

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

**ESTUDO DAS CAUSAS DA BAIXA PRODUTIVIDADE DE OLIVEIRAS NO RIO
GRANDE DO SUL: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS RELACIONADOS
AO SISTEMA REPRODUTIVO**

Andrés Eloy Chacón Ortiz

Pelotas, 2023

Andrés Eloy Chacón Ortiz

**ESTUDO DAS CAUSAS DA BAIXA PRODUTIVIDADE DE OLIVEIRAS NO RIO
GRANDE DO SUL: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS RELACIONADOS
AO SISTEMA REPRODUTIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Dra. Camila Pegoraro
Co-orientadores: Dr. Antonio Costa de Oliveira
Dr. Luciano Carlos Da Maia
Dr. Carlos Busanello

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O77e Ortiz, Andrés Eloy Chacón

Estudo das causas da baixa produtividade de oliveiras no Rio Grande do Sul : aspectos morfológicos e genéticos relacionados ao sistema reprodutivo / Andrés Eloy Chacón Ortiz ; Camila Pegoraro, orientadora ; Antonio Costa de Oliveira, Luciano Carlos Da Maia, coorientadores. — Pelotas, 2023.

157 f. : il.

Tese (Doutorado) — Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. *Olea europaea* L.. 2. Pólen e pistilos. 3. Herdabilidade. 4. Identificação de cultivares. 5. Armazenamento de pólen. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Oliveira, Antonio Costa de, coorient. III. Maia, Luciano Carlos Da, coorient. IV. Título.

CDD : 634.63

Andrés Eloy Chacón Ortiz

**ESTUDO DAS CAUSAS DA BAIXA PRODUTIVIDADE DE OLIVEIRAS NO RIO
GRANDE DO SUL: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS RELACIONADOS
AO SISTEMA REPRODUTIVO**

Tese APROVADA, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2023

Banca examinadora:

Prof. Dra. Camila Pegoraro (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Taciane Finatto
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Viviane Kopp da Luz
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Gustavo Heiden
Doutor em Botânica pela Universidade de São Paulo.

**Dedico este trabalho aos meus pais no céu e
aos meus filhos.**

Agradecimentos

A Deus no primeiro lugar, por ter me concedido o privilégio de construir uma família maravilhosa e poder realizar este grande desafio.

A Ninmar, grande incentivadora e coluna de apoio nos momentos mais difíceis para que eu não desistisse dos meus sonhos.

Aos meus queridos filhos Santiago (tiago) e Sebastián (tian), pelo carinho, amor incondicional e incentivo que me fazem cada dia continuar sempre.

Aos meus pais que, desde o céu estão me cuidando e ajudando todos os dias.

A minha orientadora e amiga Camila Pegoraro, sempre estarei agradecido por suas dicas e paciência para mim nesta caminhada.

Ao Prof. Antonio Costa de Oliveira, pessoa sábia com um grande coração, minha eterna gratidão.

Aos meus professores, colegas e amigos do programa, Carlos Bussanello, Eduardo Venske, Viviane Kopp, Victoria de Oliveira, Josiane Oliveira, Diana Fernandez, Luis Chairez, Joseph Raymond, Winder Felipez, que de uma ou outro jeito estiveram aí para me apoiar e ajudar.

Ao prof. Luciano Da Maia, pessoa legal, amigo que transcende barreiras e que, apesar das suas múltiplas ocupações, sempre tem tempo para quem precisa de alguma dica acadêmica ou de uma palavra de encorajamento.

Aos meus amigos antigos e os novos feitos neste maravilhoso país, que têm se convertido numa segunda família para mim.

Para vocês, muito obrigado.

“...respeito às relações sexuais das flores, Linnaeus há muito as dividia em espécies hermafroditas, monóicas, dióicas e polígamas. Essa distinção fundamental, com a ajuda de várias subdivisões em cada uma das quatro classes, servirá ao meu propósito; mas a classificação é artificial, e os grupos frequentemente se misturam.”

***DARWIN, 1877. The different forms of flowers on plants
of the same species***

Resumo

CHACÓN-ORTIZ, Andrés Eloy. **Estudo das causas da baixa produtividade de oliveiras no Rio Grande do Sul: aspectos morfológicos e genéticos relacionados ao sistema reprodutivo.** 158f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A oliveira possui uma grande variedade de cultivares no mundo, cuja identificação tem sido um problema. Estudos genéticos sobre a herdabilidade de caracteres agrônômicos são escassos. Adicionalmente, há pouca informação em relação ao armazenamento e viabilidade do pólen da espécie. A falta de informação impede os avanços do melhoramento genético. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi gerar informações científicas acerca do sistema reprodutivo; da herdabilidade em sentido amplo de caracteres relacionados aos frutos e do óleo; e da viabilidade do pólen após armazenamento. Neste trabalho, foram utilizadas as cultivares 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual' cultivadas no Sul do Brasil. Foram analisados caracteres ultraestruturais de pólen e de pistilo, podendo ser usados para discriminação de cultivares nas condições locais do Sul do País. Os resultados mostraram que, as medidas dos caracteres micromorfológicos dos grãos de pólen e dos pistilos são notavelmente similares dentro de cada cultivar, mas apresentaram diferenças significativas ao comparar as diferentes cultivares, podendo contribuir para o estabelecimento de estudos de classificação de cultivares de oliveiras. Um segundo estudo foi realizado a fim de observar a herdabilidade em sentido amplo (H^2) de caracteres de frutos dessas mesmas cultivares, na mesma região brasileira. A partir dos resultados, observou-se que algumas cultivares como 'Koroneiki' e 'Picual' tiveram seus caracteres controlados principalmente pelo genótipo, enquanto 'Arbequina' foi mais influenciada pelo ambiente. No terceiro estudo foi analisada a viabilidade do pólen sob armazenamento de longo prazo, testando diferentes temperaturas, assim como o uso de glicerina como meio de proteção contra danos ocasionados pelo frio, nas cultivares 'Arbequina' e 'Koroneiki'. Os resultados mostraram condições adequadas para o armazenamento durante 82 dias a -80°C , atingindo o limite mínimo de 30% de germinação, podendo ser usado para cruzamentos na época de polinização. No entanto o protocolo não mostrou resultados favoráveis para manter o pólen armazenado a longo prazo, sendo observado pólen viável somente até 122 e 136 dias para as cultivares 'Arbequina' e 'Koroneiki', respectivamente. Os resultados gerados nesse estudo podem contribuir com a identificação de cultivares e melhoramento de oliveira fora do seu local de origem. Apesar do efeito de diversas condições ambientais (temperatura, umidade, radiação entre outros) na reprodução de algumas cultivares de oliveira como Arbequina, Arbosana ou Manzanilla de Sevilla, este estudo permitiu demonstrar que existem cultivares como Picual ou Koroneiki que o genótipo tem maior influência, tornando-as candidatas ao seu desenvolvimento e aperfeiçoamento na região Sul brasileira.

Palavras-chave: *Olea europaea* L., Pólen, Pistilos, Identificação de Cultivares, Microscopia de Varredura, Herdabilidade, Armazenamento de Pólen.

Abstract

CHACÓN-ORTIZ, Andrés Eloy. **Study of the causes of low productivity of olive trees in Rio Grande do Sul, state Brazil: morphological and genetic aspects related to the reproductive system.** 158f. Thesis (PhD in Science) – Post-Graduate Program in Agronomy, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The olive tree has a great diversity of cultivars in the world, whose identification has been a problem. Genetic studies on the heritability of agronomic traits are scarce. Additionally, there is little information regarding the storage and viability of the species' pollen. The lack of information prevents advances in genetic improvement. Thus, the aim of this study was to generate information on the reproductive system; heritability in a broad sense of characters related to fruits and oil; and pollen viability after storage. In this work, the cultivars 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' and 'Picual' were used in southern Brazil. Ultrastructural characters of pollen and pistil were analysed, which can be used to discriminate cultivars under local conditions in the south of the country. The results show that the measurements of the micromorphological characters of pollen grains and pistils are remarkably similar within each cultivar, but showing significant differences when comparing different cultivars, which may contribute to the establishment of studies on the classification of olive tree cultivars. A second study was carried out in order to observe the heritability in the broad sense (H^2) of fruit traits of these same cultivars, in the same Brazilian region. From the results, it was observed that some cultivars such as 'Koroneiki' and 'Picual' had their characters mainly controlled by the genotype, while 'Arbequina' was more influenced by the environment. In the third study, the viability of pollen under long-term storage was analyzed, testing different temperatures, as well as the use of glycerin as a means of protection against damage caused by cold, in 'Arbequina' and 'Koroneiki' cultivars. The results showed suitable storage conditions for 82 days at -80°C , reaching the minimum limit of 30% germination, which can be used for crosses during the pollination period. However, the protocol did not show favorable results for keeping pollen stored in the long term, achieving only 122 and 136 days of viable pollen for 'Arbequina' and 'Koroneiki' cultivars, respectively. The results generated in this study can contribute to the identification and improvement of olive trees out of their original place of domestication. Despite the fact that different environmental conditions (temperature, humidity, radiation, among others) drastically influence some cultivars such as Arbequina, Arbosana or Manzanilla de Sevilla, affecting their reproduction, this study allowed us to demonstrate that there are cultivars such as Picual or Koroneiki that the genotype marks their development and, therefore, are little influenced by the surrounding environment, making them candidates for development and improvement in the southern region of Brazil.

Key-words: *Olea europaea*, Pollen, Pistils, Cultivar identification, Scanning electron microscopy, Heritability, Pollen Storage.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Mapa indicando produção mundial de azeite de oliveiras na safra 2019-2020. Fonte: Balanços e estimativas do COI, 2023..... 21
- Figura 2.** Gráficos que mostram os maiores produtores das oliveiras no mundo e na União Europeia, baseados na informação contida na Web do COI, 2023. As medidas de produção são expressas em toneladas..... 23
- Figura 3.** Localização espacial dos locais de amostragem. Ponto azul com contorno amarelo indica a localização da cidade de Pelotas. Ponto Vermelho, indica a localização da empresa “Verde Louro (Fazenda Mato Grande)”, município de Canguçu. O ponto verde indica ao “Olivas do Sul-Pomar (Alto dos Casemiros)”, Cachoeira do Sul. O ponto amarelo indica o lugar do “Azeites Batalha (Estância Guarda Velha)”, município de Pinheiro Machado; todos localizados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil..... 59
- Figura 4.** Perfil climático durante a colheita de flores (2019). Dados da Estação Meteorológica de "Canguçu, WMO: A811" (A, B, C); "Bagé, OMM: A827" (D, E, F); e "Encruzilhada do Sul, OMM: A893" (G, H, I), com base no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil..... 60
- Figura 5.** Micrografia óptica do pólen das oliveiras sob câmara de Neubauer. As amostras correspondem a cultivar ‘Arbequina’: A e B. Visto sob objetiva de 10X e ocular de 15X. C. Visto sob objetiva de 40X e ocular de 15X. D. Visto sob objetiva de 100X e ocular de 15X..... 61
- Figura 6.** Processo de microscopia eletrônica de varredura e detalhes do equipamento. A, Mesa V TSC. B, processo de pó de ouro. C, Equipamento JSM-6610LV para Microscopia de Varredura. D e E, visualização da tela do computador, contendo as interpretações das amostras analisadas..... 63
- Figura 7.** Micrografia de varredura (25.000X) dos caracteres ultraestruturais do tectum do grão de pólen: altura da parede (HT), largura da parede (WT),

área de lúmens (LA) e as distâncias entre os elementos escultóricos na exina (DSE).....	63
Figura 8. Micrografia de varredura (100X) dos caracteres superficiais do pistilo: razão do ovário (OR), comprimento do estilo (SL), largura de estilo (SW), comprimento do estigma (StigL), largura dos lóbulos esquerdo e direito juntos do estigma (StigW) e da área do estigma (StigA).....	65
Figura 9. Micrografia eletrônica de escaneamento de grãos de pólen de oliveira (<i>Olea europaea</i>) observada abaixo de 4500X. As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'.....	70
Figura 10. Micrografia eletrônica de grãos de pólen de oliveira (<i>Olea europaea</i>) observada abaixo de 25.000X. As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'.....	71
Figura 11. Análise de componentes principais, para os parâmetros ultraestruturais do pólen de 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual', com base nos vetores das variáveis de área dos lúmens (LA), distância entre os elementos esculturais na exina (DSE), altura do tectum (HT) e largura do tectum (WT).....	73
Figura 12. Micrografia de cortes histológicos dos pistilos em oliveira (<i>Olea europaea</i>). As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'. Seção longitudinal de um pistilo completo (4X). Um estigma bilobulado, um estilo mostrando um núcleo de tecido transmissor (tts) e o córtex (c), e um ovário. Detalhes de uma seção longitudinal do estigma mostrando papilas externamente orientadas e células estigmáticas internas com espaços intercelulares e seção longitudinal de ovário mostrando uma cutícula externa cobrindo a epiderme (ep), mesocarpo (mc) e as células mais internas do endocarpo (10X).....	76
Figura 13. Micrografia eletrônica do estigma da flor de oliveira (<i>Olea europaea</i>) observada abaixo de 100X. As amostras correspondem às	

cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'.....	77
Figura 14. Análise dos Componentes Principais para os parâmetros ultraestruturais do pistilo das cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual' com base nos vetores das variáveis comprimento do estilo (SL), comprimento do estigma (StigL), largura do estigma (StigW) e área do estigma (StigA).....	80
Figura 15. Vista panorâmica da olivicultura na Fazenda Mato Grande "Verde Louro", Município de Canguçu, RS, Brasil.....	89
Figura 16. Perfil climático do mês de fevereiro de 2021, durante a colheita de frutos. Dados da Estação Meteorológica de "Canguçu, WMO: A811", com base no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.....	90
Figura 17. Processo de titulação e determinação do grau de acidez. A. Azeite da cultivar 'Arbequina', B. Azeite da cultivar 'Manzanilla de Sevilla', C. Azeite da cultivar 'Picual' e D. Amostra de azeite após da titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N.....	92
Figura 18. Análise de correlação para as variáveis comprimento do fruto (FL), largura do fruto (FW), peso fresco do fruto (FFW), comprimento do endocarpo (EL), largura do endocarpo (EW) e peso do endocarpo fresco (FEW). Os asteriscos apresentam nível de significância, *5% e *1%.....	96
Figura 19. Gráficos de violino representando a variação da medida dos frutos. A. comprimento do fruto (FL), B. largura do fruto (FW), C. peso do fruto fresco (FFW), D. comprimento do endocarpo (EL), E. largura do endocarpo (EW) e F. peso do endocarpo (FEW) de cada cultivar estudada dentro do ambiente de cultivo. Cada violino mostra a distribuição dos dados do nível mínimo ao máximo, com linhas horizontais internas mostrando a média dos dados. Os boxplots representam os limites inferior e superior do primeiro e terceiro quartis. Os valores discrepantes (outliers) são indicados com pontos pretos. A largura horizontal do violino depende da densidade de dados.....	97

Figura 20. Gráficos de dispersão mostrando a variação das características de frutos considerando cada árvore dentro de cada cultivar. A. comprimento do fruto (FL), B. largura do fruto (FW), C. peso do fruto fresco (FFW), D. comprimento do endocarpo (EL), E. largura do endocarpo (EW) e F. peso do endocarpo fresco (PEW) em cada cultivar estudada no ambiente de cultivo. Cada círculo colorido é o valor médio da característica de cada árvore para cada cultivar ('Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi)). O eixo x em todos os gráficos representa cada árvore (número de árvores analisadas), enquanto o eixo y corresponde aos valores das características.....	99
Figura 21. Gráficos de violino representando a variação das variáveis A. Grau de Acidez (DA) e B. Índice de Peróxido (IP) em cada cultivar estudada ('Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi)) dentro do ambiente de cultivo. Cada violino mostra a distribuição dos dados do nível mínimo ao máximo, com linhas horizontais internas mostrando a média dos dados. Os boxplot representam os limites inferior e superior do primeiro e terceiro quartis. Os outliers são indicados com pontos pretos. A largura horizontal do violino depende da densidade de dados.....	100
Figura 22. Vista do crescimento do tubo polínico sob microscópio óptico. Lente 100X.....	112
Figura 23. Viabilidade para grãos de pólen das duas cultivares em conjunto, armazenadas sob quatro temperaturas (26°C, 5°C, -20°C, -80°C) e diferentes períodos de tempo. a. Vista do gráfico de área que mostra a intersecção entre as duas cultivares ('Arbequina' e 'Koroneiki'), os diferentes tempos avaliados e as quatro temperaturas testadas. b. Gráfico de linhas, podendo-se observar o comportamento da viabilidade ao longo do tempo e comparando cada uma das temperaturas testadas em cada cultivar separadamente.....	114
Figura 24. Gráficos comparando a germinação do pólen após o armazenamento na mesma temperatura sob diferentes teores de glicerina (0%, 20%, 30%, 40%) e por diferentes períodos.....	117

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análises de variância comparando as diferentes medições de pólen e pistilo entre as cultivares (Arbequina, Arbosana, Frantoio, Koroneiki, Manzanilla de Sevilla e Picual).....	66
Tabela 2. Análises de variância comparando os diferentes valores de contagem de pólen entre as diferentes localidades estudadas.....	66
Tabela 3. Número de grãos de pólen por flor de seis cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual', em cada uma das localidades estudadas.....	68
Tabela 4. Caracteres analisados em grãos de pólen. Medições indicando diferentes dimensões dos grãos de pólen das cultivares de oliva 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.....	69
Tabela 5. Parâmetros ultraestruturais dos grãos de pólen. Medições indicando diferentes dimensões do grão de pólen observadas sob microscopia de escaneamento de elétrons das cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.....	72
Tabela 6. Comparação da anatomia do pistilo entre as cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.....	74
Tabela 7. Parâmetros ultraestruturais do pistilo. Medições indicando diferentes dimensões do pistilo observadas sob microscopia de escaneamento de elétrons das cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.....	79
Tabela 8. Análises de variância comparando as diferentes medições de frutos entre as cultivares (Arbequina, Arbosana, Frantoio, Koroneiki, Manzanilla de Sevilla e Picual).....	95

Tabela 9. Caracterização dos frutos de oliveira das cultivares de azeitona 'Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi). As características avaliadas foram: comprimento do fruto (FL); largura do fruto (FW); peso do fruto fresco (FFW); comprimento do endocarpo (EL); largura do endocarpo (EW); peso do endocarpo fresco (FEW); relação entre comprimento e largura do fruto (FL/FW); relação entre comprimento e largura do endocarpo (EL/EW); rendimento de gordura (FY).....	96
Tabela 10. Herdabilidade em sentido amplo para cultivares de oliveira, considerando dez árvores para as características: FL: comprimento do fruto; FW: largura do fruto. FFW: peso de fruto fresco; EL: comprimento do endocarpo; EW: largura do endocarpo; FEW: peso do endocarpo fresco; DA: grau de acidez; PI: índice de peróxido.....	101
Tabela 11. Análises de variância comparando os diferentes níveis dos fatores estudados e suas possíveis interações: cultivar ('Arbequina', 'Koroneiki'), tempo (dias) e a temperatura (+26°C, +5°C, -20°C, -80°C).....	112
Tabela 12. Análise de variância comparando os diferentes níveis dos fatores estudados e suas possíveis interações: % Glicerina (Controle 0%, 20%, 30% e 40%), temperatura (+26°C, +5°C, -20°C, -80°C) e diferentes períodos de armazenamento.....	116

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	18
2. Revisão da Literatura.....	20
2.1. Importância econômica das oliveiras.....	20
2.2. Origem e domesticação da oliveira.....	24
2.3. Caracterização da espécie.....	27
2.4. Caracterização do sistema reprodutivo.....	30
2.5. Fenologia da oliveira.....	34
2.6. Manejo da cultura.....	36
2.7. Alternância na produção “ <i>Vecería</i> ”.....	43
2.8. Cultivares mais utilizadas.....	44
2.9. Problemas de produtividade em regiões fora da Bacia do Mediterrâneo, especialmente no Rio Grande do Sul.....	51
2.10. Melhoramento da oliveira.....	53
2.11. Perspectivas futuras para as mudanças climáticas.....	55
3. CAPÍTULO I - Uso de características microestruturais de pólen e pistilo para identificar cultivares de oliveira no Sul do Brasil.....	56
3.1. Resumo.....	56
3.2. Introdução.....	56
3.3. Material e Métodos.....	59
3.3.1. Material vegetal e condições de armazenamento.....	59
3.3.2. Contagem e análise do tamanho do grão de pólen.....	61
3.3.3. Análise ultraestrutural da parede do pólen.....	62

3.3.4. Análise anatômica de pistilos	64
3.3.5. Análises ultraestruturais de pistilos.....	64
3.3.6. Análise estatística	65
3.4. Resultados.....	66
3.4.1. Contagem e análise do tamanho dos grãos de pólen	67
3.4.2. Análise ultraestrutural da parede do pólen.....	69
3.4.3. Análise anatômica dos pistilos	74
3.4.4. Análise ultraestruturais dos pistilos.....	76
3.5. Discussão	81
3.5.1. Pólen	81
3.5.2. Pistilo.....	84
3.5.3. Análises multivariadas	85
3.6. Conclusões.....	85
4. CAPÍTULO II - Caracterização e herdabilidade de frutos de cultivares comerciais de oliveira no Sul do Brasil.....	87
4.1. Resumo	87
4.2. Introdução	87
4.3. Material e Métodos.....	89
4.3.1. Parâmetros biométricos avaliados na fruta	90
4.3.2. Obtenção do azeite e parâmetros medidos	91
4.3.2.1. Grau de acidez.....	91
4.3.2.2. Índice de peróxido.....	93
4.3.3. Análise estatística	93
4.4. Resultados.....	94
4.4.1. Caracterização de frutos de diferentes cultivares	96

4.4.2. Parâmetros medidos em óleos.....	99
4.4.3. Herdabilidade.....	100
4.5. Discussão	101
4.6. Conclusões.....	105
5. CAPÍTULO III - Avaliação da germinação <i>in-vitro</i> de pólen de oliveiras sob condições de armazenado em baixas temperaturas.....	107
5.1. Resumo	107
5.2. Introdução	107
5.3. Material e Métodos.....	109
5.3.1. Material vegetal e condições de coleta.....	109
5.3.1.1. Experimento I: Conservação dos grãos de pólen sob diferentes temperaturas e tempo	110
5.3.1.2. Experimento 2: Conservação dos grãos de pólen sob diferentes concentrações de glicerina, temperaturas e tempo	111
5.3.2. Análise estatística	112
5.4. Resultados.....	112
5.5. Discussão	117
5.6. Conclusões.....	120
7. Referências	123

1. Introdução Geral

Numa visão de produção agrícola, a importância econômica das oliveiras e o seu protagonismo tem sido uma questão inquestionável nos últimos anos, onde cada vez mais países se têm somado ao desenvolvimento produtivo mundial tanto de azeite quanto da azeitona de mesa, passando a fazer parte da dieta básica da humanidade. Na safra 2020/2021, a produção final foi de 3.010.000 t de azeite e 2.955.500 t de azeitona de mesa, sendo quase a metade dessa produção proveniente da Espanha (COI, 2023).

