UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

DISSERTAÇÃO

Período de floração e viabilidade do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS.

Thais Helena Cappellaro

Pelotas, 2010

Thais Helena Cappellaro

Período de floração e viabilidade do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientador: Dr. Enilton Fick Coutinho

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C247p Cappellaro, Thaís Helena

Período de floração e viabilidade do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS / Thaís Helena Cappellaro ; orientador Enilton Fick Coutinho- Pelotas,2010.-58f. ; il..- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Olea europaea 2.Fenologia 3.Germinação de pólen 4.Meio de cultura 5.Armazenamento de pólen I.Coutinho, Enilton Fick(orientador) II .Título.

CDD 634.63

Banca examinadora

Dr[a] Adriana Graciela Desiré Zecca
Dr. Flávio Gilberto Herter
Ph.D. Darcy Camelatto

Suplente

Dr. Janni André Haeter

Dedico este trabalho aos meus pais,
que apesar da distância, sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado e ao meu namorado pelo incentivo.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio durante todo o curso;

Ao namorado Leandro pelo incentivo e companheirismo.

À Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – FAEM, pela oportunidade de realização do curso;

À Empresa de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Clima Temperado, pelo apoio logístico aos trabalhos desenvolvidos nesta pesquisa;

Ao Engenheiro Agrônomo, Dr. Enilton Fick Coutinho, pela amizade, apoio e orientação;

A Engenheira Agrônoma, Dr^{a} Maria do Carmo Bassols Raseira, pelo apoio dado durante o desenvolvimento dos trabalhos;

Ao Técnico Agrícola Marco Aurélio Rosa de Faria pela amizade e ajuda na realização dos trabalhos;

A equipe de estudantes do projeto Francine e Fabrício;

Ao pessoal do Laboratório de Melhoramento da EMBRAPA/CPACT, pelo apoio na realização das análises;

Ao Senhor José Rigo pela disponibilização das oliveiras utilizadas na realização dos experimentos.

Resumo

CAPPELLARO, Thais Helena. **Período de floração e viabilidade do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS.** 2010. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família *Oleaceae*, a qual é composta por cerca de 35 espécies do gênero *Olea*. Todas as oliveiras cultivadas e as silvestres são da espécie *europaea.* No Brasil, há pouca pesquisa em realização, a qual foi praticamente interrompida nos últimos 30 anos. Somente nesta última década, a pesquisa com oliveiras foi reiniciada. Portanto, as informações técnicas obtidas em condições nacionais são quase inexistentes. Assim, é importante a realização de pesquisas para obtenção de conhecimentos quanto aos principais aspectos técnicos que abrangem sistemas de produção. O presente trabalho teve como objetivos determinar o período de floração e a viabilidade do pólen das cultivares de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki', em Bagé/RS, nos anos de 2008 e 2009. As avaliações do período de floração foram realizadas entre os meses de setembro a novembro. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo utilizado quatro repetições (planta). Em cada planta foram selecionados cerca de 200 rácimos florais por quadrante imaginário (Leste, Oeste, Norte e Sul), totalizando aproximadamente 800 rácimos/planta. Nos ramos e rácimos florais, identificou-se o estádio fenológico de cada estrutura vegetativa ou reprodutiva, utilizando a metodologia adaptada por Fernández-Escobar e Rallo (1981), na qual são definidos, resumidamente: a) repouso invernal (dormente); b) começo da brotação; c) formação dos rácimos florais; d) inchamento dos botões florais; e) diferenciação das corolas; f) início da floração; f1) plena floração; g) queda das pétalas; h) formação dos frutos. Para avaliar a viabilidade do pólen conduziram-se três experimentos em Laboratório, nos anos de 2008 e 2009. O primeiro experimento constou de diferentes testes de viabilidade do pólen (colorimétrico, germinação *in vitro* e germinação *in vivo).* A variável avaliada foi à viabilidade do pólen expressa em porcentagem (teste colorimétrico, identificada somente pela coloração do pólen; testes *in vitro* e *in vivo*, pela percentagem de pólen germinado). O segundo experimento foi composto de diferentes concentrações de ácido bórico (0, 25, 50, 75,100 e 125 $mg.L^{-1}$) adicionadas a meios de culturas compostos por 1% de ágar e 15% de sacarose. A variável avaliada foi viabilidade do pólen caracterizada pela porcentagem de pólen germinado. O terceiro experimento comparou a viabilidade de polens armazenados durante 12 meses em dessecadores com sílica-gel com polens frescos (coletado e colocado para germinar após a deiscência das anteras). A variável avaliada foi viabilidade do pólen caracterizada pela

porcentagem de pólen germinado. Segundo a metodologia utilizada, a floração das oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, em 2008 e 2009, teve início nos dias 16 e 20 de outubro e término nos dias 11 e 09 de novembro. O período de floração para as duas cultivares, nos anos de 2008 e 2009 foi idêntico, sendo 27 e 15 dias, respectivamente. O método colorimétrico superestima o percentual de polens viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”. O uso de ácido bórico no meio de cultura não influencia na germinação *in vitro* de pólen de cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki. Polens de oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”, armazenados a -16°C em dessecador com sílica-gel, durante doze meses, diminuem a porcentagem de viabilidade em ambas as cultivares.

Palavras-chave: *Olea europaea*; fenologia, germinação de pólen, meio de cultura, armazenamento de pólen.

Abstract

CAPPELLARO, Thais Helena. **Bloom period and pollen viability on the olive cultivars Arbequina and Koroneiki**. 2010. 58f. Thesis (Masters) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a member of the Oleaceae family which includes about 35 species of the genera *Olea.* All native and cultivated olive trees belong to the *Olea europaea* species. Researches with olive trees have recently been restarted in Brazil, and that is why there are little informations about this crop in this country. For this reason, it is important to develop studies about bloom period and pollen viability on olive cultivars such as Arbequina and Koroneiki. The objectives for this study were: to define the blooming period; to compare methods for pollen viability evaluation; to evaluate the effects of boric acid added to the medium on pollen germination; and to evaluate the viability of 12 months cold stored pollen, for these two cultivars. The data of bloom period for the two cultivars were obtained from 5 year-old trees grown in an orchard located in Bagé-RS, through observations made during the blooming period in the years of 2008 and 2009. Pollen viability of these two cultivars, were evaluated through three experiments in a laboratory. The first experiment were compared three methods of pollen viability evaluation: colorimetric method; *in vitro* germination; and *in vivo* germination*.* The variable was the pollen viability expressed as percentage (colorimetric, identified only by staining of pollen *in vitro* and *in vivo*, the percentage of pollen germinated). The second experiment were compared the effects on pollen germination of boric acid concentrations (0; 25; 50; 75; 100; or 125 $mg.L^{-1}$) added to the germination medium containing agar 1% plus sucrose 15%. In a third experiment, pollens of both cultivars placed inside desiccators containing silica-gel and kept at -16°C for 12 months, were evaluated on their germination viability. It was observed that: In 2008, both cultivars started bloom on October 16th, and end of blooming on November 11th, while in 2009 the starting of bloom was on October 20th and the end of blooming on November 3rd for both cultivars. Therefore the blooming period was shorter in 2009 (21 days) as compared to that of 2008 (27 days); the colorimetric method make possible to identify highest percentages of viable pollen grains, however this method may overestimate pollen viability; the addition of boric acid to the media do not affect pollen germination; and pollen of both cultivars decreased their viability when stored in desiccators at -16°C during 12 months.

Key-words: *Olea europaea*; phenology; pollen germination *in vitro*; pollen germination *in vivo*; pollen storage.

Lista de Figuras

Figura 1. Fases fenológicas da oliveira. (Fonte:J.J.J.) 12
Figura 2. Épocas de floração de oliveiras cultivar Arbequina, com cinco anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2008. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 14
Figura 3. Épocas de floração de oliveiras cultivar Koroneiki, com cinco anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2008. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 14
Figura 4. Épocas de floração de oliveiras cultivar Arbequina, com seis anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2009. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 15
Figura 5. Épocas de floração de oliveiras cultivar Koroneiki, com seis anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2009. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 15
Figura 6. Grãos de polens germinados e não germinados (método in vitro). Embrapa Clima Temperado, 2010. 27
Figura 7. Polens viáveis, germinados no estigma da flor de oliveira (método in vivo). Embrapa Clima Temperado, 2010. 27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias mensais de temperaturas (máxima, mínima e média), de Maio a Novembro de 2008 e 2009, no município de Bagé/RS. 9

Tabela 2. Médias mensais de precipitação e umidade relativa de Maio a Novembro de 2008 e 2009, no município de Bagé/RS. 10

Tabela 3. Porcentagem de grãos de polens viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki” através dos métodos colorimétrico, in vitro e in vivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 25

Tabela 4. Porcentagens de germinação de polens de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, independentemente do tratamento com ácido bórico. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 28

Tabela 5. Porcentagem de germinação de polens de oliveiras em função dos fatores cultivar (‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’) e tempo de armazenamento (Pólen fresco e armazenado por 12 meses), independentemente. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010. 29

Lista de Apêndice

APÊNDICE A Análise da variância da porcentagem de grãos de polens germinados/viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki” através dos métodos colorimétrico, in vitro e in vivo (Experimento 1). 42

APÊNDICE B Análise da variância da percentagem de grãos de polens viáveis de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, independentemente do tratamento utilizado (Experimento 2). 43

APÊNDICE C Análise da variância para percentagem de germinação de polens de oliveiras Arbequina e Koroneiki em função do tempo de armazenamento (pólen fresco e conservado durante 12 meses). 44

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract iii
Lista de Figuras v
Lista de Tabelas vi
Lista de Apêndice vii
1 INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1 A Oliveira (*Olea europaea*): características da planta 2
1.2 Cultivares estudadas 5
1.2.1 Arbequina 5
1.2.2 Koroneiki 6
2 CAPÍTULO I – ÉPOCAS DE FLORAÇÃO DE OLIVEIRAS 'ARBEQUINA' E 'KORONEIKI' 7
2.1 INTRODUÇÃO 7
2.2 MATERIAL E MÉTODOS 9
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 13
2.4 CONCLUSÃO 16
3 CAPÍTULO II – VIABILIDADE DO PÓLEN DE OLIVEIRAS CULTIVARES ARBEQUINA E KORONEIKI 17
3.1 INTRODUÇÃO 17
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 20
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
3.3 CONCLUSÕES 30
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS 31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32

1 INTRODUÇÃO GERAL

A oliveira (*Olea europaea L.)* é planta de origem européia adaptada a regiões de climas mediterrâneos, caracterizados pelo verão quente e seco e inverno com baixas temperaturas no período que antecede sua floração (EPAMIG, 2007). Segundo Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas da Espanha (2007), trata-se de uma cultura de grande tradição e importância nos países mediterrâneos, tendo associadas ao seu cultivo múltiplas funções e valias, tanto no setor de azeite de oliva quanto no de azeitona de mesa.

