cultura básico, definido no estágio I.

O delineamento do experimento será um fatorial (3x3), com 9 tratamentos: Três formulações salinas: MS; WPM (Lloyd, McCown, 1980) e DSD1 (DA SILVA & DOAZAN, 1995) combinados com a suplementação ao meio de cultura básico (MCB) três combinações de fitorreguladores, 1) 20 μM de zeatina (ZEA) + 10 μM de ácido giberélico (GA_3) 2) A suplementação de 4 μM 6-benzilaminopurina (BAP) + 10 μM de ácido giberélico (GA_3). 3) A suplementação de 1 μM de Thidiazuron (TDZ) + 10 μM de ácido giberélico (GA_3). Cada unidade experimental será composta por 5 tubos de ensaio, com dois explantes por tubos, arranjadas na forma de blocos completos casualizados (BCC), com três repetições. Dados de número de brotos, altura de brotos, número de segmentos nodais e formação de calo, serão coletados após 4, 6, 8 e 10 semanas da inoculação.

6.4. Alongamento e enraizamento dos brotos (Estádo III)

Para o alongamento dos brotos, serão utilizadas diferentes concentrações de giberelina (GA_3), sendo nas doses 5, 10 e 20 mg.L^{-1} .

Posteriormente, os tubos de ensaios serão levados para dentro da câmara de fluxo laminar para realizar a repicagem dos brotos, com altura superior a 1cm, com o objetivo de estimular o enraizamento. Somente após um período de cerca de 30 a 40 dias que os explantes estavam em sala de crescimento. Então, serão repicadas as brotações induzidas para gerar a proliferação de brotações múltiplas e o alongamento de brotos (preparação para a aclimatização) pelo subcultivo em meio de cultura. Dados como altura de brotos (cm), número de brotos e números de nós por explantes serão coletados em cinco semanas de cultivo.

6.5. Aclimatização das brotações

Na fase de aclimatização dos brotos para condições *ex vitro*, serão analisado os propágulos que conseguiram desenvolver a parte aérea e o sistema radicular de forma equilibrada, após, serão isoladas as brotações e imersas em diferentes concentrações de solução de AIB (0, 25, 50, 100 ppm), durante 10 segundos, com o objetivo de ocorrer o enraizamento das microestacas e posterior aclimatização. Essas microestacas serão transplantadas para bandejas de isopor de 128 células com substrato numa mistura na proporção de 1:2:1 de Plantmax®, com vermiculita expandida, casca de arroz carbonizada e perlita. As bandejas ficarão acondicionadas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas, onde a rega será automática de hora em hora, e a

temperatura média de 23°C. Essa fase é determinante para a qualidade final das mudas produzidas.

Após cerca de 60 a 70 dias em casa de vegetação, as brotações serão separadas em microestacas e transferidas das bandejas para tubetes de plástico contendo a mesma mistura de substrato e mantidas na condição a campo (Figura 3). Deve-se no início ter cuidado com o sombreamento, principalmente nas horas mais quentes do dia, e a umidade. Porém, à medida que o tempo passa, a condição ambiental, na qual os propágulos estão expostos devem ser gradativamente alteradas. Assim então, as novas mudas serão forçadas a adaptar seu metabolismo e sua anatomia para condições mais próximas ao ambiente externo.



Figura 3. Infraestrutura necessária para a condução das plantas matrizes e aclimatização das mudas de oliveira. **Fonte:** Cançado et al. (2013).

6.6. Análises Estatísticas

A análise será realizada comparando os dados obtidos da maior taxa de crescimento e multiplicação pelo cultivo *in vitro* e cultivo convencional, estes vão ser os fatores de comparação e análise.

Dados originais coletados de todos os parâmetros serão compilados em planilhas Excel e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias, quando necessário os dados originais serão

transformados em $\log(x+2)$ ou $(x+0,5)^{0,5}$, segundo as recomendações de Steel & Torrie (1980) e Compton (1994), utilizando o programa ASSISTAT.

7. RESULTADOS ESPERADOS

Concluindo o projeto espera-se encontrar um método eficiente de desinfestação dos explantes para estabelecer *in vitro* a cultura da oliveira. Encontrar também, uma formulação salina associada ao tipo ou concentração de um fitorregulador eficiente que produzam maiores taxas de multiplicação sem variação soma-clonal, ou seja, que não produza variantes. A partir disto, disponibilizar de mudas em grande quantidade, uma vez que, o processo convencional de obtenção de mudas é lento.

Que sejam atingidos os objetivos, quanto o tempo correto da realização. Quanto as variedades utilizadas, que seja de boa produtividade da cultura, para extração do óleo e dos frutos com qualidade. Tendo em vista que essa espécie necessita de importantes estudos posteriores para seu desenvolvimento na região de Santa Catarina e também em larga escala, para a redução da importação do óleo e da azeitona. O projeto já seria uma forma de incentivo aos agricultores e indústrias que futuramente teriam interesse em mudar o hábito cultivável, para uma possível agregação de renda extra, ou fonte única de renda.

8. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DE PROJETO (2015)												
ATIVIDADES	MÊS											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Coleta de plantas	X											
Produção de meios de cultura		X	X	X	X	X						
Desinfestação e estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>		X										
Multiplicação de brotos			X	X	X	X						
Alongamento dos brotos					X	X						
Indução radicular e aclimatização						X	X					
Estabelecimento à campo							X	X	X	X	X	X
Extração do óleo e fruto							X			X		
Análise dos dados e análises estatísticas										X	X	X
Elaboração de resumos e artigos científicos										X	X	X
Elaboração do relatório técnico final												X

9. ORÇAMENTO

MATERIAL PERMANENTE			
Descrição	Quantidade (un)	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Ar condicionado	1	1.600,00	1.600,00
Refrigerador	1	1.500,00	1.500,00
B.O.D	1	3.500,00	3.500,00
Capela de fluxo laminar	1	5.000,00	5.000,00
Subtotal			11.600,00
MATERIAL DE CONSUMO			
Vidrarias de laboratório (bécker, tubo de ensaio, bastão de vidro, entre outros)	Diversos	-	2.600,00
Placas de Petri	200	4,00	800,00
Instrumentos de laboratório (pinças, lâminas, tesouras, bisturis, entre outros)	Diversos	-	3.500,00
Reagentes para meio de cultura (fitorreguladores, ágar, macro e micronutrientes, sacarose, entre outros)	Diversos	-	2.000,00
Bandejas, substratos, adubos, entre outros	Diversos	-	1.500,00
Álcool 70%	100 L	7,00	700,00
Subtotal			11.100,00
SERVIÇOS DE TERCEIROS			
Instalação da sala de crescimento (fios, lâmpadas, entre outros)	Diversos	-	3.000,00
Instalação do aparelho para extração do óleo	Diverso	-	3.000,00
Análise do óleo e fruto por laboratório da instituição	2	-	1.000,00
Subtotal			7.000,00
RECURSOS HUMANOS			
Bolsas (12 meses)	2	420,00	5.040,00
Subtotal			5.040,00
TOTAL GERAL			34.740,00

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEBEDO, M. M. et al. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. **Scientia Horticulturae**, v.69, n.3-4, p.207-215, 1997.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. (Documentos 58, Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111;).

CANÇADO, G. M de A.; BRAGA, F. T.; SOUZA, R. A. V.; NUNES, C. F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. **Cultivo *in vitro* de oliveira e suas aplicações**. Capítulo 10. 2013. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Geraldo_Cancado/publication/234047087_Cultivo_in_vitro_da_oliveira_e_suas_aplicaes/links/09e4150e89a8cea160000000.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2015.

COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** n.37, p.217-242,1994.

CROCE, D. M. Cultura da oliveira para o estado de Santa Catarina. **Sul Brasil Rural**, Chapecó, 22 ed., 2009.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.2, p.229-233, 2008.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequenía” para início da micropropagação. **Ciência Rural**. v.38, n.6, p.1769-1772, 2008.

DUTRA, L. F.; OLIVEIRA, A. F.; FRÁGUAS, C. B; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.220-223, 2004.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. Edington: Exegetics, 1993. 555p.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 2. In Practice. Edington: Exegetics, 1996. 787p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, Brasília, 1990. P. 99-169.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-flasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia, latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Comb. proc. Intl. Plant prop. Soc.**, v.30, p.421-427, 1980.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimento e nutrição**, Araraquara, v.23, n.4, p.537-548, 2012

MESQUITA, D. L.; OLIVEIRA, A. F. de; MESQUITA, H. A. Aspectos econômicos da produção e comercialização do azeite de oliva e azeitona. **Informe Agropecuário**.

azeitona e azeite de oliva: tecnologias de produção, Belo Horizonte, v.27, n.231, p.7-21, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, A. F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A.; RINCÓN, C. D. R. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.117-125, 2003.

OLIVEIRA, A. F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A.; RINCÓN, C. D. R. Influência no número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.2, p.332-338, 2003.

PESTANA-BAUER, V. R.; GOULARTE-DUTRA, F. L.; ZAMBIAZI, R. Caracterização do fruto da oliveira (variedade Carolea) cultivada na região sul do Brasil. **Alimento e nutrição**, Araraquara, v.22, n.1, p.87-79, 2011.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveiras (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.1, p.19-29, 2013.

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. **Plant Tissue Cult. Biotech.** v. 1, n. 1, p. 26-36, 1995. RODRIGUES, M. et al. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 2011. DOI: 10.1007/s11627-011-9398-8.

SILVA, A. L. ; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliqué à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal International Des Sciences de La Vigne Et Du Vin, Bordeaux** (França), v. 29, n. 1, p. 01-09, 1995.

SILVA, L. F. O; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Fitotecnia**, Campinas, v.71, n.2, p.202-209, 2012.

SOUZA, J.A. et al. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1920- 1922, 2006.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics - A biometrical approach**. 2.ed., New York: Mcgraw-Hill Book, 1980. 633p.