A área dedicada às oliveiras cresce ano após ano, principalmente devido ao aumento da área irrigada desta cultura e à expansão das plantações de alta densidade (SENAMHI, 2020). No entanto, apesar da importância que a cultura representa através dos processos de transformação e distribuição das suas produções, e das implicações sociais, econômicas, ambientais e territoriais que dela derivam, o setor do azeite continua a apresentar problemas importantes. Parte desses problemas é o pequeno tamanho dos pomares dedicados a essa cultura, a baixa capacidade de estruturação do setor ou a volatilidade dos preços (BÖHM et al., 2013).

Mais de 20% das plantações tradicionais de oliveiras que são cultivadas sem a ajuda de maquinaria atravessam dificuldades, que colocam em risco um sistema de produção essencial pelas funções econômicas, sociais e ambientais que desempenha, além de apresentarem problemas de alternância de produção. Porém, houve um avanço na tecnificação do setor, com sistemas de produção intensivos e superintensivos e a busca por cultivares melhoradas e adaptadas às condições locais de cada região (RODRÍGUEZ-ENTRENA et al., 2016).

A elevada produtividade e os baixos custos garantem a viabilidade técnica e econômica deste tipo de exploração, que difere substancialmente das pré-existentes, muitas delas localizadas em áreas não tradicionais dedicadas à cultura da oliveira (COI, 2023). Além da rentabilidade econômica, há a importância ambiental do olival, principalmente ao nível da biodiversidade, sequestro de carbono, conservação dos solos e geração de paisagens agrícolas de grande valor. Esta função ambiental é muito exigida pela sociedade, onde a prestação destes serviços e a sua remuneração são

determinantes não só para a manutenção do olival como também para a viabilidade dos espaços rurais em que se inserem.

É por tudo isto que estudos relacionados ao sistema reprodutivo e ao melhoramento genético fazem parte da aposta real na qualidade, profissionalização e internacionalização do setor, num país em crescimento como o Brasil, cuja eficiência no setor oleícola são elementos que permitiriam avançar na resposta a essas dificuldades. Dentro desse contexto, esse estudo teve como objetivo gerar informação científica a cerca do sistema reprodutivo, herdabilidade de caracteres de rendimento e viabilidade do pólen na cultura da oliveira após o armazenamento.

2. Revisão da Literatura

2.1. Importância econômica das oliveiras

O cultivo da oliveira é uma atividade de grande importância econômica, alimentar, energética e política, razão pela qual se tornou uma cultura comercial fundamental no Mediterrâneo (RUIZ, 2016; RUIZ et al., 2018; GULLON et al., 2020; CASTILLA-GARCÍA et al., 2021; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a; COI, 2023). Geralmente, a oliveira é cultivada sozinha, mas às vezes está associada a cereais, vinhedos, girassóis ou outras culturas que possibilitam compensar as variações nos custos ou a produção alternada. Ou seja, após um ano de colheita abundante de azeitonas, há um ou até dois anos em que a colheita é pequena, e esse fenômeno ocorre necessariamente a cada dois anos (FRAGA et al., 2021). Todos os anos, a área destinada ao cultivo de oliveiras cresce aproximadamente 150.000 hectares, e atualmente existem 56 países produtores de azeites. No mundo existem aproximadamente 1,5 bilhões de oliveiras plantadas em 11 milhões de hectares, produzindo atualmente 3.010.000t para azeite e 2.955.500t para azeitonas de mesa (COI, 2023) (**Figura 1**).

Da área produtiva ativa, 80% (6.710.145ha) está localizada na Europa, concentrando-se na bacia do Mediterrâneo, com uma produção anual de 2.051.000t. A área restante está na África (3.126.720ha), produzindo 327.435t, na Ásia (1.137.950ha), gerando 247.365t; na América (303.300ha) com uma produção de 60.855t; e na Oceania (33.000ha) produzindo apenas 20.500t. No entanto, de acordo com os cálculos do Conselho Oleícola Internacional (COI), o déficit entre produção e consumo pode exceder 300.000t (FORTUNY, 2002; COI, 2020; MANZANARES et al., 2020; GULLON et al., 2020; COI, 2023). De fato, a última safra 2020-2021, representou uma queda de 7,8% em relação à safra 2019-2020 (COI, 2023).

Para a safra 2020-2021, o principal produtor mundial de azeite foi a Espanha (FAOSTAT, 2019; COI, 2023), cuja produtividade média de frutos coletados ($2,46t\ ha^{-1}$) gerou um rendimento de 1.389.000t de azeite (46,14% da produção mundial), superando mais de quatro vezes seus concorrentes mais próximos. Seguido da Grécia que

apresentou produtividade de 2,14t ha⁻¹ (275.000t de azeite), Itália 2,97t ha⁻¹ (274.000t de azeite) e Portugal 0,67t ha⁻¹ (100.000t de azeite) (**Figura 2**).

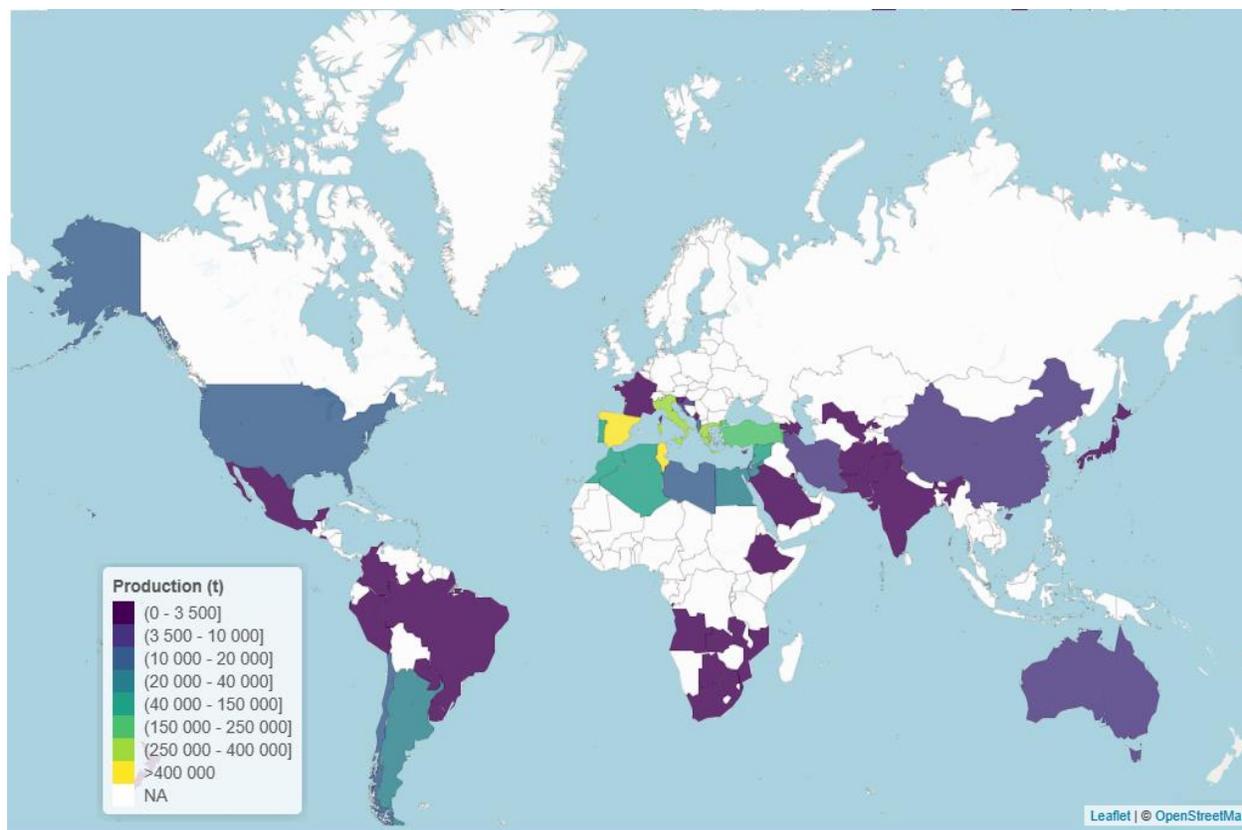


Figura 1. Produção mundial de azeite na safra 2019-2020. Fonte: (Balanços e estimativas do COI, 2023).

Considerando o continente Americano, no Peru, a oliveira tem sido utilizada para a produção de azeitonas de mesa, com uma área de plantio de 23.168 hectares (SENAMHI, 2020). Na safra de 2019-2020 a produção foi de 45.000t (com produtividade média de 1,94t ha⁻¹) e uma exportação de frutas que atinge 22.779t (SENAMHI, 2019; COI, 2020) para países como o Brasil, Estados Unidos, Venezuela, Chile, Itália e Israel (GUTIERREZ, 2007; GARCIA, 2012; COI, 2023). O Chile tem experimentado um notável desenvolvimento, com a incorporação de áreas de plantio e produção técnica (DONNOSO, 2006), produzindo no ano 2019, aproximadamente 20.000t de azeite e 13.000t de azeitonas de mesa (INFAOLIVA, 2019; COI, 2020), apresentando uma produtividade média de azeitonas de 4,65t ha⁻¹.

Na Argentina a área cultivada é de aproximadamente 78.050ha, dos quais 70% correspondem a cultivares para extração de azeite (GONZÁLEZ e CEBRINO, 2016), produzindo na safra 2019-2020, aproximadamente 82.500t de azeite, apresentando uma produtividade média de azeitonas de 6,04t ha⁻¹. A produção de azeitonas de mesa foi de 100.000t, com uma produtividade média de 4,27t ha⁻¹ (COI, 2020). No Uruguai, o cultivo de oliveiras ocupa uma área de 9.100 hectares, sendo que na safra de 2019-2020, foram produzidos aproximadamente 2.000t de azeite, uma quantia que é igual à somatória das safras dos anos 2015-2018. A produtividade média no país é de 1,05t ha⁻¹ (ACKERMANN e GORGA, 2019; COI, 2023). A qualidade diferenciada das azeitonas da Argentina e do Uruguai, fez com que esses países passassem a ser membros do Conselho Oleícola Internacional (COI), sendo os únicos representantes da América do Sul, cumprindo as exigências organolépticas/sensoriais e químicas estabelecidas pela instituição governadora da produção internacional de azeite no mundo (COI, 2023).

No Brasil, aproximadamente 400 produtores vêm cultivando 6 mil hectares com 1,664 milhão de plantas de oliveiras, dos quais, 3.464 hectares estão localizados no Rio Grande do Sul (RS), pertencentes a 145 produtores distribuídos em 56 municípios (SEAPDR, 2020). Apesar do grande consumo no país nos últimos cinco anos, com uma taxa de variação crescente de 12,4% (COI, 2020), e dos esforços e investimentos feitos, a área plantada no Brasil não apresenta plantios comerciais de grande impacto econômico para suprir a demanda interna. O país possui apenas capacidade de produção de 6.500 toneladas de azeite, devido às áreas reduzidas com condições climáticas adequadas para o desenvolvimento (WREGGE et al., 2015).

Para a safra 2019-2020, a produção de azeitonas no Brasil foi de 2,4t totais, majoritariamente destinadas à produção de azeite, gerando aproximadamente 180 toneladas do produto, o que corresponde a apenas 0,2% do azeite consumido no país. A produtividade média de azeitonas no país é de 0,35t ha⁻¹, e no RS é de 0,41t ha⁻¹ (COI, 2020).

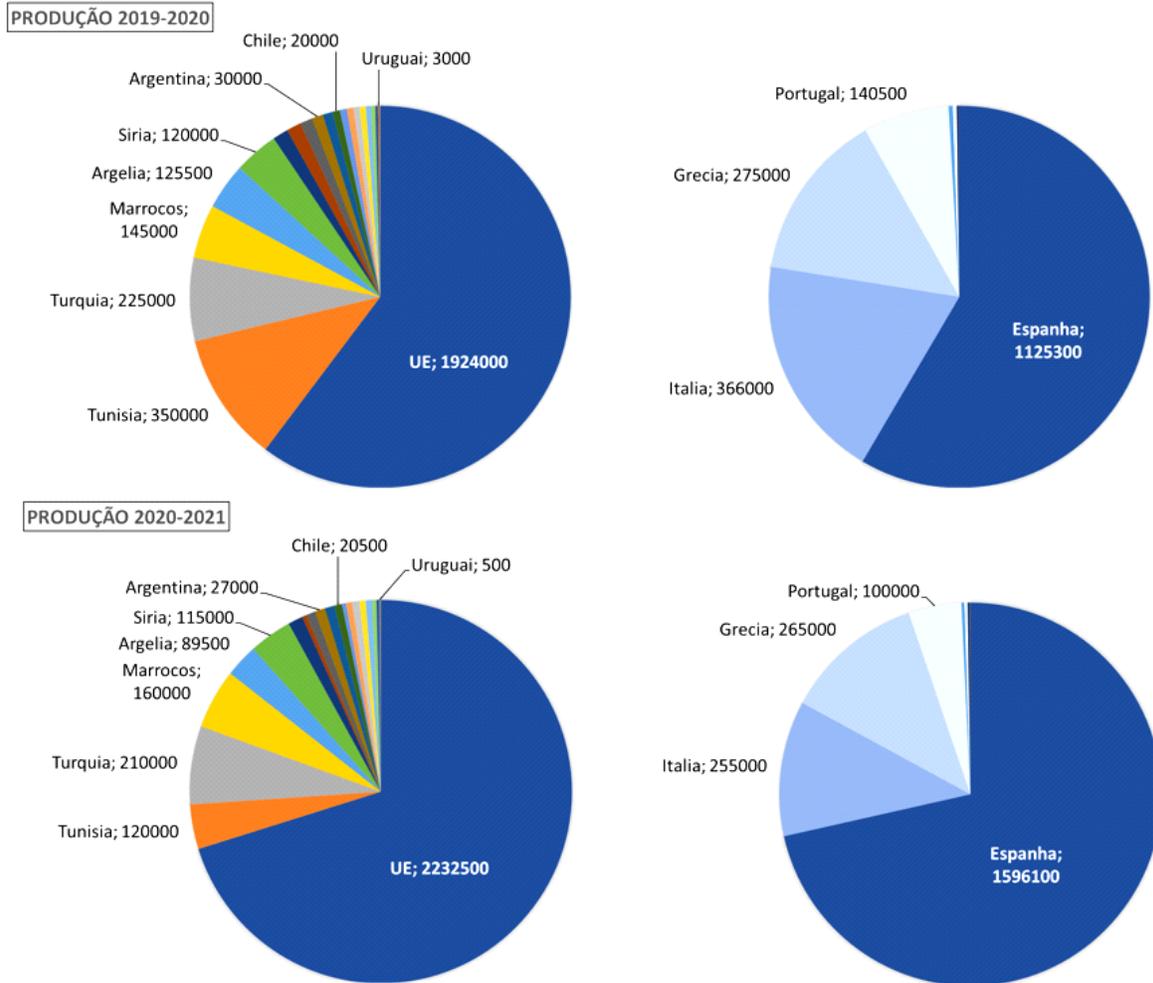


Figura 2. Maiores produtores de azeite no mundo e na União Europeia, baseados na informação contida na Web do COI, 2023. As medidas de produção são expressas em toneladas.

Segundo a Conselho Oleico Internacional (2023), considerando a safra 2020-2021, o Brasil encontra-se em segundo lugar entre os países importadores de azeite (106.306t), representando 9,6% do consumo mundial, depois dos EUA (379.536t). Da mesma forma, o Brasil é o segundo maior importador de azeitona de mesa do mundo (110.000t), após os EUA (140.000t) (OLIVEIRA e BASTOS, 2011; COI, 2023). A importação de azeite e azeitonas implica um custo de aproximadamente 200 milhões de

reais por ano, e esses produtos são na maioria provenientes da Argentina, Peru, Chile, Espanha e Portugal (MORA et al., 2007; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a). O volume de importações de azeite e azeitona no país tem crescido nos últimos anos, aumentando 476% em azeite e 317% no volume de importações de azeitonas de mesa (SILVA e REBOITA, 2014), devido aos benefícios de consumo para a saúde e preços mais acessíveis.

2.2. Origem e domesticação da oliveira

A comercialização da oliveira remonta ao século XII a.C, coincidindo com a expansão das civilizações mediterrâneas, que durante séculos têm influenciado o destino da humanidade (MARTÍN-PUERTAS et al., 2009; OTEROS, 2014; COI, 2020). No entanto, a origem e a propagação da espécie não são totalmente claras (LOUKAS e KRIMBAS, 1983; ALBA et al., 2011; BESNARD et al., 2013; GUERRERO et al., 2016; LANGGUT et al., 2019).

Dados arqueológicos indicam que, a oliveira selvagem é originária da Ásia Menor, onde é extremamente abundante e cresce em florestas densas (COI, 2020) e parece ter se espalhado da Síria para a Grécia via Anatólia (DE CANDOLLE, 1983). Outra hipótese aponta para a origem no Mar Morto, 6000 anos antes (ZOHARY e SPIEGEL-ROY, 1975; CAVAGNARO et al., 2001; FENDRI, 2011; LANGGUT et al., 2019), a partir da seleção de *Olea europaea* var. *sylvestris* Brot., da região do Irã, Mesopotâmia, Palestina e zona costeira da Síria no Oriente Médio (DRAGO, 2015).

Considerando que a área que se estende do sul do Cáucaso ao platô iraniano e às costas mediterrâneas da Síria e da Palestina é o local de origem da oliveira, seu cultivo se desenvolveu nessas duas últimas regiões. A partir daí, espalhou-se para as ilhas do Egeu, países mediterrâneos como Grécia, Itália, França e Espanha, ou para a ilha de Chipre e em direção à Anatólia ou da ilha de Creta em direção ao sul do Egito, Tunísia e Marrocos (ZOHARY e SPIEGEL-ROY, 1975; ÖZKAYA et al., 2004; RALLO, 2005; NEWTON et al., 2006; FENDRI, 2011; GARCÍA, 2012; DRAGO, 2015; ADAKALIC e LAZOVIC, 2018; LANGGUT et al., 2019; COI, 2020).

A distribuição mediterrânea é restrita, pois está adaptada a climas quentes e secos no verão e pouco frios e chuvosos no inverno (FENDRI, 2011; WREGGE et al., 2015). Além disso, depende de diferentes fatores, como a ação do homem na determinação da superfície de cultivo, efeitos de competição entre espécies de plantas, características edáficas, e apresenta escassa variabilidade genética da espécie *Olea europaea* var. *europaea* (OTEROS et al., 2013 a, b).

O cultivo da oliveira foi introduzido na Espanha durante o domínio marítimo dos fenícios (1.100a.C) (GOMES, 1979; BARRANCO e RALLO, 1984), mas não se desenvolveu de maneira notável até a chegada de Cipião e do domínio romano (45a.C) (GOMES, 1979; COI, 2020). A importância da oliveira aumentou durante o Império Romano, continuando a expansão para países vizinhos do Mediterrâneo, usando-a como uma arma pacífica em suas conquistas (GOMES, 1979). Foi introduzida em Marselha por volta de 600a.C e se espalhou de lá para toda a Gália. Apareceu na Sardenha, levada pelos genoveses após a queda do Império Romano (COI, 2020).

A oliveira ocupou um grande trecho do vale de bética (hoje Andaluzia), e se espalhou para a área costeira central e mediterrânea da Península Ibérica, incluindo Portugal, aumentando a exportação de azeite por mar (GOMES, 1979; BARRANCO e RALLO, 1984; COI, 2020). Os árabes levaram suas cultivares ao sul da Espanha, e influenciaram tanto a disseminação do cultivo que o nome do fruto da oliveira (azeitona) e o óleo (azeite), têm raízes do árabe *az-zayt* ou *zaitum*, traduzida do hebraico *Zait* que significa óleo (MARCH e RIOS, 1989; RAE, 2023).