Gomes (1979) enfatiza a importância da olivicultura desde os primórdios da civilização. Relata sobre o sinal trazido à Noé pela pomba após o dilúvio, que foi um ramo de oliveira. Destaca que em Roma, os cidadãos ilustres e os vitoriosos eram cingidos na cabeça com ramos da planta. Os gregos dedicavam a oliveira à Minerva, deusa da sabedoria. A bíblia refere-se a oliveira como símbolo de beleza, sabedoria. Ainda, a planta tem significado histórico no desenvolvimento humano e, também encontra na atualidade, importância comercial dada suas propriedades organolépticas e nutricionais.

No Brasil os primeiros exemplares de oliveira foram introduzidas por volta do ano de 1800, por meio dos imigrantes europeus que se estabeleceram nas regiões Sul e Sudeste, porém, sua introdução teve apenas o caráter ornamental, não havendo na ocasião, e até o ano de 2007, cultivos expressivos desta cultura (EPAMIG, 2007).

Devido a comprovação dos benefícios do consumo do azeite à saúde humana, por isso muito usado na indústria farmacêutica, é a principal responsável pela intensificação, modernização e ampliação do cultivo de oliveiras no mundo (OLIVEIRA; PÁDUA; MATOS, 2002; ROMERO; GUTIÉRREZ, 2002; ALBIN; VILLAMIL, 2003).

No Brasil, há pouca pesquisa em realização, a qual foi praticamente interrompida nos últimos 30 anos. Somente nesta última década, a pesquisa com oliveiras foi reiniciada. Portanto, as informações técnicas obtidas em condições nacionais são quase inexistentes. Assim, é importante a realização de pesquisas para obtenção de conhecimentos quanto aos principais aspectos técnicos que abrangem sistemas de produção.

Observando-se a variabilidade edafoclimática do território, presume-se que no Brasil pode-se encontrar condições favoráveis ao plantio da Oliveira em larga escala. O consumo de azeite de oliva e de azeitona de mesa pelos brasileiros tem apresentado crescimento anual. Fator que consolida o país como mercado promissor. Assim, para que seja estabelecido um sistema de produção para o cultivo da oliveira, bem como a disponibilidade de uma alternativa para o agronegócio brasileiro, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas tais como o estudo da fenologia e viabilidade do pólen de cultivares com potencial para cultivo. Por essa razão este trabalho teve como objetivos determinar o período de floração e a viabilidade do pólen das cultivares Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS.

1.1 A Oliveira (*Olea europaea*): características da planta

A oliveira é uma das frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem. Seu cultivo remonta há 6.000 anos (VERNET, 1990). É originária de vasta grande área, que abrange desde o Sul do Cáucaso até os planaltos do Irã, Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se pelo Chipre até o Egito, povoando todos os países que margeiam o Mediterrâneo. A partir do século XV, com as viagens oceânicas de Colón, Magalhães e Elcano, passou a ser cultivada, no Novo Mundo e, na atualidade, se cultiva também no Sul da África, Japão, China e Austrália, estendendo-se a todos os países com clima viável (CIVANTOS, 2004).

Nas Américas, foi plantada, primeiramente, no México, nos Estados Unidos (Califórnia) e no Peru, difundindo-se a partir daí para o Chile e a Argentina (TAPIA et al. 2003).

Rapoport (1998) descreve a oliveira cultivada como uma árvore de tamanho médio, de grande longevidade, com formato arredondado, cujo porte, densidade de copa e cor da madeira variam conforme a cultivar e as condições de

cultivo. A planta, segundo esse autor, tem duas fases bem distintas: a juvenil, durante a qual não tem capacidade de produção de frutos, cujas folhas são mais curtas e grossas, seus ramos apresentam a distância entrenós menores, além de elevado potencial para o enraizamento de estacas; e a adulta, período em que alcança sua capacidade produtiva, com folhas maiores e delgadas e distâncias entrenó maior.

O sistema radicular depende do material de origem da árvore e das características de solo onde é cultivada. Se for originada a partir de sementes, a raiz será do tipo pivotante central e, se for gerada a partir de estacas, será do tipo fasciculada (LOUSSERT; BROUSSE, 1980a). Rapoport (1998) destaca que a maioria das raízes adventícias comporta-se como raízes principais durante o desenvolvimento e crescimento da oliveira.

Quanto ao sistema foliar, são simples e de forma elíptica, elípticolanceolada ou lanceolada, com comprimento de 5 a 7 cm e largura variando de 1 a 1,5 cm. Tem cor verde-escura e brilhante na face superior em virtude da ausência de estômatos e presença de cutícula e, na face inferior, cor esbranquiçada, devido a presença de placas foliares que conferem maior resistência às condições de estresse hídrico (RAPOPORT, 1998).

Oliveira e Abrahão (2006) descrevem as inflorescências da oliveira da seguinte maneira: as inflorescências têm forma paniculada, com ramificações desde o eixo central, que pode também estar ramificado. Essas ramificações situam-se nas axilas foliares de crescimento vegetativo do ano anterior. A flor é constituída por quatro sépalas verdes soldadas, que formam o cálice e por quatro pétalas brancas, também soldadas pela base, que formam a corola. Trata-se de uma flor com simetria regular. Apresenta dois estames que se inserem pela base da corola com disposição oposta. Estes são constituídos por filamento e antera de cor amarela, dividida em dois lóbulos onde estão localizados os grãos de pólen. No centro da flor, encontra-se o pistilo, composto de um ovário súpero, estilo curto e grosso e estigma biloculado e papiloso, que pode variar em sua forma dependendo da variedade. A maturação dos órgãos sexuais ocorre 20 dias antes da floração, com o desenvolvimento do saco embrionário e a maturação dos gametas.

As oliveiras possuem flores hermafroditas e estaminadas (Ateyyeh et al., 2000) sob a forma de panículas (GRIGGS et al., 1975). As flores hermafroditas têm geralmente dois estames e um ovário bilocular com um estilo e um estigma curtos (HARTMANN; OPITZ 1966). Em flores estaminadas, o pistilo é rudimentar ou ausente. As flores são polinizadas pelo vento, produzem grande quantidade de grãos de pólen (MARTIN 1954). Griggs et al., (1975) observaram que as flores de oliveira são adaptadas morfologicamente à autopolinização ou à polinização cruzada.

Quanto ao crescimento vegetativo da oliveira, Rallo (1998) acrescenta que é no momento da brotação que se inicia tanto o desenvolvimento de novos brotos como o de inflorescências e que, a partir disso, sucedem-se uma série de processos que irão determinar o crescimento vegetativo total da árvore e sua produção. Nesta etapa, se estabelece uma forte relação de competição por assimilados, razão pela qual observou que o estresse hídrico ou carências nutricionais ocasionam redução do número de flores por inflorescência e também, aumenta o número de flores abortadas.

O fruto da oliveira é denominado de azeitona, que é uma drupa de tamanho pequeno e formato elipsoidal, cujas dimensões variam em função da variedade, podendo apresentar entre 1 e 4 cm de comprimento e diâmetro de 0,6 a 2 cm. Possui uma só semente e é composto de três tecidos fundamentais: endocarpo, que corresponde ao caroço, o mesocarpo, à polpa e o exocarpo, à epiderme (RAPOPORT, 1998).

As condições climáticas durante a floração também são determinantes para a polinização e vingamento do fruto. Temperaturas superiores a 30^{o}C inibem o desenvolvimento do tubo polínico, ocasionando baixa porcentagem de produção de frutos. Somente quando for finalizado o período de concorrência por assimilados entre os frutos em desenvolvimento e ovários sem fecundar, é que poderá se definir o número final de frutos e, portanto, a capacidade produtiva total da árvore (RALLO, 1998).

Em clima mediterrâneo, durante o inverno, ocorre acúmulo de frio, o qual é considerado indispensável para que a oliveira saia da dormência e atinja, posteriormente, florescimento uniforme. O limiar de temperatura, isto é, a

temperatura base, abaixo da qual não ocorre crescimento, é de 12,5°C (TAPIA et al., 2003).

A oliveira é uma espécie com características de plantas xerófitas, com folhas coreáceas de cutícula espessa. Os estômatos situam-se na face inferior das folhas, diminuindo as perdas de água da planta por transpiração e permitindo que a atividade vegetativa se restabeleça imediatamente quando a planta sai de uma situação de estresse, causado por falta de água prolongada. A necessidade de água, em média, é de 650-800 mm por ano, com chuvas, preferencialmente, regulares (ALBIÑANA, 2002; COUTINHO et al., 2007). Na primavera, quando ocorre o florescimento, as chuvas não devem ser muito frequentes, para que o grão de pólen não seja lavado do estigma, o que reduziria a frutificação efetiva.

1.2 Cultivares estudadas

1.2.1 Arbequina

Cultivar de origem espanhola com considerável resistência ao frio e suscetível a clorose férrica em terrenos alcalinos, é autocompatível. É a variedade mais importante da Catalúnia, onde ocupa mais de 55000 ha. Fora da Espanha encontra-se principalmente na Argentina. Cultivar destinada à produção azeite; tem bom rendimento graxo e excelente qualidade do azeite produzido, porém de baixa estabilidade. Muito apreciada pelo precoce início de produção; elevada produtividade. O vigor da planta é baixo, permitindo maior adensamento de cultivo. O pequeno tamanho dos frutos dificulta a colheita mecânica (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2000).

1.2.2 Koroneiki

Originária da Grécia representa aproximadamente 60% da área de plantio daquele país. Resistente a seca, mas susceptível ao frio, é autocompatível. Cultivar destinada a produção de azeite, o qual é muito apreciado por suas características sensoriais, estabilidade e alto conteúdo de ácido oléico. Produtividade elevada e constante. Os frutos são de tamanho pequeno (1,1g em média). Entrada em produção é precoce (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2000).

1.3 Objetivos Gerais

- Determinar o período de floração e viabilidade do pólen de oliveiras Arbequina e Koroneiki em Bagé, RS

1.4 Objetivos específicos

- Determinar, em oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’ o período de floração;
- Avaliar diferentes métodos de viabilidade do pólen;
- Avaliar se a utilização de ácido bórico no meio de cultura influencia na germinação do pólen;
- Avaliar a germinação do pólen armazenado durante 12 meses.

2 CAPÍTULO I – ÉPOCAS DE FLORAÇÃO DE OLIVEIRAS ‘ARBEQUINA’ E ‘KORONEIKI’

2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil existe uma diversidade de culturas que geram produtos que já estão disponíveis no mercado consumidor. Entre as mesmas, está à cultura da oliveira, que, apesar de muito antiga no país, ainda há pouco conhecimento técnico sobre a mesma.

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família *Oleaceae*, na qual estão incluídos cerca de 35 espécies do gênero *Olea*. Estão incluídas na espécie *Olea europaea* todas as oliveiras cultivadas e também as oliveiras silvestres (AWAN et al., 2003).

Muitos fatores condicionam a dispersão de diversas espécies vegetais em todo o mundo, sendo o clima, um dos mais importante. Obviamente a oliveira faz parte deste contexto.

O efeito predominante das temperaturas na indução floral da oliveira foi indicado por diferentes autores. Alguns, inclusive relataram a necessidade de baixas temperaturas para a formação das inflorescências (BARD; HARTMANN, 1971; FATTA DEL BOSCO; DE MICHELE, 1970; HACKETT; HARTEMANN, 1967). Rallo e Martim (1991) verificaram que o frio afeta a abertura do botão floral. A temperatura, também afeta os outros estágios fenológicos das plantas tais como: floração (início, plena e final), polinização e fixação dos frutos (MILELLA; DEIDDA, 1968).

A floração da oliveira ocorre na primavera (em ramos do ano anterior), quando as temperaturas alcançam cerca de 15°C, entre os meses de setembro a dezembro (Hemisfério Sul). As gemas florais começam a inchar, evoluindo fenologicamente até a plena floração, acontecendo à polinização e, posteriormente, a fixação dos frutos (*fruit set*). Para que este processo ocorra exitosamente, é necessário que a temperatura média diária seja de

aproximadamente 20°C e a umidade relativa do ar encontre-se entre 60 e 80%. Se a UR for inferior a 50%, a viabilidade dos estigmas (órgão da flor destinado a receber o grão de pólen) é reduzida à menos de três dias, a qual é insuficiente para que se desenvolva o tubo polínico e, conseqüentemente, ocorre à redução da frutificação efetiva. Ao contrário, quando a UR é próxima de 100%, o pólen se hidrata e aumenta de peso, reduzindo, assim, o efeito da polinização anemófila. Além disso, é possível que, devido à excessiva hidratação, o mesmo aumente demasiadamente de tamanho, destruindo-se completamente (TAPIA et al., 2003).

A duração da antese é condicionada pela evolução das condições climáticas durante o período de floração. Invernos e primaveras com temperaturas moderadas geralmente propiciam o prolongamento do período de floração (BARRANCO; MILONA; RALLO, 1994).

A iniciação floral e o "*fruit set"* (frutificação efetiva) são segundo Fernández-Escobar e Rallo (1981) e Cordeiro e Martins (2002), os processos fisiológicos que mais influenciam a produtividade da oliveira.

Segundo Cordeiro e Martins (2002) o período de floração, que condiciona o *fruit set* está, de modo geral, dependente das variações climáticas e a sua caracterização é um fator de primordial importância, particularmente quando se pretendem cultivar variedades procedentes de outras regiões olivícolas.

O estudo em coleções de oliveiras, das características de interesse agronômico e tecnológico tem permitido conhecer a enorme variabilidade relativa ao crescimento vegetativo, à precocidade do início de produção, à fenologia, à maturação da azeitona, à data de colheita, à alternância das produções, o peso do fruto, à relação polpa/caroço e o rendimento em azeite (CABALLERO; EUGEREN, 1986; CIMATO et al. 1993; BARRANCO; MILONA; RALLO, 1994).

Com este trabalho objetivou-se determinar o período de floração de oliveiras 'Arbequina' e 'Koroneiki', nos anos de 2008 e 2009. Segundo Mariacchi *et al.* (1994), A ocorrência durante o período de floração de condições climatéricas desfavoráveis como: temperaturas extremas, precipitação, ventos fortes, etc, têm sido indicadas por diversos autores, como podendo afetar parcial ou totalmente a floração,fecundação e vingamento na oliveira.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações do período de floração foram realizadas em oliveiras das cultivares Arbequina e Koroneiki em dois anos consecutivos. As oliveiras utilizadas estavam com cinco e seis anos de idade, nos anos de 2008 e 2009 respectivamente, fazendo parte do pomar localizado no município de Bagé/RS (coordenadas geográficas 31° 19' 53"S; e 56° 06' 25"L).

Os dados meteorológicos do ano de 2008 e 2009, na região de Bagé/RS/Brasil, são apresentados.

Tabela 1. Médias mensais de temperaturas (máxima, mínima e média), de Maio a Novembro de 2008 e 2009, no município de Bagé/RS.

Meses	**Temp. Máxima (°C)**		**Temp. Mínima (°C)**		**Temp. Média (°C)**	
	2008	**2009**	**2008**	**2009**	**2008**	**2009**
Maio	13,42	16,69	12,26	15,28	12,84	15,99
Junho	11,29	11,31	10,21	10,03	10,75	10,67
Julho	12,27	10,05	11,57	8,76	11,92	9,41
Agosto	17,7	20,85	8,1	10,75	12,9	15,8
Setembro	17,3	18,89	8,9	10,58	13,1	14,74
Outubro	22,3	23,08	12,7	10,39	17,5	16,73
Novembro	27,6	26,22	15,5	17,32	21,5	21,77

Fonte: Inmet, 2008/2009.

Tabela 2. Médias mensais de precipitação e umidade relativa de Maio a Novembro de 2008 e 2009, no município de Bagé/RS.

Meses	Precipitação (mm)		Umidade Relativa (%)	
	2008	**2009**	**2008**	**2009**
Maio	92,8	136	65,26	75,42
Junho	181	42	82,5	80,15
Julho	104	53,6	71,94	76,47
Agosto	146,5	208,2	78,0	68,52
Setembro	94,3	248,9	79,1	71,03
Outubro	98,9	140	75,1	66,86
Novembro	121,9	350	69,0	77,19

Fonte: Inmet, 2008/2009.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo utilizados quatro repetições (planta) para cada cultivar. Em cada planta foram selecionados cerca de 200 rácimos florais por quadrante imaginário (Leste, Oeste, Norte e Sul), totalizando aproximadamente 800 rácimos/planta. Nos ramos e rácimos florais, identificou-se o estádio fenológico de cada estrutura vegetativa ou reprodutiva.

Para realizar-se o estudo do período de floração das cultivares de oliveira, utilizou-se a metodologia adaptada por Fernández-Escobar e Rallo (1981), na qual são definidos, resumidamente e ilustrados, os seguintes estádios fenológicos (Figura 1):

A- Repouso Invernal (dormente): a gema terminal e as axilares estão em dormência;

B- Começo da brotação: gemas terminais e axilares começam a engrossar;

C- Formação dos rácimos florais: Observam-se nos ramos, as diferentes ramificações e respectivos botões florais;

D- Inchamento dos botões florais: os botões ficam redondos e inchados e se dispõem num curto pedicelo; às brácteas da base se separam do eixo floral;

E- Diferenciação das corolas: é visível a separação do cálice e da corola, os pedicelos se alargam, separando os botões florais do eixo do rácimo;

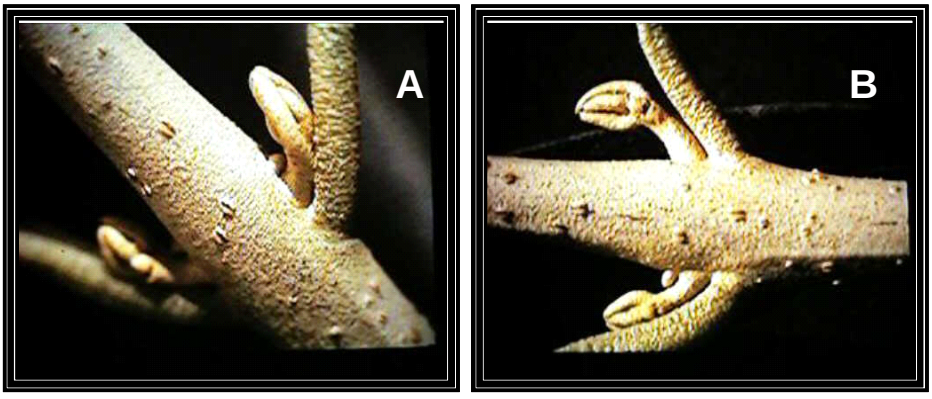
F- Início da floração: abrem-se as primeiras flores, enquanto a corola passa da cor verde para a cor branca;

F1- Plena floração: a maioria das flores encontram-se abertas;

G- Queda das pétalas: as pétalas se separam do cálice;

H- Formação dos frutos: aparecem os frutos jovens.

Os registros foram realizados seguindo a metodologia proposta por Fernández-Escobar e Rallo (1981), na qual as anotações foram realizadas num formato de triângulo onde, em cada data de observação, anotou-se no vértice inferior esquerdo o estádio fenológico mais atrasado; no vértice inferior direito o estado mais adiantado; e no vértice superior o estado dominante. No referido trabalho, as anotações foram realizadas, de modo geral, com intervalos de cinco dias, durante os meses de setembro a novembro (evolução das fases fenológicas). Na apresentação dos resultados utilizaram-se os conceitos propostos por Barranco; Milona e Rallo (1994): INÍCIO DE FLORAÇÃO, a data da primeira anotação do estado F no vértice inferior direito; INÍCIO DA PLENA FLORAÇÃO, a data da primeira anotação do estado F no vértice superior; FINAL DE PLENA FLORAÇÃO, a última data de anotação do estado F1 no vértice superior; FINAL DE FLORAÇÃO, a data da primeira anotação do estado G no vértice superior.