As oliveiras foram transportadas de Sevilha para as Índias Ocidentais e depois para o continente Americano no ano de 1492, seguindo para as Antilhas em 1520, introduzida por missionários espanhóis no Caribe e na região central do México, entre 1531-1560 (GOMES, 1979; SOLERI et al., 2010; WREGGE et al., 2015). Posteriormente foram espalhadas para Califórnia na América do Norte e na América do Sul (Peru, Chile, Argentina, Uruguai e Brasil), onde a produção foi melhor (WREGGE et al., 2015). O setor oleícola nos tempos mais modernos continua a se espalhar para fora do Mediterrâneo, e hoje a oliveira é cultivada em lugares tão distantes de suas origens quanto o sul da África, Austrália, China e Japão, até lugares como o Havaí (CIVANTOS, 2004; CHIAPPETTA e MUZZALUPO, 2012; SANTOS, 2016; CHIAPPETTA et al., 2017).

Na América do Sul, na Colômbia, fora da faixa latitudinal natural da cultura, foram feitas tentativas de plantar oliveiras na região de Villa de Leiva e Boyacá, o que gerou resultados ruins (TAGUAS, 2009; GARCIA, 2012). No Chile, Peru e Argentina, a introdução das oliveiras foi feita entre os anos de 1550-1560, trinta anos depois da conquista do Império dos Incas. Devido ao desenvolvimento da safra, o rei Carlos III ordenou ao vice-rei do Peru, Pedro Fernández de Castro, que cortasse as plantações do Alto Peru ao Rio da Prata, temendo que a prosperidade do vegetal e sua comercialização nessa área afetassem o monopólio da Espanha no mundo (HIDALGO, 1993).

Na Argentina, as plantações de oliveiras comerciais datam da década de 1940, mas a atividade começou a se fortalecer no final da década de 1990, impulsionada principalmente pela promoção industrial e o aumento dos preços internacionais (GONZÁLEZ e CEBRINO, 2016). No Uruguai, o início do cultivo remonta a 1726, com plantas introduzidas da Argentina, mas o cultivo declinou até 2002, onde ressurgiu devido à disseminação de propriedades benéficas do óleo de azeitona (LOPEZ e SILVEIRA, 2011; SILVEIRA et al., 2012). E é por isso que, em coordenação com os centros internacionais, o Instituto Nacional de Pesquisa Agrícola (INIA), começou a avaliar cultivares e a qualidade do óleo, e criou a Asociación Olivícola Uruguaya (ASOLUR) (GONZÁLEZ e CEBRINO, 2016).

No Brasil a cultura foi introduzida nos séculos XV e XVI (GOBBATO, 1945; OLIVEIRA e BASTOS, 2011), na época colonial, pelos Padres ou fazendeiros a título de curiosidade. O plantio foi feito nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. No entanto, a maioria dos olivais foram cortados por ordem real, pois Portugal não queria que seus produtos sofressem concorrência no Brasil (GOMES, 1979).

Durante muito tempo as universidades, institutos de pesquisa e estações experimentais não conduziram estudos com oliveiras (GOMES, 1979). Em 1947, o Governo do Estado do Rio Grande do Sul publicou a Lei nº 59, que criava a Comissão de Estudo e Fomento do Cultivo da Oliveira e Industrialização, e oferecia incentivos fiscais e distribuição de prêmios. Depois, no ano seguinte, foi criado o Serviço Oleícola, na Secretaria da Agricultura (SEAPDR, 2020).

No Brasil, no início houve uma série de fracassos devido à escolha de locais de implantação inadequados às exigências da cultura; cultivares não adaptados às condições locais; adoção de pacotes tecnológicos inadequados às condições locais e questões mercadológicas e políticas (SEAPDR, 2020). No estado do Rio Grande do Sul, desde o ano de 2005 o interesse pelos plantios das oliveiras tem-se intensificado, estabelecendo parcerias entre diferentes instituições de pesquisa e os produtores, para o aprimoramento de cultivares destinadas às produções de frutos para mesa e extração do azeite (PESTANA-BAUER et al., 2011).

2.3. Caracterização da espécie

A oliveira (*Olea europaea* L.) tem sido descrita como uma espécie diploide $2n = 2x = 46$ (MINELLI et al., 2000; FENDRI, 2011; CRUZ et al., 2016), perene, (VAL, 2011; GARCÍA, 2012; SANTOS, 2016). Pertencente à família Oleaceae (RIBEIRO et al., 2010; FENDRI, 2011; WREGGE et al., 2015), na ordem Lamiales, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta (DRAGO, 2015).

A família Oleaceae tem 29 gêneros, sendo a maioria árvores e arbustos, e alguns de hábito trepador (RIBEIRO et al., 2010). Certos gêneros são interessantes economicamente, tais como *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum* e *Olea* (RAPOPORT, 2004). Este último está representado por 40 espécies e subespécies (DRAGO, 2015), que envolve todas as oliveiras domesticadas e selvagens (acebuches) (MATÍAS et al., 2010; PESTANA-BAUER et al., 2011).

A classificação filogenética de *Olea europaea* não foi esclarecida (ALBERTINI et al., 2011). Atualmente seis subespécies de *Olea europea* são reconhecidas como botanicamente válidas, *Olea europaea* subsp. *cerasiformis* Kunkel & Sunding; *Olea europaea* subsp. *cuspidata* Wall. & Don Cif.; *Olea europaea* subsp. *europaea*; *Olea europaea* subsp. *guanchica* Vargas, Hess, Muñoz Garm. & Kadereit; *Olea europaea* subsp. *laperrinei* Batt. & Trab Cif.; e *Olea europaea* subsp. *maroccana* Greuter & Burdet.

Existem diferenças de opinião sobre como sub classificá-la, já que, alguns pesquisadores consideram que, as oliveiras domesticadas pertencem à subsp. *sativa*, enquanto que as silvestres pode ser da subsp. *sylvestris* (RAPOPORT, 2004) ou da

subsp. *oleaster* (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). A *Olea europaea sylvestris* é um arbusto espinhoso com frutos geralmente pequenos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). Pesquisadores botânicos atribuem a origem da espécie ao aumento da fertilidade da subsp. *cuspidata* (RILEY, 2002; ALBERTINI et al., 2011), enquanto os geneticistas, identificaram a origem em *Olea europaea* subsp. *oleaster* (BESNARD et al., 2001; ALBERTINI et al., 2011).

Independentemente de sua origem, desde o início, as sementes foram selecionadas dos indivíduos comercialmente mais interessantes e melhor adaptadas ao ambiente (MATÍAS et al., 2010). Embora os frutos da oliveira tenham sementes viáveis, a reprodução sexual não é desejada em plantações comerciais devido à sua variabilidade e longo período juvenil. A propagação tem sido feita por estacas, utilizando-se desde a enxertia sobre espécies silvestres até o enraizamento de material lenhoso e herbáceo (COUTINHO, 2007; RIBEIRO, 2010; MATÍAS et al., 2010). Isto é uma opção para a formação de mudas que mantêm as características genéticas e, portanto, uniformidade fenológica, tamanho pequeno e precocidade na produção (BARRANCO et al., 2008; RIBEIRO, 2010).

A *Olea europaea sativa* L. é caracterizada como uma árvore polimórfica, com fase juvenil e adulta (OLIVEIRA e BASTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2015; DRAGO, 2015). Estas fases podem distinguir-se pela incapacidade reprodutora no estado juvenil, alto potencial de enraizamento, folhas curtas e grossas, ramos com o comprimento dos entrenós pequeno (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). Na fase adulta o tamanho pode atingir alturas de 15 m ou mais (MATÍAS et al., 2010). O tronco é espesso e a casca é cinza ou verde-acinzentada com coroa ramificada densa, arredondada a lobulada (OLIVEIRA et al., 2003; MATÍAS et al., 2010; OLIVEIRA e BASTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2015), caracteres dependentes da variedade e das condições de cultivo (DRAGO, 2015).

O sistema radicular varia de acordo com a origem da planta. Se a planta é originada de sementes, apresenta uma raiz principal pivotante, de grande tamanho. Enquanto que se as árvores são obtidas por estacas, a raiz será adventícia ou fasciculada (RAPOPORT, 1998; MATÍAS et al., 2010; OLIVEIRA e BASTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

As folhas geralmente são dispostas de maneira oposta, formando um ângulo de 90° com o par de folhas dos nós superiores e inferiores imediatos (MATÍAS et al., 2010), apresentando um pecíolo curto (MATÍAS et al., 2010; OLIVEIRA e BASTOS, 2011). As folhas têm de 30 a 90 mm de comprimento e de 10 a 20 mm de largura. São de forma simples, lanceoladas ou elípticas, com bordas inteiras e cobertas de pelos opacos ou tricomas, para resistir às condições de extrema seca. A região dorsal é de cor verde escuro, enquanto a parte ventral verde acinzentada (RAPOPORT, 1998; OLIVEIRA et al., 2003; MATÍAS et al., 2010).

Olea europaea sativa L. é uma espécie andromônica, com flores perfeitas e estaminadas (MARTIN et al., 2005; MATÍAS et al., 2010), o que aparentemente é um caráter dependente do tipo de variedade (MATÍAS et al., 2010). As flores estão dispostas em inflorescências com forma de panículas, apresentando ramificações desde o eixo central que emergem das axilas das folhas dos galhos das frutas do ano anterior (RAPOPORT, 1998; OLIVEIRA et al., 2003; MATÍAS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015). A floração geralmente começa na primavera, embora os processos tenham início desde o verão do ano anterior, quando são produzidas mudanças nos compostos que determinam o destino vegetativo ou reprodutivo (GANINO et al., 2011; ROJO, 2014). Após à polinização, das 15 ou 30 flores iniciais por inflorescência, apenas um ou alguns poucos frutos são formados (GANINO et al., 2011).

O fruto é tipo drupa com só uma semente. O tamanho pode variar de 10 a 40 mm de comprimento e 6 a 20 mm de largura (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). A forma (elipsoidal, ovoide ou redondo) depende da variedade (GANINO et al., 2011). Isto permite que sejam classificadas para azeitonas de mesa ou de extração de azeite (GOMEZ e RAPOPORT, 2008). O fruto possui três tecidos, o caroço que corresponde ao endocarpo, à polpa é o mesocarpo e a pele o exocarpo. O caroço pode ter diferentes tamanhos, formas, simetrias e texturas da superfície, sendo caracteres de critério morfológico para classificação (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). O fruto apresenta etapas de amadurecimento caracterizada pela mudança da cor verde intenso, verde amarelado, com veias da cor violeta até atingir o preto, permitindo qualificar distintos níveis fenólicos no azeite (PINHEIRO et al., 2002; GOMEZ e RAPOPORT, 2008; PESTANA-BAUER et al., 2011; NAVARRO-AINZA e LÓPEZ-CARVAJAL, 2013).

A ocorrência de oliveiras muito antigas foi relatada em toda a área do Mediterrâneo. Esse fato é de grande importância na tradição e na conservação do cultivo, já que essas árvores têm importância genética, agrônômica, naturalista, paisagística e histórica que tem passado de geração em geração (ADAKALIC e LAZOVIC, 2018).

Conhecer o nível e a estrutura da diversidade genética é chave para o gerenciamento de recursos genéticos em programas de melhoramento bem-sucedidos, produzindo resultados sobre a domesticação e a subsequente expansão da cultura (BALDONI et al., 2006).

Diversos pesquisadores têm usado marcadores bioquímicos e moleculares como Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) para avaliar as relações filogenéticas no complexo *Olea europaea* (FABBRI et al., 1995; BELAJ et al., 2001; BESNARD et al., 2001; ALBERTINI et al., 2011). Além disso, tem sido utilizado isoenzimas, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphisms*) ou Sequências Simples Repetitivas (SSRs - *Simple sequence repeats*), para avaliar genótipos de oliveiras, mostrando abundante variabilidade e a existência de clados (TRUJILLO et al., 1995; ALBA et al., 2009; BALDONI et al., 2009; SAKAR et al., 2016). Essas análises também possibilitaram revisar a classificação de cultivares que no passado tinham sido erroneamente identificadas baseadas apenas em caracteres morfológicos (RALLO et al., 2000; OBAID et al., 2014).

É importante enfatizar que, atualmente são utilizadas análises moleculares e morfológicas como ferramentas complementares para caracterização e distinção de novas variedades de oliveiras. As ferramentas são utilizadas em conjunto, pois separadamente, os dados moleculares são inúteis para a identificação no campo e os dados morfológicos podem variar devido às pressões ambientais (RALLO et al., 2000; D'IMPERIO, et al., 2011; SANTOS, 2016).

2.4. Caracterização do sistema reprodutivo

A propagação assexuada da oliveira tem sido a prática mais comum desde a sua domesticação (BÖHM et al., 2013). Isso resultou em alta heteroplasmia (GARCÍA, 2003).

No entanto, a produção de azeitonas depende da reprodução sexual bem sucedida (WU-BIAO et al., 2002).

A oliveira é uma espécie alógama que floresce uma vez por ano (SUAREZ et al., 2009). Embora a polinização original da oliveira seja entomofílica, atualmente é considerada anemofílica ou, em alguns casos, mista (anemofílica-entomofílica) (MORETTINI e PULSELLI, 1953). Esta condição foi propiciada pela gestão agrônômica e por altas flutuações anuais na presença ou ausência de quantidades de flores com alta carga de pólen (OTEROS et al., 2013b).

Estudos foram realizados sobre a influência dos fatores ambientais e fisiológicos no florescimento (LAVEE et al., 1996; RAMOS et al., 1996; RAMOS, 2000; DOS SANTOS et al., 2015; SUAREZ et al., 2009; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a). Além disso, são conhecidas a fenologia e o ciclo de floração de algumas cultivares (BARRANCO e RALLO, 1984, RALLO et al., 2005), porém pouco se sabe sobre a reprodução (SUAREZ et al., 2009; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b), apesar do cultivo da oliveira ter grande difusão e aceitação no mundo.

O desenvolvimento da inflorescência começa pela influência das temperaturas do inverno anterior que, devem ser geralmente abaixo de 15,5°C (GARCÍA, 2012; HABERMAN et al., 2017). Por vezes dependendo da variedade, requerem diferentes condições de frio e podem precisar de ao menos 600 horas até 1600 horas a 13°C, enquanto que, outras cultivares florescem quando atingem apenas de 400 horas a 9°C (HARTMANN e PORLINGIS, 1957). A temperatura apropriada para induzir a floração é 12,5°C. O crescimento de brotos começa quando há temperaturas superiores a 21°C por vários dias (GUZMAN e ÁVILA, 2013).

As mudanças de temperatura são importantes para dar uma pausa no crescimento vegetativo e estimular a formação de compostos bioquímicos (como Fósforo e Nitrogênio) e hormonais, que favorecem a formação dos brotos florais no início da primavera ao meio do verão (ALMEIDA e ANTUNES, 2012; WREGE et al., 2015; SANTOS, 2016). Com o aumento da temperatura na primavera entre 15 a 20°C e uma umidade relativa de 60 a 80 % ocorrem à superação da dormência e subsequentemente o desenvolvimento do processo de floração (WREGE et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, a oliveira é uma espécie andromonômica, com flores hermafroditas ou perfeitas (com ovário e anteras) e em menor frequência, estaminíferas ou imperfeitas (apenas com anteras) (FABBRI et al., 2004; SEIFI, 2008; SUAREZ et al., 2009, OTEROS, 2014). A espécie gera um número abundante de inflorescências paniculadas axilares (OTEROS et al., 2013b). Apresentam um eixo central com ramificações que, por sua vez podem ser ramificadas ou não, dependendo da variedade (LAVEE et al., 1996; SUAREZ et al., 2009).

A oferta floral pode durar entre aproximadamente 10 e 15 dias, dependendo da variedade e condições ambientais da área de cultivo (OTEROS, 2014). As inflorescências apresentam assincronia no desenvolvimento, sendo as flores do ápice da inflorescência as últimas a desenvolver antese (SUAREZ et al., 2009). As inflorescências podem ter entre 10 e 35 flores (LAVEE et al., 1996), que podem ser isoladas ou formar grupos de três a cinco flores, dependendo do tamanho da inflorescência e da variedade (LAVEE et al., 1996; SUAREZ et al., 2009; GARCÍA, 2012).

As flores, segundo Suarez et al. (2009), apresentam fórmula floral: $K(4)[C(4)A_2]G$. Isto indica que, apresentam estruturas actinomórficas (com simetria radial regular), de tamanho pequeno, com prefloração valvar, e sem odor (ÖZKAYA et al., 2004; SEIFI, 2008; SUAREZ et al., 2009; GARCÍA, 2012; OLIVEIRA et al., 2015; APARICIO, 2016). Além disso, uma flor pode durar de 3 a 5 dias, fixadas à inflorescência por um pedicelo curto de aproximadamente 1,5 mm (SUAREZ et al., 2009, OTEROS, 2014).

As flores medem aproximadamente 4 a 5 mm, constituídas por uma corola com quatro sépalas verdes, fundidas ou soldadas formando um cálice e quatro pétalas brancas, fusionadas na base, onde também estão inseridos dois estames (ÖZKAYA et al., 2004; SEIFI, 2008; SUAREZ et al., 2009). As anteras de cor amarela são unidas por filamentos com um arranjo oposto intercalado entre duas pétalas e apresentam duas tecas biloculares com deiscência longitudinal por uma fenda central entre as tecas, conhecida como estômio (SUAREZ et al., 2009; GARCÍA, 2012).

Uma flor pode conter uma média de 95.000 grãos de pólen (SILVA e REBOITA, 2014), dependendo da variedade e fatores ambientais (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b). O grão de pólen pode ser esférico com simetria radial ou elipsoidal e medir entre 13 e 31µm de diâmetro (FENDRI, 2011; KOUBOURIS et al., 2012; CHACÓN-ORTIZ et al.,

2022b), e apresenta três sulcos com poros (tricolpado) (TRIGO et al., 2008). Diversos estudos ultraestruturais do pólen foram realizados (FERNANDEZ e GÓMEZ-VALLEDOR, 1985; DOMÍNGUEZ et al., 1993; FERNÁNDEZ e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1994, RODRÍGUEZ-GARCÍA e FERNÁNDEZ, 1990; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b). Além disso, foram realizadas pesquisas sobre as aberturas na parede e formação do tubo de pólen (MAJEWSKA-SAWKA et al., 2002).

No centro da flor encontra-se o pistilo com um ovário súpero (sobre o receptáculo e sobre o ponto de inserção das outras partes florais) composto por dois carpelos fundidos, que dão origem a um ovário bilocular com dois óvulos por lóculo (quatro óvulos). Possui estilo curto e estigma papiloso-bilobado (GARCÍA, 2012; OLIVEIRA et al., 2015), assimétricos entre si, cujo tamanho e forma dependem da variedade (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b).

A fase reprodutiva provou ser uma das etapas mais sensíveis a mudanças de temperatura, que afetam a duração de floração, a germinação do pólen e, em particular na taxa de crescimento do tubo polínico e fertilização (VULETIN et al., 2014). Um período de baixa temperatura antes do desenvolvimento de gemas vegetativas é essencial para superar a dormência. Uma vez que a temperatura limite é atingida e o calor se acumula, ocorre a indução e o início da floração (GALÁN et al., 2001). Embora a temperatura tenha uma influência significativa no crescimento do tubo de polínico em contato com o estilo, e na percentagem da fertilização, a reação depende do genótipo (KOUBOURIS et al., 2009; VULETIN et al., 2013). Uma combinação de altas temperaturas e umidade relativa elevada ou baixa, quando o pólen está exposto nas anteras da flor, reduz o crescimento do tubo polínico e, assim, a sua capacidade de interagir com o estilete do seu homólogo feminino (KOUBOURIS et al., 2009).

Poucos são os estudos encontrados para entender o mecanismo molecular na reprodução das oliveiras, porém, pesquisas têm sido realizadas sobre marcadores bioquímicos e moleculares do desenvolvimento da floração, tais como a função de algumas proteínas (BARRAL et al., 2005, MORALES et al., 2008). Além disso, o transcriptoma da oliveira foi obtido a partir de raízes e meristemas adultos e juvenis (MUÑOZ-MÉRIDA et al., 2013), determinando que o gene *CAF1* codifica uma proteína de 1909 aminoácidos, semelhante a uma helicase, que suprime a divisão celular dos

meristemas florais (JACOBSEN et al., 1991). O gene desconhecido nomeado 22169, com domínios MADS está envolvido no desenvolvimento floral das plantas (CARRERAS, 2014). O gene *Constans Like (CO-LIKE)* induz a floração dependente do fotoperíodo (KOORNNEEF et al., 1991). O gene *supressor de Constans (SOC 1)* codifica dois fatores de transcrição da família MADS, cuja atividade acaba desencadeando transição e desenvolvimento floral, regulando o tempo de floração, os padrões florais e a determinação de meristemas (LIU et al., 2007). O gene *AP1* é necessário para formar os órgãos florais (IRISH e SUSSEX, 1990). Por outro lado, as giberelinas ativam independentemente o *Locus Flowering T (FT)*, a expressão de genes como *LEAFY (LFY)*, um gene de identidade de meristema floral e *SOC1* (BLÁZQUEZ e WEIGEL, 2000; HISAMATSU e KING, 2008).

2.5. Fenologia da oliveira

A obtenção de dados fenológicos é geralmente baseada na atribuição de uma chave para cada estágio de desenvolvimento da planta. O código fenológico padronizado mais comumente usados é o do BBCH (abreviação em alemão para as partes originalmente participantes: "*Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*") (ZADOKS et al., 1974). Cada estágio dessa escala fenológica representa um estado sequencial na evolução dos botões que dão origem aos brotos vegetais ou flores até a formação dos frutos (ROJO, 2014; OTEROS, 2014).