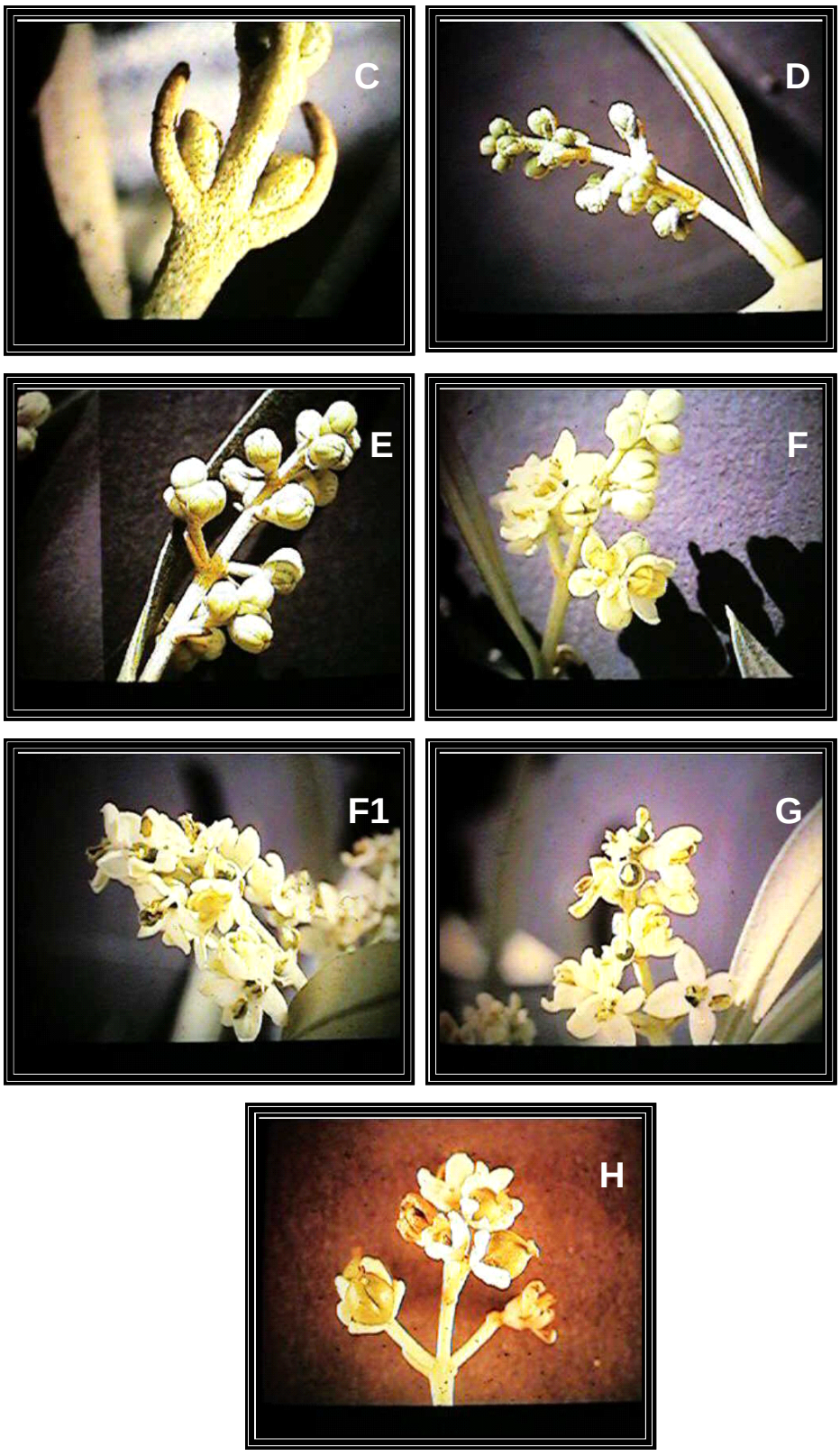


Figura 1. Fases fenológicas da oliveira. (Fonte: Juan José Jiménez Pérez).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a tabulação dos dados, verificou-se que nas cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, no ano de 2008, o início da floração ocorreu no dia 16 de outubro e o final no dia 11 de novembro. Em 2009, a floração teve início no dia 20 de outubro, para as duas variedades, e o final ocorreu no dia 09 de novembro. O período da floração nas duas variedades foi de 27 dias (16 de outubro a 11 de novembro), no ano de 2008, e de 21 dias (20 de outubro a nove de novembro), em 2009 (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Com base nos anos de avaliação evidenciou-se que há coincidência de floração entre as duas cultivares estudadas. Isto pode ter ocorrido devido às características genéticas da planta e em relação às condições climáticas favoráveis as duas. De acordo com Cordeiro e Miranda (2001), a variação no tempo de floração (início, plena e final) de oliveiras é influenciada diretamente por características genéticas e climáticas, sendo que a climática pode variar de ano para ano, provocando modificações consideráveis no calendário de floração, principalmente devido às inter-relações com a fisiologia de cada planta.

A variabilidade intra-anual é determinada pelas condições climáticas. Em 2008 a entrada em floração foi mais precoce e o período de floração foi maior em relação ao ano de 2008. Isto pode ter ocorrido devido às condições climáticas, sendo uma delas a precipitação a qual nesse ano foi superior ao ano de 2008 (Tabela 2).

Em observações do período de floração realizadas a cada cinco dias é difícil de precisar, com exatidão, a data da plena floração. Deste modo, supõe-se que a plena floração, nas duas cultivares, tenha ocorrido no ano de 2008, entre os dias 17 e 21 de outubro e no ano de 2009, entre os dias 21 e 27 de outubro.

Nas duas variedades e nos dois anos de avaliações, a fase que antecedeu a plena floração foi menor que a fase final de floração (Figuras 2 e 3). Resultados semelhantes também foram observados por Cordeiro e Martins (2002) em oliveiras Arbequina cultivadas na Região de Elvas/Portugal.

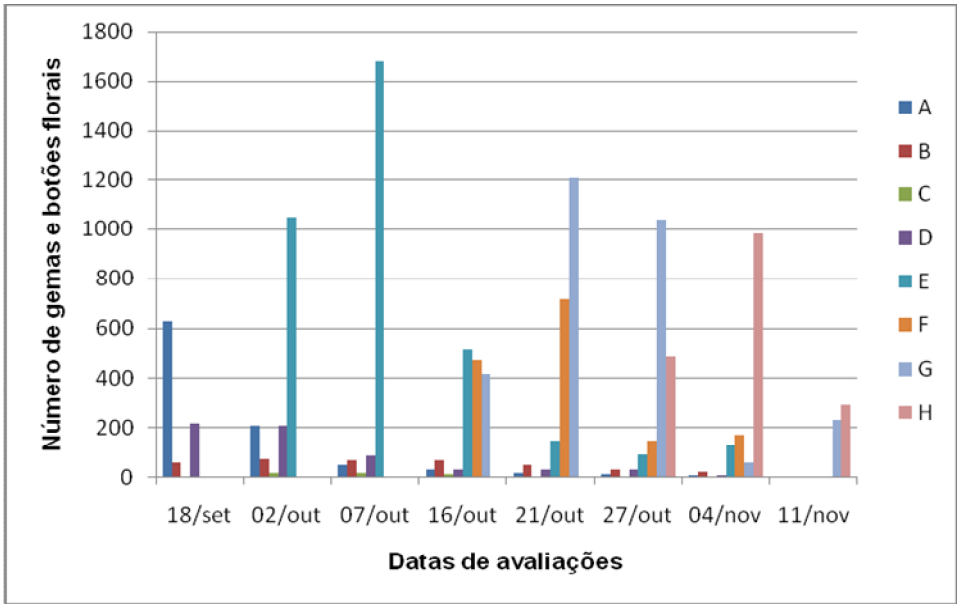


Figura 2. Épocas de floração de oliveiras cultivar Arbequina, com cinco anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2008. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

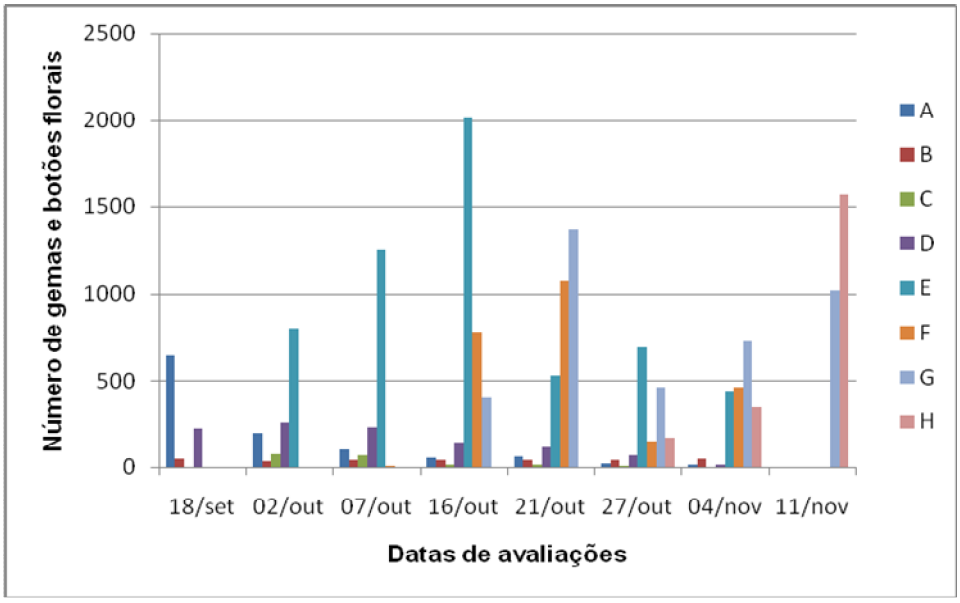


Figura 3. Épocas de floração de oliveiras cultivar Koroneiki, com cinco anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2008. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

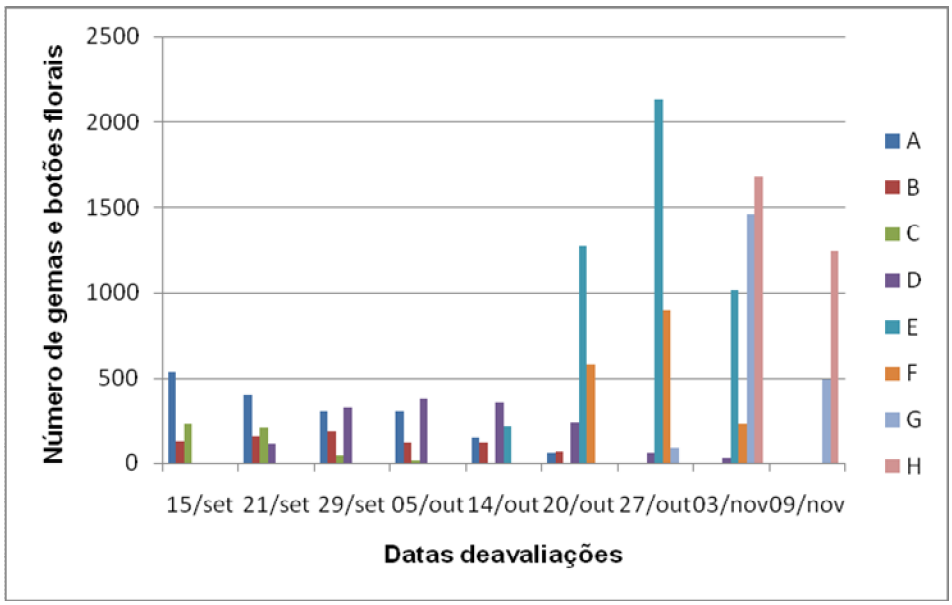


Figura 4. Épocas de floração de oliveiras cultivar Arbequina, com seis anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2009. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

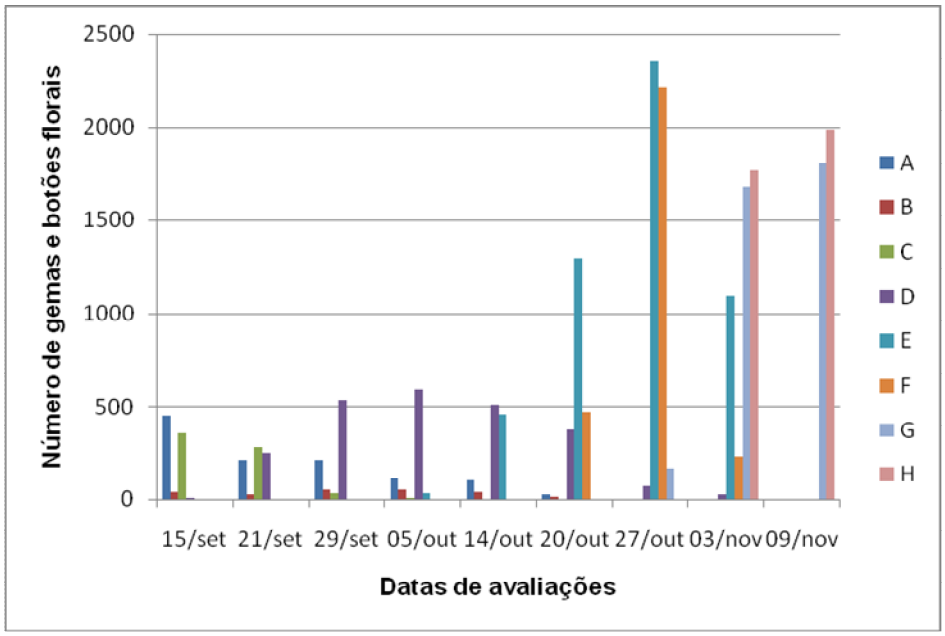


Figura 5. Épocas de floração de oliveiras cultivar Koroneiki, com seis anos de idade, no município de Bagé/RS, no período de setembro a novembro, no ano de 2009. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

Segundo Dal Pero Bertini (1960), oliveiras das mesmas cultivares, que crescem sob as mesmas condições ambientais, são condicionadas a florescer simultaneamente. Griggs et al., (1975) e Ghrisi et al., (1999) observaram que as datas e a duração da floração variam entre cultivares e entre anos.

Segundo Ferrara; Papa e Sorrenti (2002), as diferenças observadas nas épocas de floração entre regiões e anos evidenciam a influência climática, nomeadamente a variação térmica registrada no Inverno e na Primavera.

Lavee et al., (2002) estudando 36 cultivares de oliveira, durante 12 anos, observaram que a duração do período de floração relacionava-se, restritivamente, às condições climáticas.

Assim, embora o presente trabalho seja incipiente, evidencia a necessidade de se continuar realizando estudos, no Rio Grande do Sul, sobre a fenologia das cultivares estudadas, uma vez que as mesmas foram introduzidas da Espanha.

2.4 CONCLUSÃO

Segundo a metodologia utilizada, a floração das oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, em 2008 e 2009, teve início nos dias 16 e 20 de outubro e término nos dias 11 e 09 de novembro. O período de floração para as duas cultivares, nos anos de 2008 e 2009 foi idêntico, sendo 27 e 15 dias, respectivamente.

3 CAPÍTULO II – VIABILIDADE DO PÓLEN DE OLIVEIRAS CULTIVARES ARBEQUINA E KORONEIKI

3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil o plantio da oliveira tem crescido nos últimos anos, principalmente devido ao grande consumo e aos benefícios que os produtos oriundos da planta podem ocasionar a saúde.

A oliveira (*Olea europaea*), planta angiosperma dicotiledônea da família *oleaceae*, é uma espécie arbórea cultivada no sul da Europa (países mediterrâneos como Portugal, França, Grécia, Itália e Espanha), Norte da África, Américas do Sul e do Norte e alguns países da Ásia (ALBIN; VILAMIL, 2003).

Pesquisas com oliveira recentemente foram reiniciadas no Brasil e, por isso, a cultura ainda necessita de informações técnicas.

A polinização em oliveiras é anemófilo. O pólen pode depositar-se sobre estigmas de flores da mesma cultivar (autopolinização) ou de outra distinta (polinização cruzada). Porém, raramente o pólen de uma flor fecunda o ovário da mesma (GARCÍA, 2003).

Em oliveiras, as interações entre o tubo polínico e o estilete representam importante ponto de controle da fecundação. Ocorre a seleção de um só tubo polínico, fenômeno chamado seleção gamética, pela qual alguns gametas são preferidos em detrimento de outros, para a fecundação. Assim a auto-incompatibilidade, em oliveiras, se expressa pelo atraso do tubo polínico, da mesma cultivar, para atravessar o estigma (CUEVAS, 1992).

A polinização e a fecundação são requisitos essenciais para a formação e desenvolvimento dos frutos. Na oliveira, também se formam frutos sem a ocorrência da polinização (partenocárpicos). Estes frutos são menores que os frutos normais (oriundos de fecundação), não têm valor econômico e, em muitos casos, não permanecem na árvore até a colheita (RAPOPORT, 1998).

De acordo com González et al., (2001), a presença de flores com partes masculinas indica somente que estas têm apenas a finalidade de atuarem como doadores de pólen.

O conhecimento da fertilidade do pólen para qualquer espécie de planta é essencial para estudos de melhoramento genético (RIGAMOTO; TYAGI, 2002). A necessidade de avaliar a viabilidade do pólen usado na polinização artificial e em experimentos de melhoramento genético é muito importante (STONE; THOMSON; DENT-ACOSTA, 1995), assim como a compreensão dos problemas de esterilidade (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000).

Técnicas de microscopia permitem analisar características associadas à emissão dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento (KEARS; INOUYE, 1993).

Segundo Galletta (1983), um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos, tal equilíbrio pode ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou deficiência de qualquer desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen.

O método de germinação é considerado como um teste seguro, pois o pólen que germina é considerado fértil (ADHIKARI; CAMPBELL, 1998).

Pode-se agrupar os métodos de testar a viabilidade do pólen em quatro tipos: por meio de corantes; germinação *in vitro;* germinação *in vivo* e porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste (GALETTA, 1983).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em testes de viabilidade do pólen (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996). Entretanto, este método é influenciado por diferentes fatores. Existem diferenças entre espécies quanto às condições exigidas para a germinação do pólen, envolvendo, principalmente os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação. Além disso, a viabilidade do pólen também é influenciada pelo estádio de desenvolvimento da flor, quando da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (STANLEY; LINSKENS, 1974).

De acordo com Kelly; Rasch e Kalisz (2002) a viabilidade pode ser avaliada de várias maneiras, sendo uma forma comum de se testar a relação entre a produção de pólen e a viabilidade do mesmo, o método de coloração e contagem direta. Uma grande variedade de corantes tem sido utilizada para testar a viabilidade do pólen, mas poucos estudos verificaram o risco potencial destes corantes em corar pólen morto e produzir falso positivo.

Scorza e Sherman (1995) consideram que, para o pólen apresentar viabilidade, deve apresentar entre 50 e 80% de grãos germinados, com tubos polínicos desenvolvidos.

A eficiência germinativa do pólen de cultivares de oliveira é variável dependendo das áreas de cultivo e do meio artificial padrão (GRIGGS et al., 1975; TOMBESI, 1978).

Os principais componentes do meio de cultura para a germinação de pólen *in vitro* têm sido os tipos e concentrações de açúcares e distintas concentrações de boro (MIRANDA; CLEMENT, 1990). A sacarose empregada no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). A adição de ácido bórico no meio de cultura geralmente aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (AGULHON, 1910; GAUCH; DUGGER, 1953; VISSER, 1955).

Thompson e Batjer (1950) verificaram que a adição de boro ao meio aumentou significativamente a porcentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado.

Segundo Scorza e Sherman (1995), à medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Mesmo que a viabilidade do pólen diminua, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que os mesmos apresentam condições para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação. A manutenção da capacidade de germinação do pólen depende, tanto das características intrínsecas da espécie como das condições de armazenamento.

O sucesso da preservação do pólen, independentemente da duração do período de conservação, depende principalmente de fatores como a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento e do grau de umidade do pólen (GOMES et al., 2003). O emprego de baixas temperaturas normalmente é relacionado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade (PIO et al., 2007).

Pinney e Polito (1990) também documentam o efeito positivo da baixa umidade relativa (entre 23 e 33%) para conservar o pólen de oliveira durante um ano.

A conservação de polens a baixas temperaturas (abaixo de 0ºC) e baixa umidade relativa, tem resultado num meio adequado para diferentes espécies, dentre as quais a oliveira (PINNEY e POLITO, 1990).

Este trabalho teve como objetivos realizar estudos, em oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, sobre diferentes métodos de avaliação da viabilidade do pólen; determinar se a utilização de ácido bórico no meio de cultura influencia na germinação do pólen e avaliar a germinação do pólen armazenado durante 12 meses.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos, com diferentes objetivos, conduzidos na Embrapa Clima Temperado – CPACT, localizada na BR 392, Km 78, em Pelotas/RS. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Genético, nos anos de 2008 e 2009, durante o período de floração de oliveiras, ao qual ocorre no Rio Grande do Sul, dependendo da cultivar, entre os meses de setembro a novembro. Utilizaram-se duas cultivares de oliveiras (Arbequina e Koroneiki), com cinco e seis anos de idade, pertencentes a um olival localizado no município de Bagé/RS, plantadas em espaçamento de 6,0m x 3,0m (6,0m entre filas de plantio e 3,0m entre plantas, na fila de plantio) e conduzidas em sistema de vaso aberto. As metodologias usadas nos três experimentos foram similares, com pequenas variações, as quais são descritas a seguir. Estes experimentos utilizaram o teste de germinação *in vitro,* devido ao teste colorimétrico superestimar a viabilidade do pólen.

Coleta do pólen

Para a obtenção do pólen, flores em pré-antese foram coletadas, aleatoriamente, em todas as partes da planta. Em laboratório, destacaram-se as anteras com pinça, sendo as mesmas colocadas em bandejas de papel, em temperatura ambiente (19-21°C) durante 48 a 72 horas, quando ocorreu a deiscência e liberação do pólen.

Experimento 1: Métodos de avaliação da viabilidade do pólen.

Conduzido no ano de 2009, teve como objetivo realizar estudos sobre diferentes métodos de avaliação da viabilidade do pólen de oliveiras 'Arbequina' e 'Koroneiki'. Foram realizados os seguintes testes: teste colorimétrico, teste de germinação do pólen em meio de cultura e teste de germinação *in vivo*. Para a germinação *in vivo*, cada repetição foi constituída de cinco pistilos, onde foi avaliada além da germinação, a percentagem de crescimento no estilo, sempre em relação à localização do tubo polínico de maior crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3, (duas cultivares e três métodos). Foram utilizadas quatro repetições (quatro plantas), sendo as parcelas constituídas de contagens de 400 grãos de pólen (para os métodos colorimétrico e germinação *in vitro*). No teste de germinação *in vivo* também foram utilizadas quatro repetições, porém as parcelas constaram de cinco pistilos, sendo que cada pistilo continha número variável de grãos de pólen (entre 19 e 119 grãos de pólen).