A fenologia é muito útil para conhecer a adaptação de uma planta a condições diferentes das originais (OTEROS, 2014). No caso da oliveira, a fenologia floral estende-se desde o início da brotação, no final do inverno, até à frutificação, no início do verão, analisando todas as fases do desenvolvimento da flor.

A sazonalidade climática anual tem exigido que a oliveira adapte seu crescimento vegetativo e reprodutivo com os padrões anuais em seus ciclos de vida (OTEROS, 2014; ROJO, 2014). O crescimento vegetativo da árvore está intimamente relacionado à temperatura e disponibilidade de água, além das diferentes técnicas de cultivo que são aplicadas (LAVEE, 1996). O crescimento dos botões apicais e axilares dos ramos mais novos ocorre após a dormência de inverno. Com a chegada da primavera e

consequentemente o aumento da temperatura, é gerado o fechamento dos estômatos, que impede as trocas gasosas e a fotossíntese, interrompendo o crescimento. Durante o outono, antes da letargia do inverno, o grau de crescimento costuma ser favorecido por chuvas abundantes (BARRANCO et al., 2008). Portanto, temperaturas extremas e déficit hídrico podem causar danos e interromper o crescimento vegetativo (RAPOPORT et al., 2012).

O ciclo reprodutivo se desenvolve bienalmente, portanto a frutificação é derivada de processos ocorridos durante dois anos consecutivos. A floração ocorre em brotos que se desenvolveram vegetativamente durante a primavera anterior, o que indica que os botões que permanecem dormentes durante a primavera ou que se desenvolvem durante o outono seguinte se desenvolvem como brotos vegetativos (LAVEE, 1996; ROJO, 2014).

Um período de baixa temperatura, seguido de alta, leva à brotação dos botões florais (ROJO, 2014). Na latência ocorre a endolatência, na qual os botões ficam inativos devido às condições fisiológicas da árvore, exigindo o acúmulo de horas de frio para atingir o período de quiescência. Esses botões permanecem inativos devido às condições ambientais desfavoráveis e que requerem o acúmulo de calor para o desenvolvimento dos botões (DE LA ROSA et al., 2000).

Os botões florais são formados nas axilas das folhas dos brotos em crescimento, completando seu desenvolvimento em poucas semanas de forma diferencial, começando nos botões que se localizam no primeiro nó apical até aqueles que se localizam no quarto ou quinto nó. Tem sido observado que as sementes do fruto recém-formado podem inibir a indução floral (FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al., 1992).

No final do inverno ou início da primavera no período quiescente, os botões vegetativos e reprodutivos são claramente identificáveis (DE LA ROSA et al., 2000; ROJO, 2014). No entanto, estudos bioquímicos realizados no outono ou verão em países europeus mostraram diferenças entre os botões reprodutivos e vegetativos (PINNEY e POLITO, 1990).

Na época da floração, as pétalas se desenvolvem primeiro e depois as sépalas, enquanto que o estame começa três semanas depois e o pistilo é o último órgão a se desenvolver (ROJO, 2014). O tempo decorrido desde a formação da primeira até a última

flor não costuma ultrapassar duas semanas (VÁZQUEZ, 2000). Uma vez iniciado esse processo, o botão continua seu desenvolvimento sem interrupção até que a inflorescência se abra e emerja (OTEROS, 2014).

O crescimento inicial da inflorescência é uniforme, atingindo 2cm de comprimento, e a raque começa a se alongar rapidamente. Quando a inflorescência atinge aproximadamente 2/3 de seu comprimento total, o crescimento de cada flor começa. A cor da inflorescência em crescimento é verde, desaparecendo nas pétalas e mudando a branco ou creme pouco antes da antese (VÁZQUEZ, 2000). O número total de flores das inflorescências, sua distribuição na raque e o comprimento da inflorescência são determinados geneticamente em cada cultivar. Porém, esses três caracteres apresentam variabilidade dentro de uma mesma árvore (OTEROS, 2014).

Depois que a floração e a fertilização terminam, as pétalas ficam marrons e caem. Nesse momento, inicia-se o crescimento ovariano e o processo de frutificação (LAVEE, 1996; OTEROS, 2014).

2.6. Manejo da cultura

Existem fatores que influenciam direta ou indiretamente o manejo e a subsequente produção das oliveiras (GUZMAN e ÁVILA, 2013). De acordo com o tipo de clima da região, onde é estabelecida a espécie, o manejo deve ser diferente, já que, embora é geralmente associada a zonas climáticas mediterrâneas com baixas chuvas, invernos amenos e verões quentes; as temperaturas próximas ou abaixo do congelamento e a umidade excessiva e permanente são especialmente perigosas no desenvolvimento da cultura (COI, 2007; TAPIA et al., 2009; FENDRI, 2011; WREGGE et al., 2015).

A maioria dos olivais tradicionais da Europa costuma ter menor densidade de plantio, cerca de 100 árvores ha⁻¹. Desde meados dos anos 70, Espanha e Itália têm proposto a substituição deste tipo de olivais tradicionais por um modelo de cultivo intensivo. Isto tem permitindo o encurtamento do período improdutivo e assim poder realizar mecanicamente todas as operações de cultivo. Portanto, tem sido recomendado que as plantas apresentem um único tronco com distribuição homogênea no terreno (COUTINHO et al., 2009). Recomenda-se olivais preferentemente irrigados, e plantados

em espaçamento de 8,0 x 5,0m, 8,0 x 4,0m e 7,0 x 4,5m para obter uma produção adequada a curto e longo prazo. As linhas de plantio devem ser orientadas na direção Norte-Sul, aproveitando a radiação solar e reduzindo a sombra entre as árvores dentro da plantação (BARRANCO et al., 1999; COI, 2007; COUTINHO et al., 2009). Os solos pouco férteis podem admitir maiores densidades, se for comparado com aqueles de boa fertilidade e similar disponibilidade de água (COUTINHO et al., 2009).

A produção abundante de pólen durante a floração é levada para outras flores por ação do vento. Portanto, a primeira fileira com plantas polinizadoras deve ir de encontro ao vento, de modo que este arraste o pólen até a variedade principal do plantio. O transporte de pólen pelo vento é eficaz apenas até 40 m na direção do vento dominante, de modo que este deve ser o critério principal na marcação das cultivares polinizadoras (COUTINHO et al., 2009).

A oliveira cresce em solos com profundidade de 0,8 a 1,2 m, embora possa tolerar profundidades mínimas de 0,5 m. A cultura prefere solos com textura arenosa e argilosa, que permite permeabilidade adequada, alta retenção e umidade e aeração adequada para o crescimento radicular (GUERRERO, 1991; COI, 2007). Em solos rasos, com textura altamente argilosa, o plantio deve ser feito em camalhões, aumentando artificialmente a profundidade do solo e aumentando a aeração, evitando umidade excessiva, devido à chuva ou irrigação. As dimensões dos camalhões são de 1,5 a 3 m de largura e 0,3 a 0,5 m de altura (GUERRERO, 1991; COUTINHO et al., 2009).

O tempo de plantio mais adequado dependerá das condições climáticas da área, embora seja geralmente recomendado no final do inverno e no início da primavera, antes do início da estação de alta temperatura. Se a muda é de um viveiro, a cova do plantio não deve ser mais profunda do que a altura do recipiente que a contém. Não é necessário aplicar fertilizantes, pois uma alta concentração deles em contato com as novas raízes pode ser tóxica (COUTINHO et al., 2009; GUZMAN e ÁVILA, 2013).

As plantas devem ser regadas com frequência e com pouca água para garantir que o solo ao redor das raízes seja bem compactado, mas sem excesso, pois é muito sensível à asfixia das raízes (GUZMAN e ÁVILA, 2013). A disponibilidade de água deve ser suficiente para cobrir as perdas sofridas pela transpiração da planta que consome aproximadamente 700 a 1.100 mm de água por ano por hectare. A irrigação é importante

em tempos de temperatura mais alta, considerando os estádios de desenvolvimento floral e vegetativo, onde as necessidades hídricas variam (COI, 2007; TAPIA et al., 2009).

Para permitir o crescimento ereto do tronco, é necessário colocar um tutor no momento do plantio. As cordas devem estar levemente soltas para evitar estrangulamento do tronco quando sua espessura aumenta (GUERRERO, 1991).

O estabelecimento de um programa de fertilização é geralmente difícil na oliveira, porque as necessidades nutricionais de uma planta jovem são diferentes das de uma planta adulta. É por isso que testes de análise foliar devem ser aplicados para corrigir os requerimentos nutricionais do momento (IBACACHE, 1986; COI, 2007; COUTINHO et al., 2009). O programa de aplicação deve contemplar a observação das árvores para identificar sintomas de deficiência e monitoramento anual, para manter o nível de nitrogênio nas folhas entre 1,5 e 2 %. A aplicação de 0,5 a 1,0 kg de nitrogênio ao ano por árvore adulta no solo pode garantir um crescimento de 20 a 40 cm das brotações por ano, com um ótimo conjunto de flores e frutos (COI, 2007; GUZMAN e ÁVILA, 2013).

Nas oliveiras, as plantas com deficiência de nitrogênio absorveram mais pelas folhas do que aquelas com ótimo conteúdo do nutriente. No entanto, em estudos usando ureia enriquecida com N15, não foi possível estabelecer uma relação entre o estado nutricional da árvore e a absorção da substância pelas folhas em oliveiras da variedade Manzanillo com suficiência ou em deficiência de nitrogênio (KLEIN e WEINBAUM, 1984; COI, 2007; FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al., 2011; FERNANDEZ-ESCOBAR et al., 2015). Da mesma forma, sprays de ureia a 4 % podem ser aplicados via foliar quando existem dificuldades de absorção pela raiz, principalmente em anos secos, quando os fertilizantes incorporados ao solo são pouco aproveitados e podem causar danos ao aumentar a concentração de íons (IBACACHE, 1986; COI, 2007; GUZMAN e ÁVILA, 2013).

O cálcio é absorvido pelas pontas das novas raízes, portanto, qualquer fator que limite o crescimento de novas raízes pode reduzir sua absorção. Antes de corrigir a falta de cálcio, deve-se levar em consideração qual é a causa do baixo nível de cálcio nas folhas, portanto, as aplicações foliares de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 0,5 % podem ajudar a corrigir uma possível deficiência (IBACACHE, 1986; COI, 2007).

Geralmente, as oliveiras têm baixos níveis de potássio nas folhas, o que pode ser causado por solos pobres, temperatura ou umidade do solo, carga de árvores ou

interações com cálcio e magnésio. As plantas de oliveira pulverizadas com concentrações de KCl (0,2 e 4 %) têm apresentado respostas positivas e a absorção pelas folhas tem sido maior em folhas jovens do que em folhas maduras (IBACACHE, 1986; SOUTHWICK et al., 1996; RESTREPO-DÍAZ et al., 2009). Experimentos demonstram que o teor de potássio nas folhas aumenta significativamente à medida se utiliza uma solução nutritiva com baixo nível de K (KCl 0,05 mM) (COI, 2007; RESTREPO-DÍAZ et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2015).

Baixos níveis foliares de fósforo podem estar associados a solos pouco drenados ou a falta do elemento químico no solo. Nesse caso, 0,5 kg podem ser aplicados à planta na forma de superfosfato (IBACACHE, 1986). No entanto, alguns autores têm sugerido que a deficiência de fósforo nas oliveiras é rara, portanto, a adubação não é uma prática lucrativa (COI, 2007; COUTINHO et al., 2009).

A oliveira apresenta alta exigência de boro. As aplicações foliares do boro desempenham um papel importante no aumento da germinação do pólen, crescimento do tubo do pólen e o desenvolvimento dos frutos (PERICA et al., 2001; COI, 2007; FERNANDEZ et al., 2015).

A matéria orgânica é usada como um complemento com o objetivo de melhorar a aeração em solos argilosos e aumentar a retenção de água em solos com textura arenosa. Recomenda-se a aplicação de 20 toneladas por hectare (GUERRERO, 1991).

Em relação à poda, o objetivo é atingir um mínimo de madeira estrutural com um grande número de galhos jovens de 20 a 30 cm, criando espaços para a entrada de luz e ar (COUTINHO et al., 2009; GUZMAN e ÁVILA, 2013). As práticas de poda devem ser equilibradas entre crescimento e frutificação da planta, idade da plantação, colheita do ano anterior, destino da colheita (azeitona de mesa ou azeite), densidade da plantação e tamanho das árvores, podendo assim decidir se realizar ou não a prática em um determinado ano e determinar sua intensidade (BUENO et al., 2014). No período de não produção de frutas, é necessário podar pouco, para formar uma estrutura que suporte colheitas abundantes no menor tempo possível. A poda começa no viveiro, onde a nova árvore permanece de 8 a 24 meses. Uma planta de eixo único deve ser formada com uma altura mínima de 0,8 m e após continuar no campo (COUTINHO et al., 2009; BUENO et al., 2014). No período adulto, a poda é leve para manter um equilíbrio entre

boa produção e qualidade em conjunto com o desenvolvimento vegetativo adequado. Esse tipo de poda mantém uma relação entre a folha e a madeira alta; portanto, as intervenções de poda devem ter como objetivo melhorar a iluminação dentro da copa, facilitando as operações de colheita (COUTINHO et al., 2009; GUZMAN e ÁVILA, 2013; BUENO et al., 2014).

Nas árvores antigas, o objetivo é substituir os galhos que apresentam sinais de decadência por meio de podas intensas, mas espaçadas por períodos relativamente longos para a reconstituição do dossel das árvores (GUERRERO, 1991). Esse tipo de poda é realizado entre 20 e 40 anos, dependendo do manejo agrônomico (COUTINHO et al., 2009; GUZMAN e ÁVILA, 2013). Além disso, uma poda contínua é realizada em olivais com folhagem abundante, mas com pouco crescimento de galhos ou em oliveiras enfraquecidas pela deficiência de irrigação e fertilização. Também é realizada durante todo o ciclo produtivo, renovando a cada 4 a 5 anos um dos principais ramos com mais de 15 anos (COUTINHO et al., 2009; GUZMAN e ÁVILA, 2013; BUENO et al., 2014).

A forma intensiva de plantio das oliveiras implica maior uniformidade varietal, pois apenas as “melhores” se espalharam. Porém, um sistema planejado de irrigação, fertilizantes e densidades do plantio mais altas, também levou a uma maior dificuldade no controle de pragas e doenças. Um exemplo é a verticiliose (*Verticillium dahliae*), que há 30 anos em modelos tradicionais não era considerada uma doença de impacto, e hoje é a doença mais grave nos estádios juvenis (TRAPERO et al., 2011).

Dentre as principais doenças da oliveira, destacam-se as que afetam folhas e frutos, como o repilo ou olho de pavão (*Fusicladium oleagineum*). É uma doença que se caracteriza por apresentar manchas circulares de tamanho variável e cor marrom-escura na superfície superior das folhas e frutos, com um halo amarelo, que resulta em deformação quando o crescimento da área é afetado, causando sua queda (ANDRÉS, 1991).

A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum simmondsii* e *Colletotrichum acutatum*) é uma doença que ataca os frutos e ocorre em áreas úmidas. Possui aparência de sabão na podridão, e causa uma grave deterioração na qualidade do óleo, dando origem aos chamados óleos coloridas (COUTINHO et al., 2009; TRAPERO et al., 2011).

O emplomado ou cercosporiose (*Pseudocercospora cladosporioides*) é uma das doenças menos conhecidas pelos agricultores e geralmente é confundida com repilo, antracnose ou com uma deficiência de potássio. Caracteriza-se por apresentar uma coloração acinzentada na parte inferior das folhas, além de pontos cloróticos marginais que tendem a necrose (TRAPERO e BLANCO, 2008).

A fumagina (*Capnodium elaeophilum*) é uma doença caracterizada pela formação de uma camada preta superficial, semelhante à fuligem, e ocorre nas folhas, ramos e tronco e, às vezes, nos frutos. Essa doença dificulta várias funções fisiológicas dos tecidos afetados e deteriora o vigor (TRAPERO et al., 2011). Geralmente está associado a infestações por cochonilha (*Saissetia oleae*) (TRAPERO et al., 2011), que sugam a seiva e excretam muitas substâncias açucaradas que impregnam a oliveira e serve de alimento para o fungo (COUTINHO et al., 2009).

Podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*) ocorre tanto nas azeitonas verdes quanto nas maduras, e consiste em lesões necróticas arredondadas e deprimidas, limitadas por uma borda mais escura, que causa sua queda. Os sintomas podem ser confundidos com antracnose ou com emplomado (ROCA et al., 2007).

Verticiliose (*Verticillium dahliae*), uma doença que apresenta duas síndromes diferentes chamadas "mortes rápida" e "decaência lenta". O primeiro é uma morte de galhos ou de toda a planta. As folhas permanecem unidas e destacam-se após uma perda de cor verde que progride do final para a base dos galhos. O decaimento lento é característico da dessecação das inflorescências, que permanecem aderidas, enquanto as folhas se destacam ainda verdes, sem alteração de cor (LÓPEZ-ESCUADERO e MERCADO-BLANCO, 2010).

As oliveiras localizadas em locais com alagamento são afetadas por *Phytophthora* spp. Esse fungo infecta as raízes finas absorventes, causando necrose do tecido cortical, espalhando-se por todo o sistema radicular e para a base do tronco, onde pode ser detectado por um crescimento amarelo, desfolhamento, secagem apical dos galhos, murcha e morte da árvore (SÁNCHEZ et al., 2008).

A bacteriose conhecida como tuberculose (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), também pode ser chamada de verrugas, galhas ou tumores, devido aos sintomas característicos desta doença. As oliveiras afetadas mostram menos vigor e o

fruto tem um sabor amargo, rançoso ou salgado que reduz a qualidade do óleo (TJAMOS et al., 1993; TRAPERO et al., 2011).

Pelo menos 70 espécies de nematóides fitoparasitários, pertencentes a 33 gêneros, têm sido associadas a raízes de oliveira; no entanto, a natureza patogênica dessas associações apresenta pouca informação (TJAMOS et al., 1993; CASTILLO et al., 2010; TRAPERO et al., 2011). Os principais patógenos são *Meloidogyne*, que forma nódulos radicais, *Pratylenchus*, que apresenta lesões corticais radicais, *Helicotylenchus* que gera necrose nas raízes e *Tylenchulus* que causa a morte de raízes absorventes (TRAPERO et al., 2011).

Margaronia (*Palpita unioralis*) é uma traça, também conhecida como lagarta dos brotos, que ataca as brotações novas, porém quando há grande população da praga também atacam racimos florais, flores e azeitonas verdes. Pode ser reconhecida devido à aparência queimada dos ramos e as folhas raspadas ou comidas e grudadas por pequenos fios de seda (COUTINHO et al., 2009).

A mosca da oliveira (*Bactrocera oleae*) é uma espécie de díptera cujas larvas se alimentam da polpa do fruto da azeitona. Sua distribuição coincide com a da oliveira, sendo considerada a praga mais problemática do cultivo (DEL RIO, 2003). Também podem causar problemas as formigas dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, e *Mycocepurus*, que atacam as folhas, causando desfolhamento parcial ou total, causando a morte de plantas jovens (COUTINHO et al., 2009).

O uso de cultivares resistentes é o método mais eficaz para o controle de doenças. A resistência do hospedeiro é uma característica controlada geneticamente, que restringe a infecção e / ou colonização do patógeno (TRAPERO et al., 2011). Atualmente, é gerenciado um tipo de olival orgânico que resulta na não utilização de produtos fitossanitários sintéticos. Entretanto, no caso de doenças, as diferenças com o manejo convencional são mínimas, já que a maioria dos tratamentos químicos utilizam sais de cobre, ecologicamente aceitos (TRAPERO et al., 2009a, 2009b; TRAPERO et al., 2011).

2.7. Alternância na produção “*Vecería*”

A oliveira, como outras árvores frutíferas, sofre o fenômeno tradicionalmente conhecido como “*vecería*”. Esta espécie apresenta um padrão alternado na intensidade de floração em condições ambientais padrão, o que resulta em marcada alternância de produção de frutos (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a). O padrão bianual na intensidade da formação dos órgãos do ciclo reprodutivo nas oliveiras corresponde a um comportamento inverso do crescimento vegetativo, pelo que nos anos de “carregamento” de frutos, o crescimento vegetativo é inferior aos anos de “descarregamento” (SEIFI et al., 2015). A produção de frutos e as características fenológicas desta espécie são as principais responsáveis pela ocorrência de “*vecería*” devido a três aspectos. Em primeiro lugar, o fruto possui um mecanismo de controle que influencia a indução floral dos botões (FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al., 1992). A carga de frutos induz a produção de ácido clorogênico pelas folhas, o que inibe a indução reprodutiva das gemas (LAVEE, 1988; RYAN et al., 2003). Em segundo lugar, o crescimento dos órgãos vegetativos e dos órgãos reprodutivos ocorre ao mesmo tempo, essa sobreposição fenológica é responsável pela existência de uma grande competição entre ambos os órgãos por fotoassimilados. O fruto da oliveira desenvolve-se no rebento vegetativo de um ano formado na época anterior. Portanto, o comprimento desta parte aérea é um fator determinante no potencial de frutificação na safra seguinte (CUEVAS et al., 1994). Em terceiro lugar, também foi detectado que a viabilidade das flores nas inflorescências e a porcentagem de frutificação será menor após um ano “carregado” (LAVEE, 2007). É notável o fato de que dentro de uma determinada população podem coexistir árvores que apresentam “*veceria*” assíncrona entre elas, e mesmo dentro de uma mesma árvore galhos podem ser encontrados em contra-alternância (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a). Além disso, como já mencionado, esse ciclo alternado é influenciado por condições meteorológicas que podem rompê-lo por vários anos. Por outro lado, um evento climático extremo pode servir como ponto de partida para iniciar uma sincronia na “virada” das árvores da área. Técnicas de cultivo estão sendo aplicadas recentemente com o objetivo de reduzir esse comportamento: irrigação, colheita precoce ou “raleio artificial de frutos” (DAG et al., 2010).