A variável avaliada foi a viabilidade do pólen (expressa em porcentagem), a qual, para o teste colorimétrico, foi identificada, somente, pela coloração do pólen, enquanto que para os testes *in vitro* e *in vivo* foi caracterizada pela porcentagem de pólen germinado.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para análise estatística dos resultados, os dados originais, expressos em porcentagem, foram transformados em arc.seno da raiz quadrada de x/100.

Teste Colorimétrico

O teste colorimétrico consistiu na utilização de um corante para identificar o pólen viável.

Neste método, utilizou-se o tingimento do pólen com carmím acético (MEHRI; KAMOUN-MEHRI 1995). Este corante se obteve fervendo 45% de ácido acético e 55% de água destilada em presença de ferro metálico, durante 3 a 4 minutos.

O pólen foi colocado numa lâmina de microscopia, onde foi adicionada uma gota de corante. Posteriormente, a lâmina foi fechada com uma lamínula, onde realizou-se a contagem dos grãos de polens viáveis em microscópio de mesa com ocular e objetiva 10x10 com uso de um contador manual, até atingir 100 grãos de polens.

Em microscópio de mesa foram identificados dois tipos de grão de pólen:
- um tipo de pólen de coloração vermelha e forma arredondada;
- outro de menor tamanho e incolor.

Sendo o primeiro tipo de pólen identificado como grão de pólen viável. Ou seja, demonstra apenas que o pólen está vivo podendo ou não germinar.

Teste de Germinação do pólen *in vitro*

O teste de germinação de pólen em meio de cultura consistiu no preparo do meio, diluindo 15% de sacarose e 1% de ágar em 100ml de água destilada. O preparo do meio foi realizado num Erleymeier, dissolvendo-se o açúcar e o ágar na água e aquecendo-se em banho-maria.

Para os testes de germinação utilizou-se lâminas especiais com concavidade circular e com o auxílio de um conta gotas foram aplicadas quatro a cinco gotas de meio de cultura em cada concavidade.

Na observação realizada com lupa, utilizou-se um pincel onde o pólen foi aspergido nas lâminas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel absorvente umedecidas, simulando uma câmara úmida, e logo após foram levadas para incubar em estufa tipo B.O.D. adaptada, com temperatura controlada em torno de 24ºC, durante 48 horas.

A contagem dos grãos de pólen germinados e não germinados foi realizada em microscópio de mesa com ocular e objetiva 10x10, sendo considerados como germinados aqueles que apresentaram tubo polínico de

comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (VITI; BARTOLINI; VITAGLIANO, 1990). Os campos do microscópio foram observados ao acaso, registrando-se o número de grãos de polens germinados e não germinados num contador manual, até atingir 100 grãos de polens.

Germinação *in vivo*

No teste de germinação *in vivo*, coletou-se ramos com flores em estádio de balão, as quais foram levadas para laboratório e colocadas em frascos de vidro com água. Realizou-se, manualmente, a emasculação e a polinização das flores utilizando-se pólen da mesma cultivar. Após seis dias da polinização, os pistilos foram colocados em frascos de vidro com fixativo 1:1:8 (formol, ácido acético e álcool etílico), sendo colocados em câmara fria (5°C), até a avaliação.

No dia da avaliação, os pistilos fixados foram lavados três vezes em água destilada, deixando-se, posteriormente, por 17 horas em solução de 8N de NaOH, a qual tem por finalidade amolecer os tecidos. Após esse período, os pistilos foram lavados três vezes com água destilada e, então, colocadas numa solução de hipoclorito de sódio a 20%, durante 20 minutos. Posteriormente, lavou-se e colocou-se os mesmos numa solução de lacmoíde a 1% (finalidade de colorir os tecidos), durante três minutos. O material foi montado em lâmina mediante o maceramento e, em seguida, observado em microscópio de mesa com ocular e objetiva 10x10 (MARTIN, 1959).

Para a verificação do crescimento dos tubos polínicos no estigma foram observados cinco pistilos em cada repetição.

Experimento 2: Germinação in vitro de polens de oliveira em função da utilização do ácido bórico ao meio de cultura.

Conduzido no ano de 2009, teve como objetivo avaliar a influência do ácido bórico (H_3BO_3), adicionado ao meio de cultura, sobre a germinação do pólen de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 6, (duas cultivares e seis tratamentos). Utilizou-se quatro repetições, sendo as parcelas constituídas de contagens de 200 grãos de polens.

Os tratamentos para avaliar a germinação do pólen, em cada meio de cultura utilizado: T_o - 15% de sacarose + 1% de ágar, sendo este o meio padrão; T_1 - 15% de sacarose + 1% de ágar + 25mg.L^{-1} de ácido bórico; T_2 - 15% de sacarose + 1% de ágar + 50mg.L^{-1} de ácido bórico; T_3 - 15% de sacarose + 1% de ágar + 75mg.L^{-1} de ácido bórico; T_4 - 15% de sacarose + 1% de ágar + 100mg.L^{-1} de ácido bórico e T_5 - 15% de sacarose + 1% de ágar + 125mg.L^{-1} de ácido bórico para 100ml de água destilada.

Para testar a viabilidade do pólen, utilizou-se a metodologia do experimento 1 (teste de germinação do pólen *in vitro*). Esse método foi escolhido por ser mais rápido e não superestimar a germinação.

A variável avaliada foi porcentagem de pólen germinado.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para análise estatística dos resultados, as médias originais, expressas em percentagem, foram transformados em arcoseno da raiz quadrada de x/100.

Experimento 3: Viabilidade do pólen armazenado durante 12 meses.

Conduzido nos anos de 2008 e 2009, teve como objetivo comparar a viabilidade do pólen de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, armazenados durante 12 meses, sendo este experimento utilizado para futuros trabalhos na área de melhoramento genético.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, (duas cultivares e dois tratamentos). Foram utilizadas quatro repetições, sendo as parcelas constituídas de contagens de 400 grãos de pólen.

Os tratamentos constaram de pólen fresco (coletado e colocado para germinar após a deiscência das anteras) e armazenado durante 12 meses em dessecador com sílica-gel, colocado dentro de um freezer à temperatura de aproximadamente -16°C, e umidade (23 a 25%), constituindo-se, respectivamente, nos tratamentos T_1 e T_2. O meio utilizado para germinação do grão de pólen e a forma de avaliar foi a mesma utilizada no experimento 01 (germinação *in vitro*).

A variável avaliada foi porcentagem de pólen germinado.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (p≤0,05). Para análise estatística dos resultados, as médias originais, expressas em percentagem, foram transformados em arcoseno da raiz quadrada de x/100.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1:

Independentemente da cultivar, o método do corante usando carmin propiônico foi o que apresentou, significativamente, maior porcentagem de polens viáveis (73,97%). Os demais métodos não diferem estatisticamente entre si (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de grãos de polens viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki” através dos métodos colorimétrico, in vitro e in vivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

Métodos	Viabilidade do pólen (%)
In vitro	33,19 b
Colorimétrico	73,97 a
In vivo	36,65 b
CV (%)	14,36

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O método colorimétrico apresentou maior viabilidade do grão de pólen em relação aos demais métodos testados, porém esse superestima a porcentagem de polens viáveis, pois o mesmo pode corar falsos positivos. Os métodos em que se utilizam corantes apresentam vantagens quanto à rapidez e facilidade em relação à germinação de pólen *in vitro*, embora superestimem a viabilidade, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença de enzimas, amido, ou outras substâncias (SOARES et al. 2008).

Segundo Galetta (1983), o método do corante superestima a porcentagem de viabilidade do pólen, enquanto que o teste *in vitro* a subestima.

Os resultados dos métodos utilizados para testar a viabilidade de pólen de oliveiras foram semelhantes aos observados por Loussert e Brouse (1980b), que obtiveram germinação de pólen sempre acima de 25%, em teste *in vitro*, em diferentes clones de oliveira. Porém, são superiores aos verificados por Boulouha; Tahenn e Benchaabane (1995), que observaram porcentagens de germinação, em cinco clones de oliveira, e verificaram variações entre 18 e 33%.

Einhardt; Correa e Raseira (2006), comparando métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro, observaram que o teste do corante superestima a germinação, enquanto que os testes *in vitro* e *in vivo* não diferiram entre si. Esse fato também foi observado em oliveiras no presente trabalho.

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em ensaios de viabilidade do pólen em programas de melhoramento genético. Entretanto, é influenciado por diferentes fatores, incluindo os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação dos grãos de pólen (FRAZON; RASEIRA, 2006).

Em alguns trabalhos, pesquisadores relatam a ocorrência de diferenças de viabilidade de pólen entre diferentes plantas da mesma variedade ou entre diferentes épocas de coleta, porém descrevem que a maior variação ocorre entre os diferentes genótipos (LOGUERCIO; BATTISTIN, 2004). No entanto, como foi relatado anteriormente neste trabalho, o fator cultivar não influenciou significativamente na germinação do pólen de oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”.

Para o teste de germinação de pólen *in vivo*, apenas foi possível fazer a contagem de polens viáveis (germinados) no estigma, uma vez que não ocorreu o desenvolvimento do tubo polínico no estilete dos pistilos testados. Quando ocorre a fecundação, o pólen germinado forma o tubo polínico, o qual cresce através do estilete, penetra no saco embrionário através da micrópila e nucela e fertiliza o óvulo. Desta forma, ocorre a transferência dos gametas e a fusão, formando o ovo ou zigoto (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

O não desenvolvimento do tubo polínico até o ovário, observado neste trabalho, pode ter ocorrido devido ao período no qual o pistilo ficou polinizado. Segundo Bartolini e Guerriero (1995), consideram como 13 dias o período de polinização manual para várias cultivares de oliveira, pois com o referido período ocorreu a polinização e foi possível observar o alongamento do tubo polínico até o ovário. Talvez tenha sido o período do pistilo polinizado manualmente (seis dias

neste trabalho) uma das causas da impossibilidade de se observar o desenvolvimento do tubo polínico em pistilos de oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”.

Nas Figuras 6 e 7 polens germinados de oliveiras Arbequina e Koroneiki nos testes germinação *in vitro* e *in vivo*.

Figura 6. Grãos de polens germinados e não germinados (método *in vitro*). Embrapa Clima Temperado, 2010.