Estudos feitos sobre a herdabilidade nas oliveiras têm demonstrado que a produção de frutos e suas características para as diferentes cultivares, apresentam valores elevados de H^2 , entre 0,98 e 0,99, indicando que cada cultivar apresenta estabilidade genotípica e aparentemente é pouco influenciada pelo ambiente. No entanto, quando os valores de herdabilidade foram avaliados individualmente dentro de cada cultivar, apresentaram grande influência do ambiente (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022a).

2.8. Cultivares mais utilizadas

O interesse em preservar e catalogar as cultivares de oliveiras foi proposto no Congresso Internacional do Azeite, em Sevilha, no ano 1924, residindo os maiores problemas das coleções na representatividade das cultivares e na sua confusão nas denominações (FONTAO, 2014).

Existe mais de 1275 cultivares descritas em todo o mundo, com mais de 3000 sinonímias e homonímias em ao menos 56 países (BARTOLINI et al., 1998; ÖZKAYA et al., 2004; SEIFI, 2008; PEREIRA, 2015; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b). Os fenótipos das cultivares de oliveira são altamente influenciados pelas flutuações ambientais, definindo as características particulares de seus produtos e subprodutos (MATÍAS et al., 2010). Portanto, ainda há muita confusão e incerteza sobre a identidade das cultivares (ALBA et al., 2009).

Poucas cultivares de oliveiras são as mais cultivadas, já que menos de duzentos genótipos são responsáveis por mais de 90 % da produção mundial, enquanto que aproximadamente mil cultivares produzem menos de 10 % do total (COI, 2020). A caracterização e identificação das cultivares de oliveiras foram historicamente baseadas no uso de um número importante de características morfológicas e agrônômicas adotados pelo Conselho Oleícola Internacional (COI, 2020). O vigor da árvore, precocidade, produção, enraizamento, suscetibilidade a doenças ou pragas, folhas, frutas e caracteres do endocarpo geralmente são parte dos caracteres mais usados para essa caracterização (BARRANCO e RALLO, 1984).

Mais tarde, seguiu pela análise de isoenzimas em amostras no pólen, onde discriminaram 132 cultivares (TRUJILLO et al., 1995), mencionando-se neste trabalho apenas a Arbequina, Ascolana Tenera, Barnea, Bouteillan, Carolia, Chemlali, Cornicabra, Frantoio, Galega, Koroneiki, Leccino, Lechin de Sevilla, Manzanilla, Moraiolo, Pendolino, Picholine, Picual, por ser cultivares utilizados no Brasil para sua produção. No Brasil, embora diversas instituições de pesquisa e Universidades gerem novas cultivares potenciais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Portaria MAPA nº 502, de 19 de outubro de 2022 é o órgão determina as regras para o estabelecimento e reconhecimento de cada genótipo.

Atualmente, a caracterização das cultivares de oliveira está baseada em caracteres fenotípicos acompanhados de um conjunto de marcadores moleculares, garantindo diferentes níveis polimórficos (GANINO et al., 2006) e baixa dependência das condições ambientais e fenológicas (DE LA ROSA et al., 2002). A identificação com base em ferramentas moleculares acessa uma importante diversidade de recursos genéticos de bancos de germoplasma da oliveira, que pode ser utilizada para o desenvolvimento de cultivares e para sua caracterização de forma correta (SAKAR, 2016). Diversos pesquisadores mencionam que uma adequada seleção de poucos marcadores microssatélites altamente polimórficos são necessários para identificar e diferenciar mais de 100 genótipos, com o mínimo de 3 ou 4 e o máximo de 14 alelos por marcador, com uma média de 8,6 a 9 (OMRANI-SABBAGHI et al., 2007; TAAMALI et al., 2008; VAL, 2011). A similaridade dos resultados pode ser interpretada de acordo com o tamanho e a origem do germoplasma, assim como ancestrais comuns das diferentes cultivares, reduzindo a variabilidade genética do grupo (VAL, 2011).

Na Espanha, o país com maior produção, existem mais de 1000 acessos das cultivares identificadas, provenientes de 29 países, mantidas e conservadas no Banco de Germoplasma de oliveiras em Córdoba (GÓMEZ-GÁLVEZ, 2018). O trabalho de prospecção de cultivares de oliveira, realizado na Espanha revelou a grande riqueza que possuem, onde foram descritas 262 cultivares (BARRANCO e RALLO, 2000), com predominância de 10 principais, incluindo 'Picual', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Sevilla', 'Arbequina', 'Manzanilla de Sevilla', 'Morisca', 'Empeltre', 'Manzanilla Cacereña' e 'Picudo' (BARRANCO e RALLO, 2000; GÓMEZ-GÁLVEZ, 2018).

A maioria das cultivares é limitada apenas à sua distribuição original; no entanto, algumas como 'Manzanilla de Sevilla' são famosas em todo o mundo, pois é a mais amplamente usada para processamento como azeitonas de mesa. Embora muitas cultivares apresentem características indesejáveis para uma indústria de azeitonas moderna, as vantagens de algumas cultivares são utilizadas em cruzamentos, projetando que novas cultivares possam estar disponíveis nos próximos anos (BARRANCO e RALLO, 2000).

A procura de novas identidades do azeite virgem, devido à globalização do mercado, tem gerado um interesse crescente na introdução de novos olivais com cultivares diferentes das atuais (CUEVAS et al., 2016; CHIAPETTA et al., 2017). Nos últimos anos, plantações com maiores densidades foram introduzidas com 'Picual' e 'Arbequina', e existe um interesse crescente em introduzir cultivares diferentes para obter óleos diferenciados ou fazer coupages (CUEVAS et al., 2016).

Nos países sul-americanos com produção de oliveiras, os problemas de homonímia e sinonímia continuam. A confusão é causada pela segregação das oliveiras devido a multiplicação de sementes e a importação maciça e descontrolada de plantas nas décadas dos anos 60 e 80, incorporando cultivares de Israel, Estados Unidos, Grécia, Itália e Espanha (MATÍAS et al., 2010). Em países vizinhos ao Brasil como na Argentina, as cultivares mais difundidas são 'Arbequina', 'Manzanilla', 'Picual', 'Frantoio', 'Coratina' e, em menor escala, 'Empeltre', 'Barnea', 'Leccino' e 'Changlot Arauco' (BRAVO et al., 2004; SILVA, 2011; GARCIA, 2012). No Uruguai, possuem um catálogo recente, com 11 cultivares para produção de óleo, mencionando algumas cultivares como 'Arbequina', 'Arbosana', 'Canino', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Leccino', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Pendolino', 'Picholine' e 'Taggiasca', assim como 13 cultivares para fins duplos, como 'Alfafara', 'Arauco', 'Ascolana', 'Bosana', 'Carolea', 'Carrasqueña', 'Coratina', 'Farga', 'Grignan', 'Itrana', 'Manzanilla de Sevilla', 'Picual' e 'Tanche' (CONDE et al., 2019).

Dada a crescente demanda por produtos derivados da oliveira, várias instituições no Brasil estão trabalhando com cultivares capazes de lidar com as condições edafoclimáticas brasileiras. Apesar de algumas cultivares apresentarem divergência em sua produção e qualidade, os óleos obtidos estão dentro dos limites de qualidade, nos

quais são: acidez em ácido oleico com valor máximo 0,8; Índice de peróxido máximo 20,0; Índice de iodo entre 75,0 – 90,0; Índice de refração absoluto entre 1,4677 – 1,4705; absorvância em ultra violeta máxima de 0,22 e Resolução n. 270 máxima de 2,5, estabelecidos pelo Conselho Oleico Internacional (FARIA-MACHADO et al., 2019). No Rio Grande do Sul, são cultivadas principalmente ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, ‘Picual’, ‘Frantoio’, ‘Koroneiki’, ‘Grapollo’, ‘Coratina’, ‘Manzanilla’ e ‘Ascolana’ (SEAPDR, 2020). No entanto, as informações tratadas no País estão dispersas e não há uma direção clara sobre a escolha e exploração de cultivares.

Recentemente no Brasil foram feitos estudos sobre o uso de caracteres ultramicroscópicos de pólen e pistilos, a fim de identificar com maior precisão as principais cultivares no Rio Grande do Sul. Os caracteres avaliados apresentaram estabilidade dentro da cultivar, além de mostrar diferenças quando eram analisadas entre pares de cultivares diferentes (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b).

Diferentes cultivares são utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. A ‘Arbequina’, é uma cultivar para produção de azeite, de origem catalã, e deve seu nome ao povo Arbeca, na província de Lérida, Espanha (MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018). Apresenta sinônimos como ‘Arbequí’, ‘Arbequín’, ‘Blancal’, ‘Herbequín’, ‘Oliva de Arbela’, ‘Oliva de Borjas Blancas’ (COI, 2000). Tem sido considerada rústica por sua tolerância ao frio, seca e salinidade. No entanto, é suscetível à clorose de ferro em solos calcários (MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018). Árvores de vigor médio a baixo, mancal aberto, coroa alta e globosa com folhas elípticas-lanceoladas com bordas arqueadas, tamanho curto de 50 x 6 mm, verde escuro brilhante e pecíolo de 5 mm. Apresenta produtividade constante e a precocidade ao quarto ano tem permitido seu uso em plantações intensivas. Entretanto, o tamanho pequeno e a resistência média ao descolamento dificultam a colheita mecanizada com agitadores (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018; CONDE et al., 2019). Floresce abundantemente e prolonga-se no período intermediário, sendo considerada autocompatível (COI, 2000; COUTINHO et al., 2009), embora há evidências do contrário (SÁNCHEZ-ESTRADA e CUEVAS, 2018). Os frutos pesam de 1 a 2,5 g, de forma esférica a ligeiramente elíptica, ápice redondo e base truncada, o caroço não possui estrias. É apreciado pela qualidade de seu azeite, cujo teor oleico está entre 61 e 67 %, com baixa estabilidade devido às características organolépticas entre 70 e 130

ppm (MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). Considera-se sensível à mosca da oliveira, repilo (*Spilocaea oleaginea*) e verticilose (*Verticillium dahliae*), mas tolerante à tuberculose (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018; CONDE et al., 2019).

'Arbosana' é uma cultivar para produção de azeite, originária de Penedés, Catalunha, Espanha. Recebe seu nome da população de Tarragona de l'Arboç (MAS, 2018). Utilizada complementarmente à 'Arbequina', embora seja considerada menos interessante devido à sua baixa resistência ao frio (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018). Apresenta árvores com baixo vigor, rolamento aberto e folhas de forma elípticas. A alta precocidade para a produção de frutos a partir do terceiro ano permitiram seu uso em plantações semi-intensivas. No entanto, sua alta densidade, tamanho pequeno e resistência ao destacamento dificultam a colheita mecanizada com agitadores (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018; CONDE et al., 2019). O fruto pesa 1,5 a 3 g, de forma esférica, com ápice e base redondos. É apreciado pela qualidade de seu azeite muito semelhante ao da 'Arbequina', com teor de ácido oleico de 69 % e fenóis de 170 a 300 ppm, embora menos frutado (CONDE et al., 2019). Considera-se sensível à tuberculose e a verticiloses, mas altamente tolerante ao repilo (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; MAS, 2018; CONDE et al., 2019).

O genótipo 'Frantoio' é variedade originária das regiões centrais da Itália. Seu nome vem da tradução do dialeto italiano que significa "moinho de óleo". Apresenta sinônimos como 'Bresa Fina', 'Comune', 'Corregiolo', 'Crognolo', 'Frantoiano', 'Infrantoio', 'Laurino', 'Nostrato', 'Oliva Lunga', 'Pendaglio', 'Pigantello', 'Raggio', 'Raggiolo', 'Rajo', 'Razza', 'Razzo', 'Solciaro', 'Stringona' (COI, 2000). Variedade vigorosa, sensível a áreas frias ou quentes. Com alta e constante produtividade é altamente adaptável a muitos ambientes. Coroa larga, densa e semi-pendular, com folhas grandes e de forma variada e irregular, predominantemente elíptica, alargada no terço superior. Apresenta produção tardia, no quinto ano, com um período intermediário de floração e uma baixa porcentagem de ovários abortados. Autocompatível, melhora a produtividade com a presença de polinizadores adequados (COI, 2000; COUTINHO et al., 2009; MATÍAS et al., 2010, CONDE et al., 2019). Os frutos pesam entre 1,5 e 3 g, ovais, ligeiramente alargados no ápice (semelhante a uma gota da água) e com abundantes lenticelas. O caroço é grande, curvo com estrias. Óleos altamente apreciados, cujo conteúdo oleico

varia entre 67 e 72 % e uma alta concentração de fenol entre 150 e 230 ppm. Muito frutado e duradouro (MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). É sensível à podridão branca e mosca da oliveira, no entanto, o interesse por sua resistência a verticiliose tem sido estudado (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019).

'Koroneiki' é uma variedade usada para extração de azeite, originária das regiões do Peloponeso, Creta e Egeu na Grécia, é a mais difundida nesse país, em mais da metade do território. Seu nome vem de várias denominações que indicam o local de origem "κρητικ", que significa cretense. Apresenta sinônimos como 'Cretan', 'Koroni', 'Kritikia', 'Ladolia', 'Lianolia', 'Psilolia', 'Vaciki' (COI, 2000; MAS, 2018). Geralmente é comparado à 'Arbequina', porém apresenta pouco sucesso em áreas frias, sendo resistente à seca (MAS, 2018). Variedade de vigor médio-baixo, com mancal aberto e ereto, fácil de podar, com formato de folha elíptico-lanceolada. Inicia a floração precocemente, aproximadamente até o quarto ano, considerando-se um bom produtor de pólen. O amadurecimento é médio-tardio, sendo alto e constante (COI, 2000; COUTINHO et al., 2009; MAS, 2018; CONDE et al., 2019). Os frutos pesam entre 0,5 e 2,5 g, com ápice e base pontiaguda, superfície lisa. Seu azeite é altamente apreciado, estável e rico em ácido oleico, variando entre 66 e 72 % e compostos fenólicos entre 200 e 300 ppm, o que lhe confere propriedades amargas e picantes, além de grande estabilidade no tempo (CONDE et al., 2019). Moderadamente resistente a verticiliose, mas é sensível à tuberculose (COI, 2000; MAS, 2018; CONDE et al., 2019).

'Manzanilla de Sevilha', uma cultivar de dupla finalidade (azeitonas de mesa e azeite), originária de Sevilha, Badajoz e Huelva, Espanha, sendo a variedade espanhola mais difundida internacionalmente. Deve seu nome à sua forma de maçã em crescimento. Apresenta sinônimos como 'Manzanilla de Carmona', 'Sevillana', 'Redondil', 'Romerillo', 'Chorrúo de Espiga', 'Larga', 'Manzanilla Basta', 'Manzanilla Blanca', 'Manzanilla Común', 'Manzanilla de Dos Hermanas', 'Manzanilla Rabuda', 'Manzanillo Fino', 'Manzanillo Temprano', 'Varetuda' (COI, 2000). É uma cultivar de vigor reduzido, com galhos verticais com pouca folhagem e difícil de manejar, com folha grande, alongada, de forma elíptica, fina e brilhante, embora a estrutura da árvore tende a mostrar o lado de fora da folha, dando uma aparência acinzentada. É suscetível à asfixia radical, clorose de ferro se cultivada em solos calcários, ambientes frios e úmidos,

preferindo locais com seca extrema, onde se adapta em plantações intensivas. Suas folhas são elípticas (COI, 2000; COUTINHO et al., 2009; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). O período de maturação é precoce (quarto ano) e os frutos apresentam alta resistência à queda da árvore. Não necessita de polinizadores, no entanto, melhorias na produtividade têm sido observadas quando a polinização cruzada ocorre em áreas de baixa presença de oliveiras, sendo sua floração precoce (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). O fruto pesa 2,5 a 6 g, de forma esférica, com ápice redondo e base truncada, com numerosas lenticelas e caroço centralizado. O ácido oleico varia entre 65 e 74 % e a quantidade de fenóis está entre 110 e 200 ppm (MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). Muito sensível a verticiliose, tuberculose e mosca (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019).

A cultivar 'Picual' é nativa de Jaén, sendo considerada a mais importante da Espanha e, portanto, do mundo, com quase 900.000 hectares plantados. Deve seu nome ao ápice pontiagudo dos seus frutos. Apresenta sinônimos como 'Andaluza', 'Jabata', 'Marteño', 'Lopereño', 'Morcona', 'Mollejona', 'Nevado', 'Nevado Blanco', 'Picúa', 'Picudilla', 'Pico de Gula', 'Pico Real', 'Salgar' (COI, 2000). Tem apresentado boa adaptação na Austrália, Estados Unidos, Argentina, Uruguai e Brasil (COI, 2020). Variedade de vigor médio-alto, porte ereto, aberto e denso com entrenós curtos. Suas folhas são lanceoladas elípticas com uma superfície plana. É considerada rústica devido à sua adaptação a diferentes condições como frio; salinidade e excesso de umidade no solo (COI, 2000; OLIVEIRA et al., 2003; COUTINHO et al., 2009; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). No entanto, é sensível à aridez e aos solos calcários e tem sido observado esfolamento elevado quando há chuvas em excesso (COI, 2020). Precoce, entra em produção no terceiro ou quarto ano, e é considerada uma cultivar autocompatível. O amadurecimento do fruto é precoce, apresenta uma resistência reduzida ao descolamento de frutos, o que facilita a colheita mecanizada (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019). O fruto pesa de 2 a 4,5 g, tem forma elíptica, alongada e assimétrica, com lenticelas e um ápice que se projeta obliquamente (mamilo). O óleo é de qualidade média, com teor de ácido oleico entre 67 e 75 %; embora com alto índice de estabilidade, possui alto teor de fenol entre 150 e 220 ppm (MATÍAS et al.,

2010; CONDE et al., 2019). Tolerante à tuberculose e à podridão branca (COI, 2000; MATÍAS et al., 2010; CONDE et al., 2019).

2.9. Problemas de produtividade em regiões fora da Bacia do Mediterrâneo, especialmente no Rio Grande do Sul

Na bacia do Mediterrâneo, centenas de cultivares da oliveira têm sido selecionadas por sua adaptação a vários microclimas e tipos de solo. No entanto, nas grandes áreas de cultivo está presente apenas Picual (BARRANCO, 1995), motivo pelo qual alguns autores recomendam que sejam misturados com outras cultivares, que atuam como polinizadores. A utilização de várias cultivares em uma área garante um bom conjunto de frutos viáveis, evitando, assim, a formação de frutos partenocárpicos "*shotberries*", propensos à abscisão e sem valor comercial, sendo isto consequência de plantas auto fertilizadas (CUEVAS e PINILLOS, 2006).

As avaliações de autocompatibilidade em diferentes cultivares mostraram resultados altamente variáveis em relação à sua produtividade, quando diferentes anos e locais são comparados (CUEVAS e PINILLOS, 2006; LAVEE et al., 1996). Esses resultados são ainda mais incertos quando se soma o fato de que existem diferenças consideráveis dentro da mesma cultivar analisada, sendo o grau de autoincompatibilidade altamente variável (LAVEE et al., 1996; WU-BIAO et al., 2002). Isso permitiu propor um mecanismo de "pseudocompatibilidade", influenciado pelas condições ambientais (ALAGNA et al., 2019).

O grau de autoincompatibilidade na oliveira é discutível. Na Itália, muitas cultivares são consideradas autoincompatíveis (ANTOGNOZZI e STANDARDI, 1978; DEL RIO, 2003). No entanto, na Espanha, pelo menos um terço das mesmas cultivares são consideradas parcialmente autocompatíveis (CUEVAS, 1992; CUEVAS et al., 2001; CUEVAS e POLITO, 2004). Assim, as tentativas de desenvolver novas cultivares têm sido esporádicas e complicadas (ARSEL e CIRIK, 1994; LAVEE et al., 1996).

Estudos sobre a identificação de cultivares compatíveis deram resultados contraditórios, provavelmente devido às diferentes condições ambientais do estudo ou, às vezes, à confusão na identidade da cultivar (MEKURIA et al. 1999). Algumas

cultivares, como 'Moraiolo', 'Arbequina' ou 'Manzanilla', têm sido contraditoriamente identificadas como autocompatíveis (SINGH e KAR, 1980; SIBBETT et al., 1992; COI, 2000; COUTINHO et al., 2009) e autoincompatíveis (CUEVAS e POLITO, 1994; SÁNCHEZ-ESTRADA, 2018). Além disso, a autocompatibilidade e a resposta aos doadores de pólen podem variar de acordo com o ano (LAVEE et al., 1996).

Na Espanha, programas de melhoramento da oliveira foram gerados na busca e desenvolvimento de novas cultivares, a fim de substituir as vastas extensões das variedades únicas 'Picual' (RALLO, 1995). No entanto, as novas cultivares têm apresentado dificuldades no desenvolvimento de um bom sistema de cruzamento, uma vez que a maioria das progênes apresenta semelhanças fenotípicas com a planta mãe em vez da planta doadora de pólen (LEÓN-MORENO, 2002), que sugere um alto potencial de auto-cruzamento (ALAGNA et al., 2019).

O fato de a oliveira ser autoincompatível pode marcar a dependência da polinização cruzada, e dificultar a tendência de utilização de apenas uma cultivar para aumentar a uniformidade dentro das plantações. Nessas condições, vários autores propõem a polinização artificial como alternativa temporária ou definitiva, que pode ser adaptada para plantações grandes ou superintensivas (TOUS et al., 2003). Para isso, métodos eficientes e econômicos devem ser desenvolvidos para a coleta de grandes quantidades de pólen, manutenção, armazenamento a -20°C e manutenção da viabilidade (RUIZ et al., 2018). Além disso, uma identificação da planta doadora de pólen deve ser feita usando técnicas moleculares (DE LA ROSA et al., 2002).

Nas últimas décadas, o olival espanhol sofreu importantes mudanças tecnológicas, destacando o aumento da densidade das plantações, associado a uma melhoria na mecanização da colheita. Para reduzir os custos de produção, passou de sistemas intensivos de 200 e 300 árvores ha^{-1} e coleta por vibrador de tronco, para um sistema superintensivo, com densidades acima de 1.500 árvores ha^{-1} , de onde há colheita de forma contínua, por meio de máquinas montadas acima das árvores (TOUS et al., 2003). Esse tipo de cultivo faz que, a partir do sexto ou sétimo ano, diminua a produção, devido à falta de iluminação e aeração dentro das árvores, causando maior incidência de pragas e doenças, além de torná-los mais suscetíveis a estresses abióticos (COI, 2007).

Fatores ambientais como temperatura podem afetar a germinação do pólen, influenciando drasticamente a produtividade e gerando sérios impactos econômicos (DANTAS et al., 2005; RODRIGUEZ-ROJAS et al., 2015). A alta variação na expressão floral entre anos (LAVEE et al., 1996) e cultivares (SEIFI et al., 2008) é somado às exigências nutricionais (COI, 2007) e o comportamento bienal (LAVEE et al., 1996). Estudos associaram a temperatura à indução e diferenciação dos botões florais (FABBRI e BENELLI, 2000) e à produção de frutas (AYERZA e COATES, 2004).

Especificamente, a oliveira requer áreas com baixos índices de chuva e frio no inverno. No entanto, no Brasil, dificilmente essas duas condições ocorrem simultaneamente no mesmo lugar. Diversos têm sido os esforços de pesquisa nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais e algumas áreas localizadas na região do semi-árido, para organizar zonas edafoclimáticas e agroclimáticas relacionadas com as necessidades ecológicas e de produção da oliveira (WREGGE et al., 2011; 2015). Geralmente, as áreas frias, como as regiões montanhosas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, têm umidade relativa alta e grande taxa de precipitação, os quais apresentam problemas na época de floração, onde os grãos de pólen se tornam inviáveis, e, portanto, não ocorre a formação dos frutos (WREGGE et al., 2015). As áreas com menor taxa de precipitação são zonas mais quentes, como a região do semi-árido do nordeste brasileiro, em que a precipitação está em torno de 600mm. Porém, a região não atende as horas de frio acumuladas durante o inverno, necessárias para a indução de gemas e diferenciação folha/flor.

No cultivo de oliveiras, o uso da irrigação, geralmente combinado com técnicas mais modernas e métodos intensivos de produção é recomendado (BARRANCO e RALLO, 2000), questão que seria muito benéfica para o Brasil, que já conhece as condições climáticas existentes.

2.10. Melhoramento da oliveira

A oliveira é um estudo de caso complexo na domesticação de árvores frutíferas (SKODRA et al., 2021). Nos últimos 20 anos, diversas ferramentas genéticas melhoraram a compreensão dos processos de domesticação, propagação e

diversificação da oliveira (SKODRA et al., 2021), uma vez que tem sido difícil decifrar os processos evolutivos adaptativos envolvidos na domesticação da oliveira (PONTI et al., 2014). Esses avanços podem contribuir com o melhoramento da espécie. A maioria dos trabalhos de melhoramento genético em oliveiras tem sido baseada em métodos clássicos que incluem o cruzamento e a seleção na prole, porém o desenvolvimento é lento devido ao longo período juvenil das plantas (LAVEE et al., 1996).

Grande parte dos programas de melhoramento vegetal está localizada na Espanha, Itália, Tunísia e Israel, gerando variedades bem-sucedidas em seu crescimento ereto e estreito, alta produção de frutos com altos teores de óleo (LAVEE et al., 1996; MOUSAVI et al., 2019; PALOMO-RÍOS et al., 2021; SKODRA et al., 2021). No entanto, apesar do grande número de programas, a quantidade de cultivares obtidas é pequeno em comparação com outras árvores frutíferas (DE LA ROSA et al., 2007), além de apresentar grande incerteza devido à abundância de sinônimos e homônimos ainda espalhados pelo mundo (COI, 2023).

Uma ferramenta útil no melhoramento genético da oliveira foi a criação do Banco Mundial de Germoplasma de Oliva localizado em Córdoba na Espanha, sendo de grande importância devido ao grande número de variedades exaustivamente mantidas e avaliadas. Essas análises permitem reduzir o tempo necessário para produzir novas cultivares (FENDRI et al., 2010). Existem programas de melhoramento na Austrália para obter variedades adaptadas às condições ambientais locais (SEDGLEY, 2000).

Apesar do grande número de recursos necessários para buscar o melhoramento genético, os países produtores de oliva têm promovido programas de seleção clonal, com resultados muitas vezes encorajadores. No entanto, a principal dificuldade é o conhecimento relativamente escasso do comportamento hereditário dos traços agrônômicos mais importantes, a alta heterozigose da espécie e seu alto grau de polimorfismo (MOUSAVI et al., 2019). Isso, por sua vez, significa que um tempo mínimo para a liberação de uma nova cultivar pode ser de 20 anos ou mais (FABBRI et al., 2009; OZDEN-TOKATLI et al., 2010). Como consequência de todos esses problemas, a oliveira não recebeu nas últimas décadas a mesma atenção de outras culturas frutíferas no que diz respeito ao melhoramento genético utilizando abordagens de cruzamento. Este fato

é claramente evidenciado pelo número muito limitado de novas cultivares que foram lançadas nos últimos 30 anos (COI, 2023).

2.11. Perspectivas futuras para as mudanças climáticas

Os modelos de distribuição de espécies, unidos com projeções climáticas de alta resolução, permitiram prever a evolução futura das cultivares de oliveira (ALFIERI et al., 2019; ARENAS-CASTRO et al., 2020; RODRIGO-COMINO et al., 2021). Invernos mais quentes e aumento da seca têm sido estimados para levar à redução das chuvas e à perda de umidade do solo, limitando o número de áreas disponíveis para cultivares comercialmente relevantes que foram tradicionalmente desenvolvidas. Isso obriga os produtores a substituir as cultivares tradicionais por cultivares mais adaptadas ao cultivo intensivo ou super intensivo (SANTOS et al., 2019; ARENAS-CASTRO et al., 2021). Ainda assim, há detratores que acreditam que as oliveiras são extremamente resistentes; sendo improvável que se submeta a mudanças drásticas (ALFIERI et al., 2019; FRAGA et al., 2021; COI, 2023), apesar das duras mudanças climáticas projetadas no futuro e suas implicações para a agricultura (BARRANCO et al., 2000; BRANCA et al., 2021).

As projeções climáticas no Brasil indicam mudanças consideráveis relacionadas ao aumento da temperatura do ar (SILVA et al., 2019; MARTINS et al., 2020), afetando a agricultura, alterando as taxas de desenvolvimento e fenologia na oliveira. Os pesquisadores devem estar preparados para esse cenário através do desenvolvimento constante de estudo relacionados.

3. CAPÍTULO I - Uso de características microestruturais de pólen e pistilo para identificar cultivares de oliveira no Sul do Brasil

3.1. Resumo

A oliveira possui uma grande diversidade de cultivares ao redor do mundo, cuja identificação tem sido baseada em caracteres de uso agrônomico. No entanto, algumas cultivares são erroneamente identificadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi estabelecer um sistema de reconhecimento de cultivares através do uso de características microestruturais de pólen e pistilo. Para isso, a variabilidade do pistilo e do pólen em microscopia de varredura eletrônica e de luz foi estudada nas cultivares 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual', no Sul do Brasil. Este tipo de estudo não tem sido realizado nas condições dessa região, onde a identificação de cultivares comerciais às vezes é complexa e confusa, razão pela qual se busca um método eficaz para identificá-las, permitindo no futuro traçar o perfil do sistema reprodutivo nesta região. Caracteres palinológicos e medidas do pistilo foram analisados. Houve diferenças significativas nas variáveis, não evidenciando diferenças entre os locais. Os caracteres micromorfológicos dos grãos de pólen, assim como os pistilos analisados, apresentaram notável uniformidade dentro de cada uma das cultivares, sendo por sua vez diferentes quando comparados entre as diferentes cultivares. A Análise de Componentes Principais parece separar cultivares de acordo com semelhanças ou diferenças micromorfológicas. As informações fornecidas podem contribuir para o estabelecimento de estudos de classificação de cultivares muito próximas de oliveiras nas condições do Sul do Brasil.

3.2. Introdução

Historicamente, a maioria das cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) foram identificadas com base nas características taxonômicas e agrônomicas adotadas pelo

Conselho Oleícola Internacional, estimando mais de 1275 cultivares reconhecidas em pelo menos 56 países (COI, 2023; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b).

A olivicultura espalhou-se por todo o mundo através de réplicas clonais de um grupo diversificado de cultivares, cuja principal origem vem da Bacia do Mar Mediterrâneo (MORA et al., 2008). No entanto, existem na classificação da oliveira, mais de 3000 sinônimos e homônimos ainda a serem reclassificados (ADAKALIC e LAZOVIC, 2018; BARTOLINI et al., 1998; FENDRI et al., 2011; ÖZKAYA et al., 2004; PEREIRA, 2015; RALLO, 2005), gerando confusão e incerteza sobre a identidade correta de cada cultivar (ALBA et al., 2009; ÖZKAYA et al., 2004). Identificar corretamente a morfologia das plantas tornou-se uma das questões importantes na comunidade científica, devido à dinâmica de classificação e reclassificação a cada ano (ALI et al., 2021). Esse problema de identidade é causado pelo fato de que os caracteres usados para classificação geralmente são influenciados por flutuações ambientais locais e em função de características muitas vezes sazonais, tornando-se uma questão desafiadora (ALI et al., 2021; BESNARD et al., 2009; LEVIN e LAVEE, 2005; LUBNA et al., 2019; MATÍAS et al., 2010; MORA et al., 2008). No Brasil, as condições ecológicas e de cultivo da oliveira não são as mesmas dos países de origem, portanto as plantas apresentam um desenvolvimento diferente, situação que dificulta o uso de alguns descritores desenvolvidos por Barranco e Rallo (1984), quando se destinam a identificá-los em condições sul-americanas. Atualmente, o uso da microscopia eletrônica de varredura revolucionou a biociência, permitindo a possibilidade de explorar características estruturais, bem como informações sobre a importância anatômica, palinológica e ecológica de diferentes grupos de plantas (ALI et al., 2020; ALI et al., 2021; GUL et al., 2020; ISHTIAQ et al., 2020). Estudos têm demonstrado que o uso de microscopia óptica e eletrônica de varredura para analisar características micromorfológicas são importantes para subsidiar estudos taxonômicos em plantas (MAJEED et al., 2020; UMBER et al., 2021) ou identificação em cultivares de oliveira (CASTRO et al., 2010; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009), bem como para uso em conservação ou seleção de espécies para cruzamentos controlados em programas de melhoramento genético (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2021; UMBER et al., 2021). No entanto, a

morfologia floral é um caráter taxonômico pouco avaliado na oliveira (SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009).

As características morfológicas do pólen têm sido essenciais para distinguir espécies que apresentam fenótipos semelhantes (DU et al., 2018; ZHANG et al., 2017). Caracteres ultraestruturais de pólen em oliveiras, particularmente os de esporoderme, têm sido usados repetidamente para a classificação e discriminação de cultivares (ARZANI e JAVADY, 2002; FENDRI, 2011; FENDRI et al., 2011). Esses caracteres aparentemente apresentam baixa dependência tanto do ambiente quanto de diferentes condições fenológicas (DE LA ROSA et al., 2002), além de apresentarem uma alta diversidade de níveis polimórficos (GANINO et al., 2006).

Por outro lado, estudos ultraestruturais no gineceu em algumas cultivares de oliveira revelaram diferenças que dependem do tipo de cultivar e dos estádios de desenvolvimento da planta (KOUBOURIS et al., 2012). No entanto, poucos estudos se concentraram em descrever parcialmente a estrutura e composição do pistilo, diferenciando cada cultivar durante o tempo de antese (RAPOPORT, 2008; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009). Faltam descrições mais completas da arquitetura, organização e composição do estigma, estilo e ovário das diferentes cultivares da oliveira. Assim como, combinar os diferentes caracteres morfológicos para estabelecer padrões estatísticos que permitam uma classificação e discriminação confiáveis de cultivares.

Nos últimos anos, o cultivo de oliveiras tem aumentado no Sul do Brasil, e estudos para caracterizar o sistema reprodutivo entre cultivares desta espécie nunca foram desenvolvidos para esta região. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um sistema de reconhecimento de cultivares sob microscopia óptica e de varredura baseado na combinação de caracteres de pólen e pistilo, analisando seis cultivares usadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Material vegetal e condições de armazenamento

Três mil flores perfeitas de oliveira (*Olea europaea* L.) das cultivares 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual' foram coletadas aleatoriamente. As flores apresentavam anteras túrgidas, antes da deiscência e se encontravam em estágio de maturação semelhante. As coletas foram realizadas nas empresas “Verde Louro (Fazenda Mato Grande)” (UTM 31.474477S; 52.9473309W), município de Canguçu; “Olivas do Sul-Pomar (Alto dos Casemiros)” (UTM 30.009034S; 52.866627W), Cachoeira do Sul; e “Azeites Batalha (Estância Guarda Velha)” (UTM 31.5607715S; 53.511726W), Pinheiro Machado; todos localizados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (**Figura 3**).

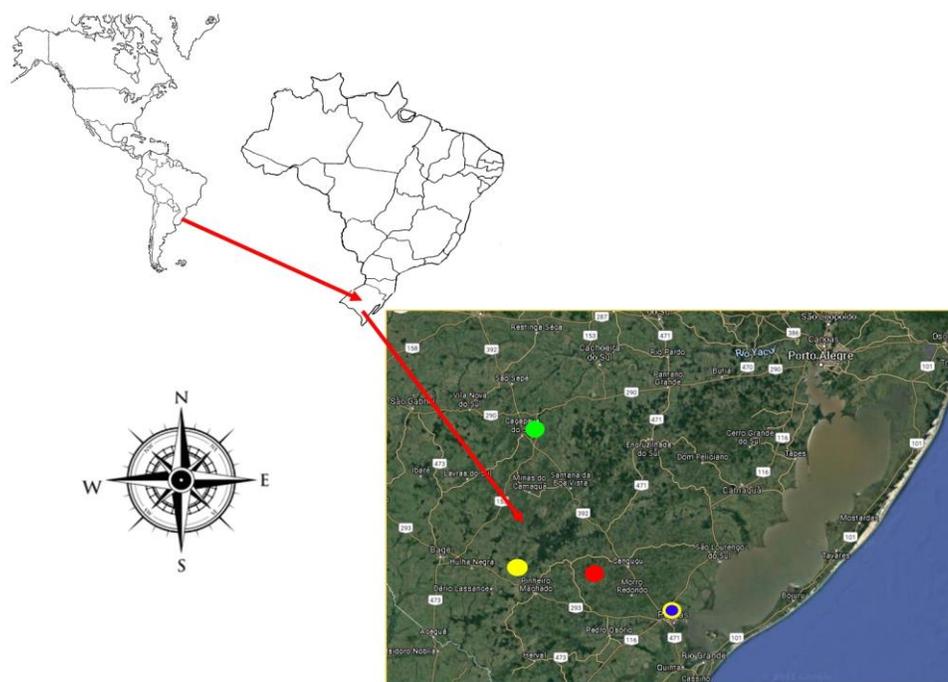


Figura 3. Localização espacial dos locais de amostragem. Ponto azul com contorno amarelo indica a localização da cidade de Pelotas. Ponto Vermelho, indica a localização da empresa “Verde Louro (Fazenda Mato Grande)”, município de Canguçu. O ponto verde indica ao “Olivas do Sul-Pomar (Alto dos Casemiros)”, Cachoeira do Sul. O ponto amarelo indica o lugar do “Azeites Batalha (Estância Guarda Velha)”, município de Pinheiro Machado; todos localizados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

A coleta foi realizada de setembro a dezembro de 2019 de árvores de 5 a 10 anos. O clima local foi caracterizado durante o ano de colheita das flores, com base nos dados das Estações Meteorológicas de Canguçu, Código (WMO): A811 (UTM 31.403299S; 52.700699W); Bagé, Código (WMO): A827" (UTM 31.347801S; 54.013292 W); e Encruzilhada do Sul (WMO): A893 (UTM 30.54305555S; 52.52472221W), Região S, UF:RS, pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), ao "Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento", Brasil. As condições climáticas caracterizam-se por apresentar precipitações dispersas, com alta UR e radiação solar (**Figura 4**).

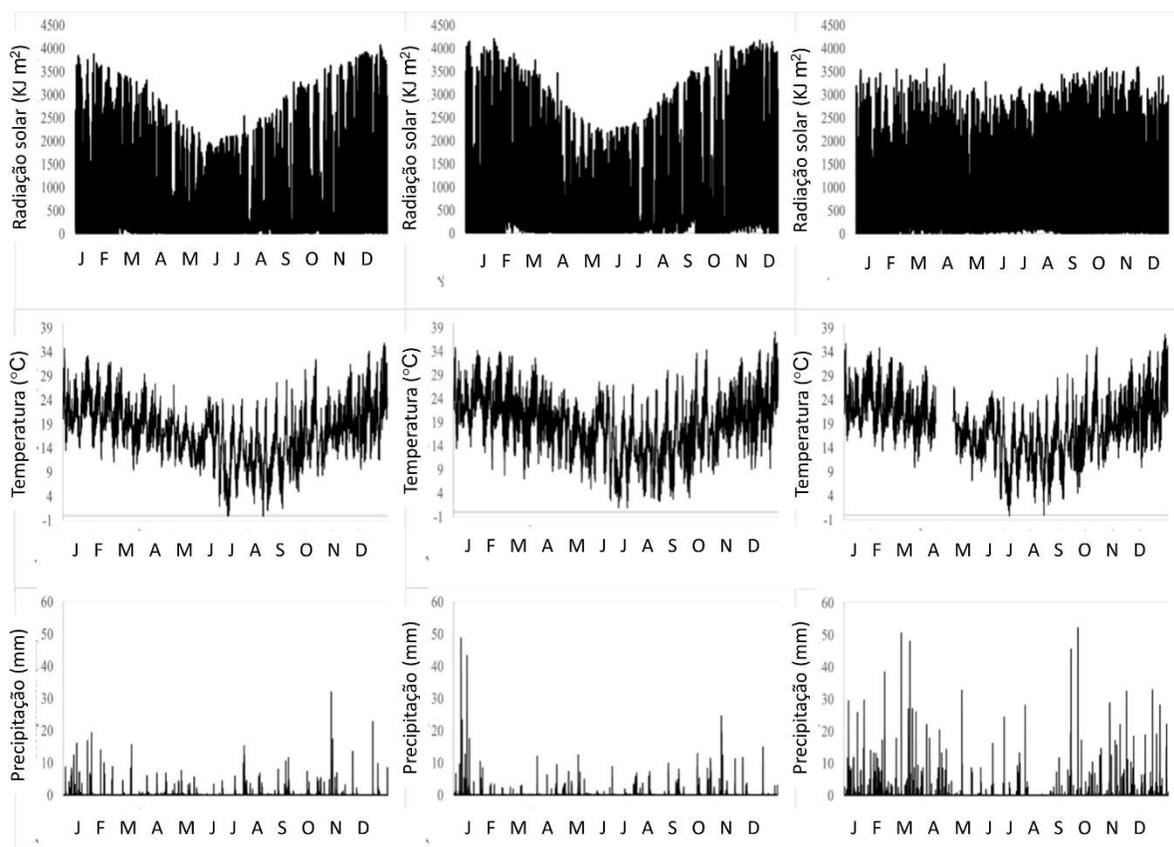


Figura 4. Perfil climático durante a colheita de flores (2019). Dados da Estação Meteorológica de "Canguçu, WMO: A811" (A, B, C); "Bagé, OMM: A827" (D, E, F); e "Encruzilhada do Sul, OMM: A893" (G, H, I), com base no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.