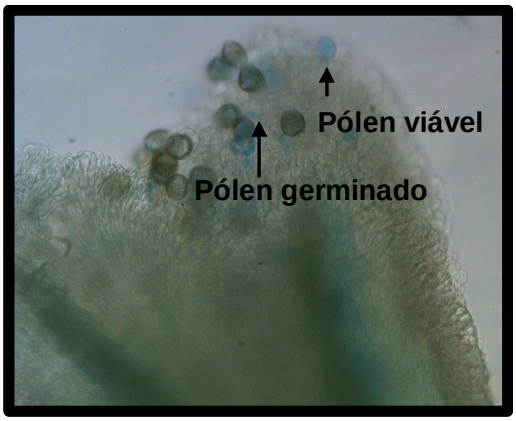


Figura 7. Polens viáveis, germinados no estigma da flor de oliveira (método *in vivo*). Embrapa Clima Temperado, 2010.

Experimento 2:

Na avaliação da viabilidade do pólen de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, não houve interação significativa entre os fatores cultivar e tratamentos (meios de

cultura). O meio de cultura adicionado de ácido bórico não influenciou sobre a germinação do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki.

Independentemente do meio de cultura utilizado, a cultivar Arbequina apresentou maior percentual de germinação de polens (37,12%) (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagens de germinação de polens de oliveiras 'Arbequina' e 'Koroneiki', independentemente do tratamento com ácido bórico. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

Cultivar	Polens germinados (%)
Arbequina	37,12a
Koroneiki	28,95 b
CV(%)	10,15

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Os tratamentos realizados com o acréscimo de ácido bórico ao meio de cultura não apresentaram diferença na germinação do grão de pólen em relação ao meio padrão. Isto pode ter ocorrido devido às concentrações utilizadas serem baixas para proporcionarem aumento significativo na germinação do pólen das cultivares testada. Pinney e Polito (1990) observaram que a utilização de 50 e 100mg. L^{-1} de ácido bórico e cloreto de cálcio (1mM), ao meio de cultura, proporcionou pequenos acréscimos na germinação do pólen de oliveira, porém sem significância.

A cultivar Arbequina apresentou maior germinação, fator este que pode ter ocorrido devido a características intrínsecas da cultivar.

Dantas et al. (2005), verificaram que diferentes concentrações de boro utilizadas no meio de cultura não aumentaram significativamente a germinação de pólen de macieira. Frazon e Raseira (2006) verificaram que a adição de boro ao meio de cultura não influenciou, significativamente, no percentual de germinação de pólen de guabirobeira. Contrariamente, Viti; Bartolini e Vitagliano (1990) e Bartolini; Viti e Vitagliano (1993) observaram que a adição de ácido bórico, ao meio de cultura, aumentou a germinação do pólen de oliveiras.

Portanto, para se obter resultados mais conclusivos, sugere-se que novos trabalhos sobre testes de germinação de pólen de oliveiras, utilizando-se

concentrações de boro superiores as testadas ao meio de cultura, sejam realizados.

Experimento 3:

Na avaliação da viabilidade do pólen de oliveiras das cultivares Arbequina e Koroneiki, não observou-se interação significativa entre os fatores cultivar e tempo de armazenamento.

Independentemente do tempo de armazenamento do pólen, a cultivar Arbequina apresentou maior percentual de germinação do que a cultivar Koroneiki (30,10% e 26,77%, respectivamente) (Tabela 5).

Em relação ao tempo de armazenamento, indiferentemente da cultivar, os polens perderam a viabilidade com o transcorrer do tempo, ou seja, polens de oliveira armazenados durante 12 meses apresentaram menor percentual de germinação (Tabela 6).

Tabela 5. Porcentagem de germinação de polens de oliveiras em função dos fatores cultivar (‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’) e tempo de armazenamento (Pólen fresco e armazenado por 12 meses), independentemente. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2010.

Cultivar	Germinação (%)
Arbequina	30,10a
Koroneiki	26,77 b
Tempo Armazenamento	
Pólen fresco	33,32a
Pólen armazenado por 12 meses	23,76 b
CV(%)	5,29

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

A conservação do pólen das cultivares estudadas perdeu a viabilidade com o tempo, isto pode ter ocorrido devido às condições de armazenamento (temperatura e umidade). Assim, supõe-se que a viabilidade do pólen poderia ter sido mantida, caso tivesse diminuído a umidade relativa e a temperatura. Pois, segundo Barnabás e Kovács (1997) o efeito da redução da temperatura e da

umidade relativa para conservação do pólen tem sido relatado para numerosas espécies frutíferas, sendo que em trabalhos com oliveiras, conservando-se o pólen a 4°C e umidade relativa baixa, pode-se manter a viabilidade do pólen.

Oliveira et al. (2001), enfatizam que a diminuição na porcentagem de polens viáveis pode estar relacionada a vários fatores, tais como as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen e a manipulação dos recipientes.

A cultivar Arbequina apresentou maior germinação, fator este que pode ter ocorrido devido a características intrínsecas da cultivar.

Segundo Pinillos e Cuevas (2003), verificaram que a conservação do pólen de oliveira cultivar Picual é possível a longo prazo e os resultados são melhores quanto menor for a temperatura de armazenamento De outra forma, são corroborados pelos resultados obtidos por Pinney e Polito (1990) ao observarem que polens de oliveiras armazenados com umidade abaixo de 28% e acima de 33%, durante um ano, apresentaram redução na germinação e armazenados com umidade a 84%, durante seis meses, perderam totalmente a capacidade de germinar.

Assim, sugere-se que em novos trabalhos sobre viabilidade do pólen de oliveiras, em função do tempo de armazenamento, sejam testados com fatores de temperatura e umidade relativa.

3.3 CONCLUSÕES

O método colorimétrico superestima o percentual de polens viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”.

O uso de ácido bórico no meio de cultura não influencia na germinação *in vitro* de pólen de cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki.

Polens de oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki”, armazenados a -16°C em dessecador com sílica-gel, durante 12 meses, diminuem a porcentagem de viabilidade de ambas as cultivares.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos últimos anos o cultivo comercial de oliveiras tem sido ampliado, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Porém, informações técnicas sobre a adaptabilidade de cultivares à diferentes condições de clima e solo, principalmente no que se refere aos estudos da fenologia/biologia floral, polinização e fecundação, são praticamente inexistentes. Assim, os resultados obtidos neste trabalho poderão servir de subsídios para futuras pesquisas na área de melhoramento, fitotecnia e fisiologia.

Além do mais, os resultados aqui apresentados evidenciam que é possível a exploração comercial das referidas cultivares nas regiões de clima temperado, uma vez que observou-se o florescimento e a presença de pólen viável para produção de frutos. Logicamente que outros fatores devem ser considerados, tais como manejo das plantas (adubação, poda, tratamentos fitossanitários, etc.)

Por fim, após a avaliação crítica do trabalho, realizamos algumas sugestões:

- Aumentar a concentração de ácido bórico no meio de cultura, em trabalhos que visam melhorar a germinação do pólen;
- Em testes de conservação do pólen, utilizar diferentes temperaturas e umidade;
- Continuar realizando estudos sobre fenologia/biologia floral, porém com a ampliação do número de cultivares e locais de plantio (unidades de observação).
- Nas cultivares Arbequina e Koroneiki, realizar análises morfológicas do pólen e testes de polinização e fecundação, em plantas cultivadas em diferentes condições de clima e solo do Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K. N.; CAMPBELL, C. G. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. **Euphytica**, Netherlands v.102, n°1, p. 87-92, 1998.

AGULHON, H. EmploIdu bore comme angrais calalytique. **Compt. Rend. Acad.Sci**., Paris, v.150, p.288-291, 1910.

ALBIN A.; VILLAMIL J. **Aceite de oliva:** tradicional sabor mediterráneo, rejuvenecido en tierras Uruguayas. Montevideo: Editora de Vecho, p. 25-28, 2003.

ALBIÑANA, L. I. Guía completa del cultivo del olivo. Barcelona: Editorial de Vecchi, 2002. 126 p.

ATEYYEH A. F.; STOSSER R.; QRUNFLEH M. Reproductive biology of the olive (*Olea europaea* L.) Cultivar 'Nabali Baladi'. **Journal of Applied Botany**, Berlin, v. 74, p. 255-270, 2000.

AWAN, A. A. et al. Response of olive hard wood cuttings to different growth media and basal injuries for propagation. **Asian Journal of Plant Sciences**, Pakistan, v. 2, n°12, p. 883-886, 2003.

BARD, S. A.; HARTMANN, H. T. Effect of diurnal fluctuating ws. Constant temperatures on flower induction and sex expression in olive (*Olea europaea*). **Physiology Plant**, Belmont, v. 24, p. 40-45, 1971.

BARNABÁS, B. Y. G. KOVÁCS G. **Storage of pollen.** En: Pollen Biotechonology for crop production and improvement. (Eds. Shivanna y Sawhney) Cambridge Univ. Press., 1997, 449p.

BARRANCO, D.; MILONA, G.; RALLO, L. Épocas de floración de cultivares de olivo en Córdoba. **Investigación Agrária**: Prodroducción y Protección Vegetales, Córdoba, v. 9, n°2, p. 213-220, 1994.

BARTOLINI, S.; GUERRIERO, R. Self-compatibility in several clones of oil olive cv. 'Leccino'. **Advances Horticultural Science**, Italy, v. 9, p. 71-74, 1995.

BARTOLINI, S.; VITI, R.; VITAGLIANO, C. Effects of differents grownt regulators on fruit-set in olive. In: VII International Symposium on Plant Growth Regulators in Fruit Production, 1993, Jerusalem. **Acta Horticulturae**, Jerusalem, v. 329, p. 246-248, 1993.

BOULOUHA, B.; TAHENN R. N.; BENCHAABANE, A. Estudio de las características de la biología floral en los clones seleccionados de la variedad población 'Picholine Marroquí'. **Olivae**, Madrid, v. 58, p. 48-53, 1995.

CABALLERO, J.; EUGEREN, J. Agronomic characteristics of a World Collection of Olive Cultivars. **Olea**, Córdoba, v. 17, p. 77-83, 1986.

CIMATO, A. et al. Il germoplasma dell' olivo in Toscana. **Instituto Propagazione Specie Legnose**, Roma, p. 257, 1993.

CIVANTOS, L. La Olivicultura en el Mundo y en Espana. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Orgs.). **El ultivo del olivo**. 5º edición. Madrid: Mundi-Prensa, 2004,17-36p.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Catálogo mundial de variedades de olivo**. Madrid: L. R. Cuéllar, 2000, 360p.

CORDEIRO, A. M.; MARTINS, P. Épocas de floração de variedades de oliveira na região de Elvas. **Melhoramento**, Elvas, v. 38, p. 205-214, 2002.

CORDEIRO, A. M.; MIRANDA, A. Épocas de floração de cultivares de oliveira "*Olea europaea* L." em Elvas. Resultados do biénio 1998/99. **Revista de Ciências Agrárias**, Elvas, v. XXIV, n° 1 e 2, p. 38-42, 2001.