As análises em microscópio de luz foram realizadas na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) e as observações em microscópio eletrônico de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3.3.2. Contagem e análise do tamanho do grão de pólen

A contagem e a análise dos grãos de pólen foram realizadas em microscópio de luz modelo Leica DM750 (**Figura 5**). Para o cálculo da produção de pólen por antera foi utilizada a proposta de Dafni (1992), com modificações. Mil e quinhentas flores por cultivar foram selecionadas aleatoriamente em cada local (4.500 flores no total entre os três locais). De cada flor, uma antera foi escolhida e preservada em 300 μ l de etanol (70%) e azul de metileno (0,5%). A antera foi macerada e homogeneizada. Foram retiradas três alíquotas de 20 μ l, para serem observadas e contadas em câmara de Neubauer sob microscópio óptico com objetiva de 100X. O número de grãos de pólen contados nas alíquotas foi calculado e multiplicado por 0,3 pelo volume final de 300 μ l. Obteve-se o número de grãos de pólen produzidos por flor, multiplicando-se o valor médio da antera macerada por dois, pois a flor possui duas anteras.

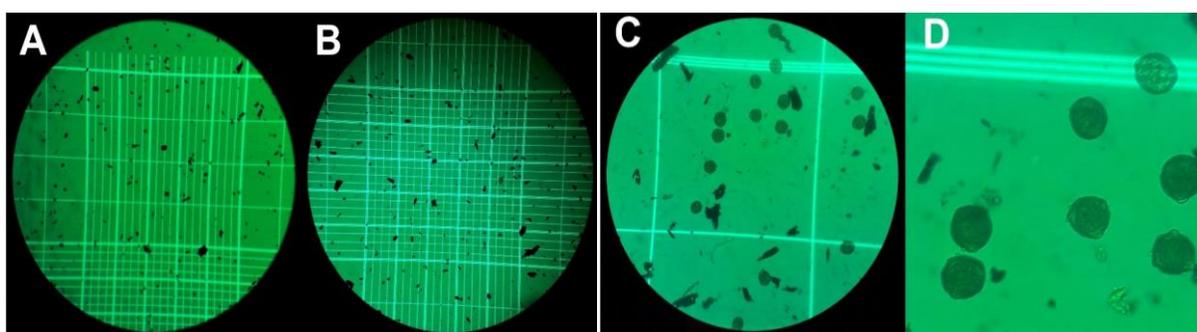


Figura 5. Micrografia óptica do pólen das oliveiras sob câmara de Neubauer. As amostras correspondem a cultivar 'Arbequina': A e B. Visto sob objetiva de 10X e ocular de 15X. C. Visto sob objetiva de 40X e ocular de 15X. D. Visto sob objetiva de 100X e ocular de 15X.

As observações e medições foram feitas em pólen coletado de um único local (Verde Louro - Fazenda Mato Grande). Foram analisados 4.000 grãos de pólen por cultivar (24.000 grãos de pólen totais analisados), sob um microscópio de luz com uma objetiva calibrada 100X. As fotografias foram tiradas com um fotomicroscópio Nikon Eclipse E200 equipado com um software BEL, versão 7.1.1.7 e posteriormente as medidas foram feitas com auxílio do software Motic. Os parâmetros medidos incluíram o diâmetro máximo (PL) e o diâmetro mínimo (PW). Quociente entre o diâmetro máximo e mínimo da partícula (relação L-W), e o índice de tamanho (SI), representando a área do grão, a partir do resultado do cálculo da multiplicação do diâmetro máximo e mínimo dividido por 100 (LANZA et al., 1996; KOUBOURIS et al., 2012). Além disso, foi calculada a área do pólen (PA), assumindo que o pólen é de forma elipsoidal.

3.3.3. Análise ultraestrutural da parede do pólen

Para observações de ultraestrutura, foram medidos grãos de pólen de um único local (Verde Louro - Fazenda Mato Grande). Foram analisados 25 grãos de pólen de cada cultivar, retirados ao acaso de um estoque misto de flores. Esses grãos foram fixados em solução de etanol (50%), glutaraldeído (3%) e formaldeído (1%) durante 48 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de álcool etílico 50-100 % adicionando formaldeído 1 %, depois foram secas à temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. As amostras foram polvilhadas com ouro em pó em um Desk V TSC. O pólen foi examinado sob microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo, Jeol, JSM-6610LV, com microsonda EDS. As observações foram feitas usando ampliações de 4.000X a 25.000X (**Figura 6**).

Os caracteres ultraestruturais da parede do grão de pólen analisados foram a altura do tectum (HT) e a largura do tectum (WT), a área dos lúmens (LA) e as distâncias entre os elementos esculturais na exina (DSE) (**Figura 7**).

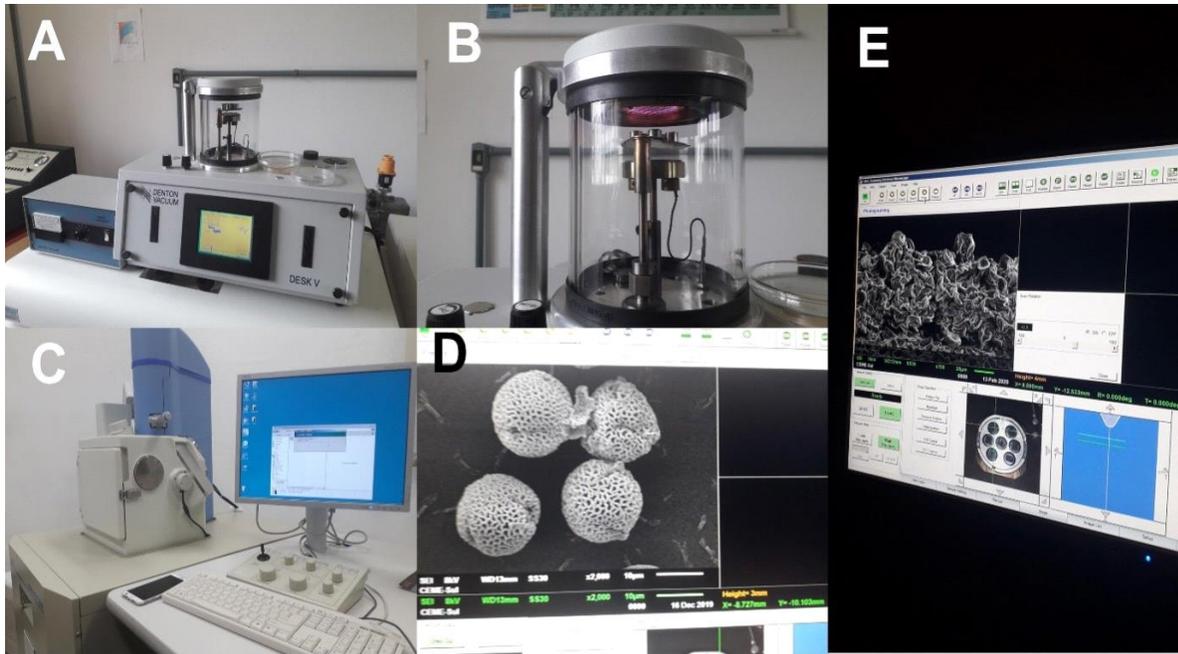


Figura 6. Processo de microscopia eletrônica de varredura e detalhes do equipamento. A, Mesa V TSC. B, processo de pó de ouro. C, Equipamento JSM-6610LV para Microscopia de Varredura. D e E, visualização da tela do computador, contendo as interpretações das amostras analisadas.

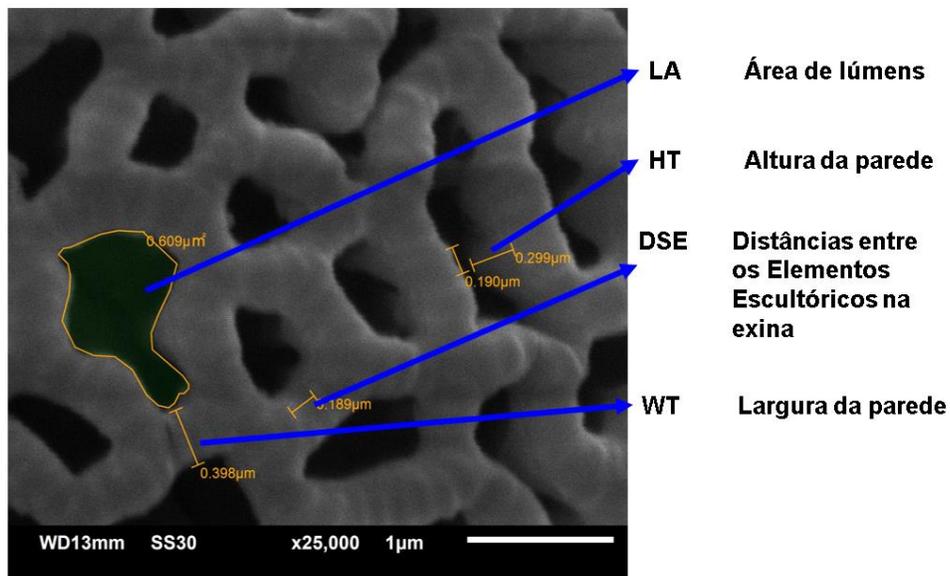


Figura 7. Micrografia de varredura (25.000X) dos caracteres ultraestruturais do tectum do grão de pólen: altura da parede (HT), largura da parede (WT), área de lúmens (LA) e as distâncias entre os elementos escultóricos na exina (DSE).

3.3.4. Análise anatômica de pistilos

Vinte e cinco flores de cada cultivar, de um único local (Verde Louro - Fazenda Mato Grande), foram selecionadas aleatoriamente. Elas foram preparadas em microscópio estereoscópico Meiji Techno EMZ-13, removendo as pétalas e sépalas, deixando o estigma, estilete e ovário livres. Cada pistilo foi fixado individualmente em 300 µL de solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) a 4°C. As amostras fixadas foram desidratadas em etanol e embutidas em resina plástica (Leica Historessin®) e os blocos foram seccionados (7 µm de espessura) em micrótomo rotativo Ancap. Os cortes longitudinais foram corados com azul de toluidina O (0,05%) em tampão citrato-fosfato, pH 4,5 (SAKAI, 1973) e montados em resina sintética Entellan®.

3.3.5. Análises ultraestruturais de pistilos

As amostras para estudos ultraestruturais sob microscopia eletrônica de varredura foram desidratadas em série de álcool, adicionando 1% de formaldeído. As amostras foram secas à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, o ouro foi pulverizado em uma mesa a vácuo metalizadora (Denton) e observada as amostras com ampliação de 100X a 2.500X. As medidas tomadas foram, razão do ovário (OR), que reflete a razão entre o comprimento e a largura do ovário, comprimento do estilo (SL), largura de estilo (SW), comprimento do estigma (StigL), largura dos lóbulos do estigma, esquerdo e direito juntos (StigW) e da área do estigma (StigA) (**Figura 8**).

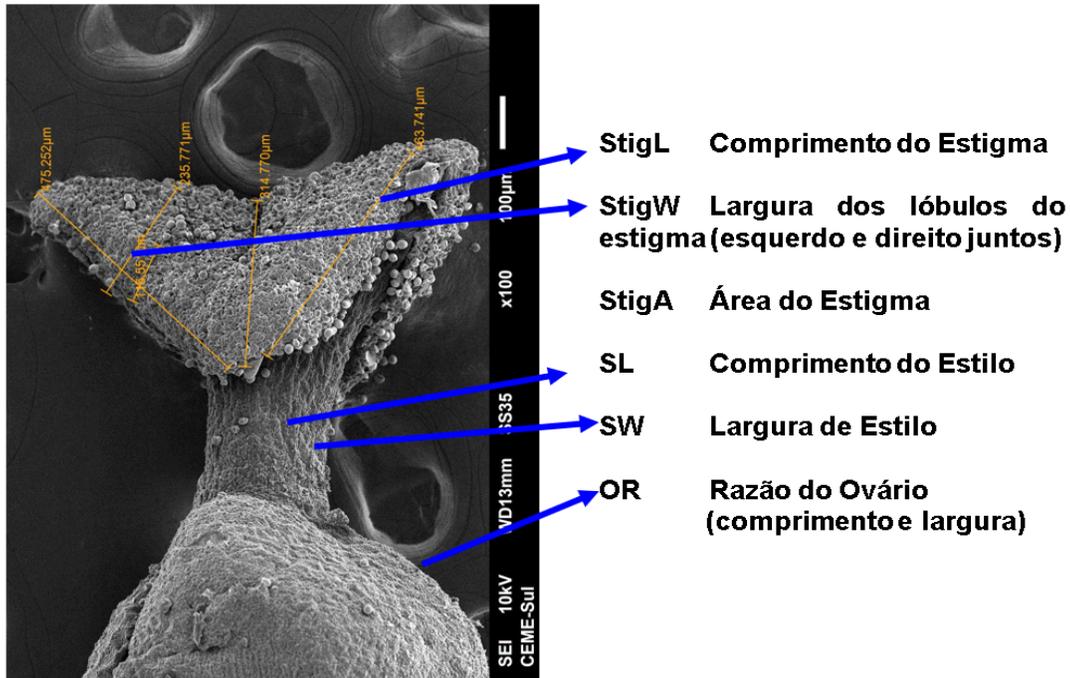


Figura 8. Micrografia de varredura (100X) dos caracteres superficiais do pistilo: razão do ovário (OR), comprimento do estilo (SL), largura de estilo (SW), comprimento do estigma (StigL), largura dos lóbulos esquerdo e direito juntos do estigma (StigW) e da área do estigma (StigA).

3.3.6. Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilks. Como todas as variáveis apresentaram distribuição normal, nenhuma transformação foi aplicada. Posteriormente foi feita análise de variância (ANOVA). Foram apresentadas as médias, variâncias, e desvios padrão para a contagem, medidas morfométricas do tamanho dos grãos de pólen e do pistilo. Para comparar os valores das médias em todas as variáveis analisadas, foi realizado o teste de Scheffé ($p \leq 0,05$). Apesar de todas as variáveis serem medidas na mesma unidade (μm), os valores foram normalizados expressando-os em unidades de desvio padrão. Finalmente foi feita uma análise de componentes principais (PCA) para separação das cultivares.

A ANOVA, teste de Scheffé e a PCA foram realizados com o auxílio do pacote estatístico *RStudio* e *PAST* (R CORE TEAM, 2018; HAMMER et al., 2021).

3.4. Resultados

Análises de variância foram aplicadas a todas as variáveis medidas, tanto em pólen quanto em pistilos, entre cultivares. Em todos os casos, pelo menos uma cultivar foi significativamente diferente (Tabela 1).

Tabela 1. Análises de variância comparando as diferentes medições de pólen e pistilo entre as cultivares (Arbequina, Arbosana, Frantoio, Koroneiki, Manzanilla de Sevilla e Picual).

	Fonte de Variação	SQ	GL	F	Pr(>F)	
Pólen	Contagem	706.170.893.802,090	5	2.440,51	2,1e-16	***
	Diâmetro máximo (PL)	860,781	5	74,15	1,0 e-11	***
	Diâmetro mínimo (PW)	646,412	5	48,13	1,0 e-10	***
	Índice de tamanho (SI)	64,133	5	7,13	1,16e-16	***
	Área do Pólen (PA)	188.777,290	5	28,98	1,01e-11	***
	Área de lumens (LA)	14,767	5	466,33	2,2e-15	***
	Altura de parede (HT)	1,276	5	358,06	6,8e-5	**
	Distâncias entre os elementos escultóricos na exina (DSE)	0,102	5	76,44	5,3e-13	***
	Largura da parede (WT)	1,328	5	130,26	2,0e-16	***
	Razão do ovário (OR)	1,514	5	65,874	1,3e-14	***
Pistilo	Comprimento do estilo (SL)	488.061,392	5	481,21	0,0011	**
	Largura de estilo (SW)	255.127,470	5	41,68	0,0001	**
	Comprimento do estigma (StigL)	850.185,167	5	1.929,85	<2,2e-16	***
	Largura do estigma (StigW)	325.412,221	5	385,22	0,0021	**
	Área do estigma (StigA)	4.465.265,251	5	3.365,31	0,001	**

*SQ: Soma de quadrado, GL: graus de liberdade, F: valor calculado F de Fischer, Pr(>F): contraste com a probabilidade teórica.

A comparação das mesmas cultivares entre diferentes localidades não apresentou diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2. Análises de variância comparando os diferentes valores de contagem de pólen entre as diferentes localidades estudadas.

Fonte de Variação	SQ	GL	F	Pr(>F)
Contagem entre diferentes localidades	1.723.547.111.204,099	2	0,0051	0,068

*SQ: Soma de quadrado, GL: graus de liberdade, F: valor calculado F de Fischer, Pr(>F): contraste com a probabilidade teórica.

As condições climáticas mostraram pouca variação durante a época de coleta das flores, e apesar de apresentarem diferenças entre os padrões climáticos entre as

localidades, aparentemente, não modificaram o pólen e o pistilo. No entanto, pode ter influenciado a germinação, o transporte de pólen e a receptividade do estigma; efeitos na reprodução não analisados neste trabalho.

3.4.1. Contagem e análise do tamanho dos grãos de pólen

A cultivar 'Koroneiki' apresentou o maior valor médio de grãos de pólen por flor (113889 ± 11928), seguido de 'Arbequina' (111474 ± 16280), enquanto 'Manzanilla de Sevilla' apresentou a menor média (53811 ± 10857), sendo este valor apenas metade da quantidade de grãos de pólen de 'Koroneiki' (**Tabela 3**). O número de grãos de pólen não variou entre os diferentes locais e, aparentemente, as condições climáticas não influenciaram notavelmente.

Os grãos de pólen com maior tamanho (PA), foram da cultivar 'Manzanilla de Sevilla' (PA $4134,735 \pm 375,136$), enquanto 'Frantoio' apresentou o menor valor (PA $1775,714 \pm 430,467$).

O SI (índice de tamanho) apresentou o mesmo padrão e agrupamento de valores médios da variável área polínica. Valores de relação L-W > 1 (Quociente entre o diâmetro máximo e mínimo da partícula maior a 1) indicaram formas proladas, por sua vez, aquelas com formas esféricas, apresentaram valores de relação L-W aproximadamente igual a 1. A cultivar que apresentou grãos de pólen com formato mais prolato foi 'Arbequina' (relação L-W $1,264 \pm 0,140$), enquanto 'Koroneiki' tende a apresentar grãos de pólen esféricos (relação L-W $1,112 \pm 0,068$) (**Tabela 4**).

Tabela 3. Número de grãos de pólen por flor de seis cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual', em cada uma das localidades estudadas.

Cultivares		Verde Louro	Azeites Batalha	Olivas do Sul	Total
		n=1500	n=1500	n=1500	n=4500
Arbequina	\bar{x}	109249 a	110119 b	115056 b	111474 a
	s^2	245853x10 ³	350796x10 ³	198552 x10 ³	265067 x10 ³
	s	15679	18729	14090	16280
Arbosana	\bar{x}	109110 a	---	---	109110 a
	s^2	428495x10 ²	---	---	428495x10 ²
	s	6565	---	---	6565
Frantoio	\bar{x}	101816 b	98979 d	---	100397 b
	s^2	112548 x10 ³	212693 x10 ³	---	218894 x10 ³
	s	10608	14584	---	14795
Koroneiki	\bar{x}	108471 a	115213 a	117985 a	113889 a
	s^2	932450 x10 ²	182634 x10 ³	151001x10 ³	142293 x10 ³
	s	9656	13514	12288	11928
Manzanilla de Sevilla	\bar{x}	56415 c	51208 f	---	53811 c
	s^2	115020 x10 ³	120770 x10 ³	---	117895 x10 ³
	s	10724	10990	---	10857
Picual	\bar{x}	58153 c	57979 e	---	58066 c
	s^2	218547 x10 ³	358529 x10 ³	---	288538 x10 ³
	s	14783	18935	---	16986

a) n = pólen total medido, média (\bar{x}), variância (s^2) e desvio padrão (s).

b) Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($P \leq 0,05$).

c) --- Traduz-se na ausência de dados para a cultivar.

Tabela 4. Caracteres analisados em grãos de pólen. Medições indicando diferentes dimensões dos grãos de pólen das cultivares de oliva 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.

Cultivares		Diâmetro máximo (PL)	Diâmetro mínimo (PW)	Relação L-W	Área do pólen (PA)	Índice de tamanho (SI)
Arbequina n=4000	\bar{x}	17,158 b	13,565 e	1,264 a	2736,687 d	2,327 d
	s^2	1,278	1,811	0,0197	158841,813	0,096
	s	1,130	1,346	0,140	398,550	0,310
Arbosana n=4000	\bar{x}	16,929 d	15,146 c	1,117 c	3156,862 c	2,564 c
	s^2	3,926	4,256	0,012	573732,282	0,444
	s	1,981	2,063	0,109	757,451	0,666
Frantoio n=4000	\bar{x}	13,455 f	11,589 f	1,161 d	1775,714 e	1,559 e
	s^2	2,314	1,761	0,003	185301,919	0,125
	s	1,521	1,327	0,056	430,467	0,354
Koroneiki n=4000	\bar{x}	16,238 e	14,599 d	1,112 c	2896,973 d	2,370 d
	s^2	1,091	1,218	0,005	151603,944	0,090
	s	1,044	1,104	0,068	389,364	0,300
Manzanilla of Sevilla n=4000	\bar{x}	19,752 a	16,982 a	1,163 b	4134,735 a	3,354 a
	s^2	0,837	1,708	0,010	210834,818	0,102
	s	0,915	1,307	0,098	375,136	0,320
Picual n=4000	\bar{x}	16,998 c	15,011 b	1,132 e	3565,222 b	2,551 b
	s^2	0,881	1,867	0,006	244406,928	0,140
	s	0,939	1,366	0,074	494,375	0,375

As medidas (PL, PW) são expressas em μm ; (PA e SI) são expressos em μm^2 , e a relação L-W é sem unidade. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($P \leq 0,05$).