COUTINHO, E. F. A cultura da oliveira. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 143 p.

CUEVAS, J. **Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y frutificación de cultivares de olivo (*Olea euroapea* L.)**. Tesis (Doctoral)-Faculdad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Córdoba, 1992, 132p.

DAL PERO BERTINI G.V. **Olive growing and processing**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Melbourne, 1960, 293p.

DANTAS, A. C. M. et al. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*malus* spp.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n°3, p. 356-359, 2005.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

EPAMIG. **Pesquisa da EPAMIG garante produção de azeitonas**. 2007. Documento em PDF disponíel em: <http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=63&Itemi d=64>. Acesso em 29 de agosto de 2008.

FATTA DEL BOSCO, G.; DE MICHELE, A. **Risultati di alcune ricerche sul fabbisogno in freddo dell'olivo**. Tecnica agricola, anno XXII, Palermo, n°. 6, p. 570-576, 1970.

FERNÁNDES-ESCOBAR, R.; RALLO, L. Influencia de la polinización cruzada en el cuajado de frutos de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). **ITEA**, Amsterdam, n° 45, p. 51-58, 1981.

FERRARA, E.; PAPA, G.; SORRENTI, M. **Ricerche su 20 cultivar di olivo in Puglia: aspetti fenologici**. In: Convegno Internazionale di Olivicoltura. Spoleto, p. 396-399, 2002.

FRAZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1 p. 18-20, 2006.

GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdne Universitz Press, p. 23-47, 1983.

GARCÍA, A. G. **Nueva olivicultura**. Madrid: Mundi-prensa, 2003, 304p.

GAUCH, H. G.; W.M. DUGGER, Jr. The role of boron in the translocation of sucrose. **Plant Physiology**, Belmont, v.28, p.457-466, 1953.

GHRISI N. et al. Evolución agro-físiológica del fenómeno de la compatibilidad polínica en el olivo: colección mediterránea de la Estación de Menar (Marraquech). **Olivae**, Madrid, n° 79, p. 51-59, 1999.

GONZÁLEZ, J. C. et al. Respuesta a la polinización cruzada y elección de polinizadores en los cultivares de olivo (Olea europaea L.) "Manzanilla de Sevilla", "Hojiblanca" y "Picual". **Olivae**, Madrid, n°. 85, p. 26-32, 2001.

GOMES, R. P. **A Olivicultura no Brasil**. 2ª edição. São Paulo: Nobel 1979, 237p.

GOMES, P. R. et al. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, nº 1, p.14-17, 2003.

GRIGGS W. H, et al. **Olive pollination in California**. Division of Agricultural Sciences, University of California, California, 1975, 50p.

HACKETT, W. P.; HARTMANN, H. T. The influence of temperature on floral initiation in the olive. **Physiology Plant**, Belmonte, v. 20, p. 430-436, 1967.

HARTMANN H. T.; OPITZ K. W. **Olive production in Callifornia**. Division of Agricultural Sciences, University of California. California, U.S.A., 1966, 64p.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993, 579p.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 89, n° 6, p. 1021-1023, 2002.

LAVEE, S. et al. The significance of cross-pollination for various olive cultivars under irrigated intensive growing conditions. **Olivae**, Madrid, n°. 91, p. 25-36, 2002.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de Syzygium Cumini (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro**., Uruguaiana, v. 11, nº 1. p. 192-205, 2004.

LOUSSERT, R.; BROUSSE, G. **El olivo**. Madrid: Mundi-Prensa, 1980a, 530p.

LOUSSERT, R.; BROUSSE, G. El olivo. Ed. Mundi Prensa. Madrid. 530p. Mehri, H. and Kanoun-Mehri, R. 1995. Biología floral del olivo: problema de la autoincompatibilidad en la variedad ‘Meski’ y búsqueda de polinizadores. **Olivae**, Madrid, n°. 55, p. 35-39, 1980b.

MARACCHI, G.; PILLALIS, F.; EINDI, M. & SILLARI, E. La production de l’olivier et les facteurs météorologiques. Étude préliminaire. **Olivae***,* Madrid*,* n° 52, p. 30-37, 1994.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n°67, p.101-104, 1996.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain technology**, Geneva, v. 34, n°3, p. 125-128, 1959.

MEHRI, H.; KANOUN-MEHRI, R. Biología floral del olivo: problema de La autoincompatibilidad en la variedad 'Meski' y búsqueda de polinizadores. **Olivae**, Madrid, n°55, p. 35-39, 1995.

MILELLA, A.; DEIDDA, P. Le esigenze in freddo dell'olivo: relazioni tra caratteristiche termiche invernali e cascola preantesi delle gemme, aborto dell'ovario ed allegagione. **Studi Sassaresi**, Sassari, v. 16, p. 386-405, 1968.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DE DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PESCAS. **Olivicultura, Diagnóstico Setorial**. Portugal, 2007.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storange of pejibaye (*Bactris gasipaes),* palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 38, n°1, p. 29-33, 1990.

OLIVEIRA, A. F.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da oliveira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n°231, p. 13- 17, mar./abr. 2006.

OLIVEIRA A. F.; PÁDUA J. G.; MATOS L. E. S. **Cultura da oliveira (*Olea europaea* L.).** Belo Horizonte: EPAMIG, 2002, 6p. (EPAMIG. Circular técnica, 150).

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v. 15, n°1, p. 63-67, 2001.

PINILLOS, V.; CUEVAS, J. Conservación de polen de olivo a largo plazo. Test *in vitro* e *in vivo.* **Actas de Horticultura**. X Congresso Nacional de Ciências Hortícolas, Pontevedra, nº 39, 2003

PINNEY, K.; POLITO, V. S. Olive pollen storage and in vitro germination. Acta Horticulturae. In: International Symposium on olive Growing, 1990, Córdoba. **Proceedeings of the International Symposium on olive Growing**. Córdoba: Acta Horticulturae, v. 286, p. 207-210, 1990.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n°1, p. 147-153, 2007.

RALLO, L. **Frutificación y produción**. En: D. Barranco et al. (ed.). El cultivo del olivo. Mundi-prensa, Junta de Andalúcia, Espana, 1998, 117-144 p.

RALLO, L.; MARTIN, G. C. The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**., Alexandria, v. 116, n°6, p. 1058-1062, 1991.

RAPOPORT, H. F. **Botanica y morfología**. En: D. Barranco et al. (ed.). El cultivo del olivo. Mundi-prensa, Junta de Andalúcia, Espana. 1998, 37-60 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** New York, 2001, 920p.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P.. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal of Natural Science**., Fiji Islands, v. 20, p. 30 – 33, 2002

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A. New procedure to asses pollen viability. **Sex Plant Reprod**., Berlin, v.12, p. 241–244, 2000.

ROMERO M. A.; GUTIÉRREZ J. M. A. **Un cultivo ecológico del olivo**. Las Gabias, 2002, 143 p.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit brecding**. New York: John e Sons, p. 325-440, 1995.

SOARES et al. Germinação in vitro e viabilidade de grãos de pólen em diferentes acessos de abacaxi ornamental. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Vitória/ES **Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Vitória: Incaper, 2008. 1CD.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen:** biology, biochemistry, management. New York: Springer Verlag Berlim Heidelberg, 1974, 307p.

STONE J. L.; THOMSON J. D.; DENT-ACOSTA S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, p.1186–1197, 1995.

TAPIA, F. C.; ASTORGA, M. P.; IBACACHE, A. G.; MARTÍNEZ, L. B.; SIERRA C. B.; QUIROZ, C. E.; LARRAÍN, P. S.; RIVEROS, F. B. **Manual del cultivo del olivo**. La Serena, Chile, 2003. 128 p.

THOMPSON, A.H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.56, p.227-230, 1950.

TOMBESI, A. **La fertilita 'nell' Olivo. Atti "Fertilita' delle piante da frutto**,**"** Bologna, v. 15 n°12, p. 435-450, 1978.

VERNET, J. L. **Man and vegetation in the Mediterranean area during the last 2000 years**. En: F. di Castro, A. J. Hansen and M. Debusche. (Eds). Kluwer Ac. Press. Dodrecht. Netherlands, 1990.

VISSER, T. Germination and storage pollen. **Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Waganingen**, Nederland, n.55, v1, p.1-68, 1955.

VITI, R.; BARTOLINI, S.; VITAGLIANO, C. Growth regulators on pollen germination in olive. In: International Symposium on olive Growing, 1990, Córdoba. **Proceedeings of the International Symposium on olive Growing**. Córdoba: Acta Horticulturae, v. 286, p. 227-230, 1990.

Apêndices

APÊNDICE A. Análise da variância da porcentagem de grãos de polens germinados/viáveis em oliveiras “Arbequina” e “Koroneiki” através dos métodos colorimétrico, in vitro e in vivo (Experimento 1).

Causas da variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Valor F.	Prob. > F
Cultivar	1	55,8607100	55,8607100	1,1796	0,29194
Métodos	2	8178,5657314	4089,2828657	86,3527	0,00001
Culivar*Método	2	95,1833446	47,5916723	1,0050	0,38752
Resíduo	18	852,4004758	47,3555820		
Total	23	9182,0102618			

APÊNDICE B. Análise da variância da percentagem de grãos de polens viáveis de oliveiras ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, independentemente do tratamento utilizado (Experimento 2).

Causas da variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Valor F.	Prob. > F
Cultivar	1	801,4013827	801,4013827	71,3065	0,00001
Meio de cultura	5	47,0695571	9,4139114	0,8373	0,53317
Culivar*Meio	5	25,9961267	5,1992253	0,4626	0,80278
Resíduo	36	404,5974859	11,2388191		
Total	47	1279,0645523			

APÊNDICE C. Análise da variância para percentagem de germinação de polens de oliveiras Arbequina e Koroneiki em função do tempo de armazenamento (pólen fresco e conservado durante 12 meses).

Causas da variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Valor F.	Prob. > F
Cultivar	1	17,8766207	17,8766207	6,1579	0,02754
Tempo de Armazenamento	1	148,0443346	148,0443346	50,9966	0,00006
Culivar*Armaz.	1	0,9279972	0,9279972	0,3197	0,58779
Resíduo	12	34,8363140	2,9030262		
Total	15	201,6852665			

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C247p Cappellaro, Thaís Helena

Período de floração e viabilidade do pólen das cultivares de oliveira Arbequina e Koroneiki, em Bagé/RS / Thaís Helena Cappellaro ; orientador Enilton Fick Coutinho- Pelotas,2010.-58f. ; il..- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Olea europaea 2.Fenologia 3.Germinação de pólen 4.Meio de cultura 5.Armazenamento de pólen I.Coutinho, Enilton Fick(orientador) II .Título.

CDD 634.63