3.4.2. Análise ultraestrutural da parede do pólen

A análise de microscopia eletrônica de varredura do grão de pólen revelou que existem diferenças no padrão de exina de cada uma das cultivares, que podem incluir a variação no tamanho dos poros (lúmen) e na forma dos elementos estruturais da malha (Figura 9 A-F).

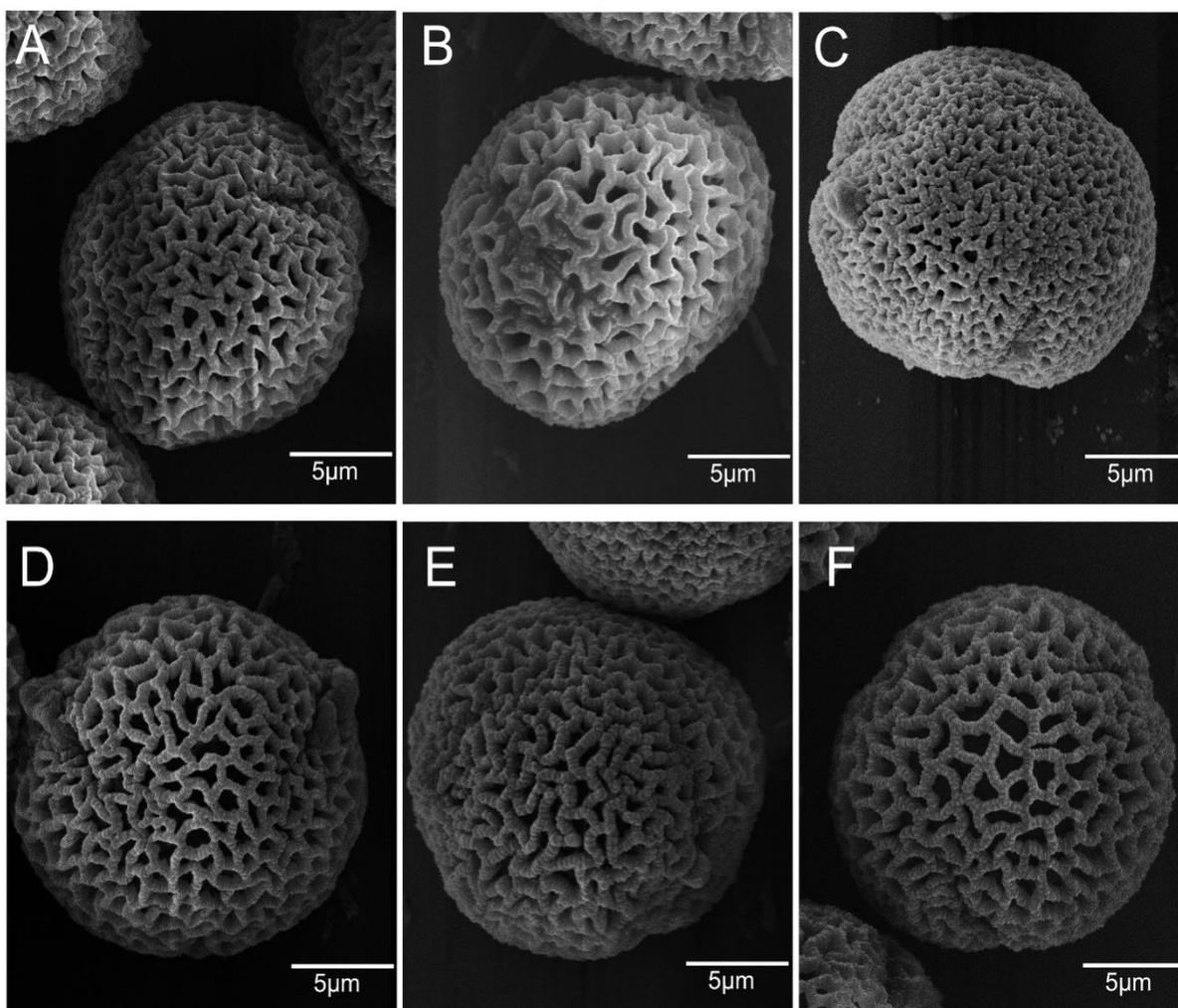


Figura 9. Micrografia eletrônica de escaneamento de grãos de pólen de oliveira (*Olea europaea*) observada abaixo de 4500X. As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'.

As observações feitas em 25.000X mostraram diferenças na largura e altura do desenho do teto, área do lúmen, forma e distância entre cada elemento escultural da superfície da parede na exina (**Figura 10 A-F**). Observou-se que 'Picual' e 'Manzanilla de Sevilla' apresentam estruturas escultóricas com notáveis superfícies pontiagudas, enquanto em 'Koroneiki' apresentam angulações menos perceptíveis. 'Arbequina', 'Arbosana' e 'Frantoio' tendem a ser arredondadas.

Foram feitas medições de tectum, que mostram uma variação significativa de HT (altura do tectum), com o maior valor observado na 'Manzanilla de Sevilla' (HT $0,391 \pm 0,045$) e os valores mais baixos (HT $0,114 \pm 0,010$) encontrados em 'Frantoio'. As

cultivares 'Arbosana' e 'Arbequina' não apresentaram diferenças significativas entre si. Para WT (largura do tectum), o intervalo apresentou maiores oscilações significativas, variando de $0,529 \pm 0,025$ ('Manzanilla de Sevilla') a $0,249 \pm 0,031$ ('Arbosana'). Por sua vez, o valor médio da LA (área dos lúmens) para 'Picual' (LA $1,069 \pm 0,122$) é quase o dobro do valor calculado para 'Koroneiki' (LA $0,527 \pm 0,102$), que segue em segundo lugar. 'Arbosana' e 'Frantoio' apresentaram similaridade entre os valores de suas médias para essa variável (**Tabela 5**).

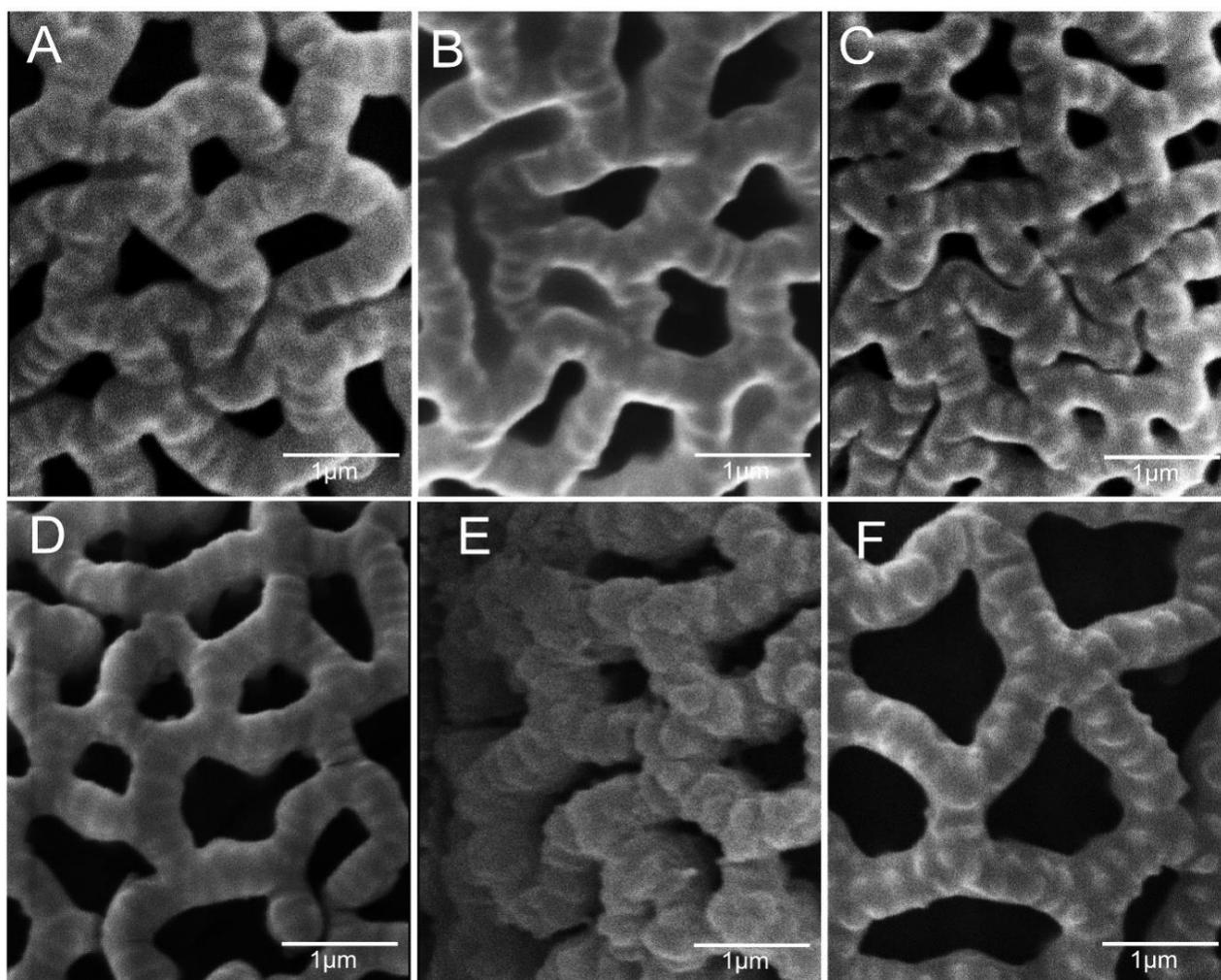


Figura 10. Micrografia eletrônica de grãos de pólen de oliveira (*Olea europaea*) observada abaixo de 25.000X. As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'.

Tabela 5. Parâmetros ultraestruturais dos grãos de pólen. Medições indicando diferentes dimensões do grão de pólen observadas sob microscopia de escaneamento de elétrons das cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.

Cultivares		Altura do tectum (HT)	Largura do tectum (WT)	Área dos lúmens (LA)	Distância entre os elementos esculturais na exina (DSE)
Arbequina n=25	\bar{x}	0,150 d	0,475 b	0,380 c	0,200 b
	s^2	$3,32 \times 10^{-4}$	$5,09 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$4,14 \times 10^{-4}$
	S	0,018	0,071	0,048	0,020
Arbosana n=25	\bar{x}	0,151 d	0,249 f	0,208 d	0,151 d
	s^2	$5,6 \times 10^{-5}$	$9,39 \times 10^{-4}$	$6,60 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-4}$
	\underline{S}	0,008	0,031	0,081	0,012
Frantoio n=25	\bar{x}	0,114 e	0,431 c	0,217 d	0,210 b
	s^2	$1,05 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-3}$	$9,70 \times 10^{-4}$	$6,80 \times 10^{-5}$
	S	0,010	0,033	0,031	0,008
Koroneiki n=25	\bar{x}	0,255 b	0,363 d	0,527 b	0,183 c
	s^2	$1,24 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-2}$	$5,4 \times 10^{-5}$
	S	0,035	0,033	0,102	0,007
Manzanilla de Sevilla n=25	\bar{x}	0,391 a	0,529 a	0,154 e	0,224 a
	s^2	$2,06 \times 10^{-3}$	$6,35 \times 10^{-4}$	$2,72 \times 10^{-3}$	4×10^{-4}
	S	0,045	0,025	0,052	0,020
Picual n=25	\bar{x}	0,210 c	0,324 e	1,069 a	0,226 a
	s^2	$4,79 \times 10^{-4}$	$3,39 \times 10^{-3}$	$1,49 \times 10^{-2}$	$5,10 \times 10^{-4}$
	S	0,022	0,058	0,122	0,023

a) As medidas (HT, WT e DSE) são expressas em μm e (LA) é expressa em μm^2 .

b) Os dados são apresentados média (\bar{x}), variância (s^2) e desvio padrão(s). Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($P \leq 0,05$).

A DSE (distância entre os elementos esculturais na exina) nas cultivares 'Picual' (DSE $0,226 \pm 0,023$) e 'Manzanilla de Sevilla' (DSE $0,224 \pm 0,020$) apresentaram os maiores valores de distância entre os elementos escultóricos, não diferindo significativamente. Por sua vez, 'Arbequina' e 'Frantoio' apresentaram semelhanças em suas médias, diferindo significativamente de 'Picual' e 'Manzanilla de Sevilla' (**Tabela 5**).

Uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com base nas medidas ultraestruturais dos grãos de pólen (**Figura 11**).

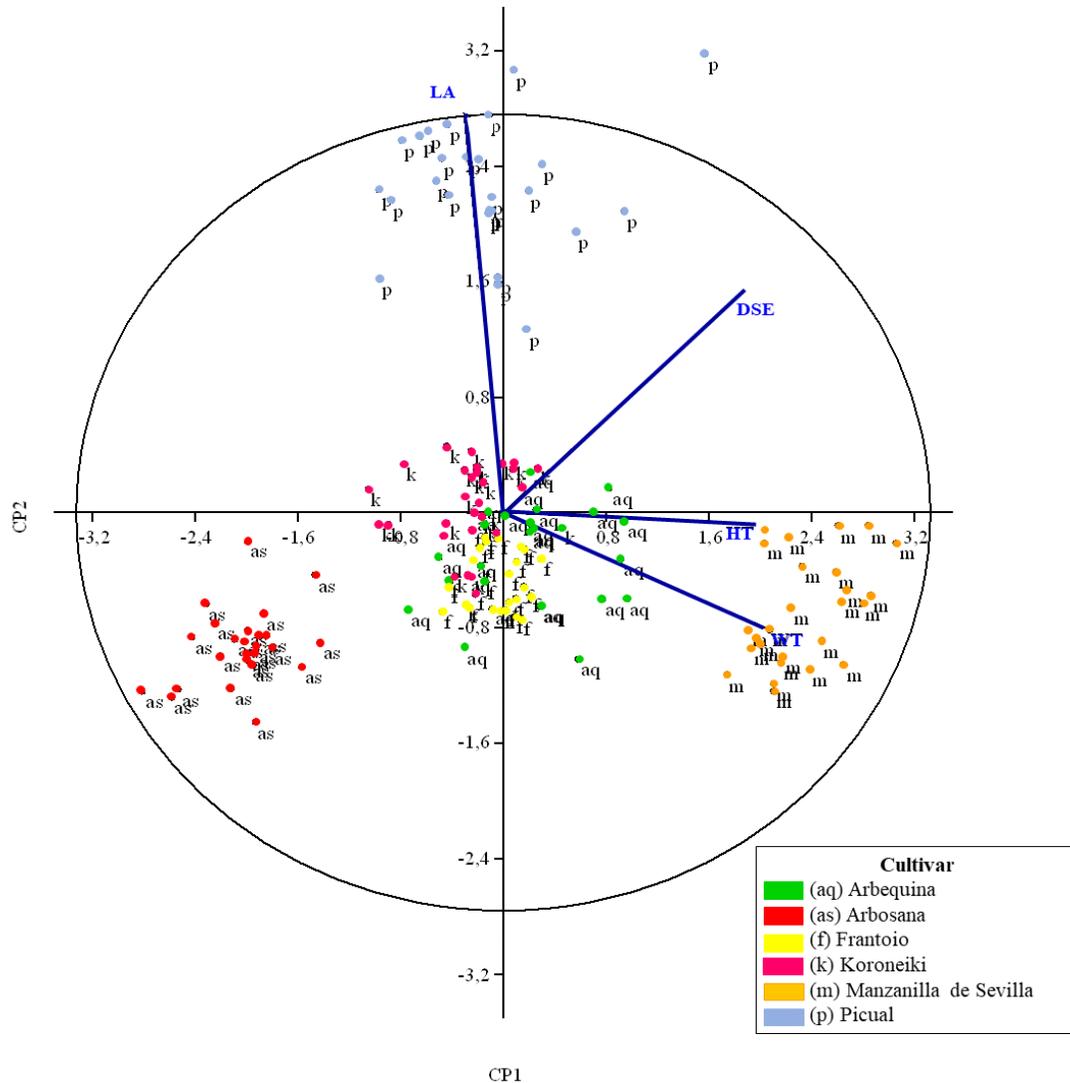


Figura 11. Análise de componentes principais, para os parâmetros ultraestruturais do pólen de ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, ‘Frantoio’, ‘Koroneiki’, ‘Manzanilla de Sevilla’ e ‘Picual’, com base nos vetores das variáveis de área dos lúmens (LA), distância entre os elementos esculturais na exina (DSE), altura do tectum (HT) e largura do tectum (WT).

Os dois primeiros eixos explicam 76% da variação total. O primeiro eixo (CP1) representa o gradiente de variação morfológica das variáveis (LA e uma fração de DSE), enquanto o segundo eixo (CP2) representa a tendência dos dados baseados nas

variáveis WT, HT e parte de DSE. No eixo do CP1, a variável LA, separa claramente 'Picual', 'Arbosana' e 'Manzanilla de Sevilla'. Na zona superior do eixo, 'Picual' representa grãos de pólen com LA maior. Na extremidade oposta deste eixo, observam-se 'Manzanilla de Sevilla' e 'Arbosana', que representam cultivares com grãos de pólen de LA menores (**Figura 11, Tabela 5**).

Na extremidade esquerda sobre o eixo do CP2, as variáveis, DSE, HT e WT separam o grupo de observações relativas às amostras de 'Arbosana' que está associada a valores baixos, enquanto 'Manzanilla de Sevilla' e uma fração de 'Arbequina' apresentam valores elevados para essas variáveis, separando-se do restante das cultivares. As demais cultivares ('Frantoio', 'Koroneiki' e parte de 'Arbequina') compõem um grupo que se localiza no centro de dispersão dos dados e que não se separam facilmente pelos eixos selecionados desta PCA.

3.4.3. Análise anatômica dos pistilos

Embora as seis cultivares analisadas pertençam à mesma espécie, elas apresentam padrões e arranjos diferentes nas diferentes estruturas anatômicas que compõem o sistema reprodutor feminino dessas (**Tabela 6, Figura 12**).

Tabela 6. Comparação da anatomia do pistilo entre as cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual', cultivadas na Fazenda Mato Grande (Empresa Verde Louro).

Características anatômicas	Cultivares					
	Arbequina	Arbosana	Frantoio	Koroneiki	Manzanilla de Sevilla	Picual
Células da epiderme do estigma	Duas ou três camadas de células glandulares ligeiramente redondas.	Duas ou três camadas de células glandulares e ligeiramente alongadas.	Duas camadas pseudo-estratificadas de células cilíndricas glandulares grandes e alongadas.	Uma ou duas camadas de células glandulares ligeiramente alongadas.	Três camadas de papilas epidérmicas pseudo-estratificadas vacuolares de estrutura alongada.	Três camadas de células glandulares alongadas. As células da camada externa, dobram o tamanho das duas internas.
Tecido de transmissão	Acentuadamente cônico, com fileiras de pequenas células	Estrutura de forma pouco tubular com	Estrutura cônica com fileiras de	Estrutura cônica com duas pequenas	Estrutura tubular sem projeções	Estrutura cônica com duas grandes e

	regulares, alongadas com paredes espessas.	tendência cônica.	células cilíndricas alongadas com paredes espessas.	projeções voltadas para os lóbulos.	cônicas aparentes.	marcadas projeções para os lóbulos. Células não alongadas.
Base do stigma	Continuação da área das células externas do tecido parenquimático do estilo.	Continuação da área das células externas do tecido parenquimático do estilo.	Separação clara entre as células do estigma e o tecido parenquimático do estilo.	As células externas são uma continuação do tecido parenquimático do estilo.	Separação clara entre as células do estigma e o tecido parenquimático do estilo.	Não há inserção clara das células externas do tecido parenquimático do estilo.
Epiderme do estilo	Camada única de células cuboides de pequeno porte.	Camada única de células cuboides de tamanho médio.	Camada única de células cilíndricas.	Camada única de células vacuoladas e formas cilíndricas alongadas.	Grandes células cuboides com núcleos notórios.	Camada única de células cuboides.
Córtex	Fileiras de células de formas prismáticas de tamanho irregular.	Fileiras de células regulares ligeiramente alongadas com paredes mais espessas. Células prismáticas e vacuoladas.	Fileiras de células ligeiramente cúbicas com núcleos grandes.	Células prismáticas e vacuoladas. Área central com células alongadas regulares com paredes mais espessas.	Células prismáticas e vacuoladas. Fileiras de células irregulares não alongadas com paredes finas.	Fileiras de células alongadas e vacuoladas.
Ovário	Epiderme de camada única, núcleos notórios e cobertos por uma cutícula densa. Óvulos protegidos por pelo menos quatro a seis camadas celulares com paredes espessas.	Epiderme de camada única, pequenas células, núcleos notórios cobertos por uma cutícula espessa. Óvulos protegidos por cinco paredes grossas celulares.	As células da epiderme são reduzidas em tamanho e têm formas irregulares. Óvulos protegidos por três camadas celulares com paredes espessas.	Epiderme de camada única, núcleos vacuolados, conspícuos, cobertos por uma cutícula espessa. Óvulos protegidos por cinco a seis camadas celulares com paredes espessas.	Epiderme de camada única de células seguida por uma cutícula espessa. Óvulos protegidos por pelo menos três a cinco camadas celulares com paredes espessas.	Epiderme de camada única de células vacuoladas, cobertas por uma cutícula fina. Óvulos protegidos por pelo menos três ou quatro camadas celulares com paredes espessas.
Mesocarpo do ovário	Várias camadas de pequenas células poliédricas.					

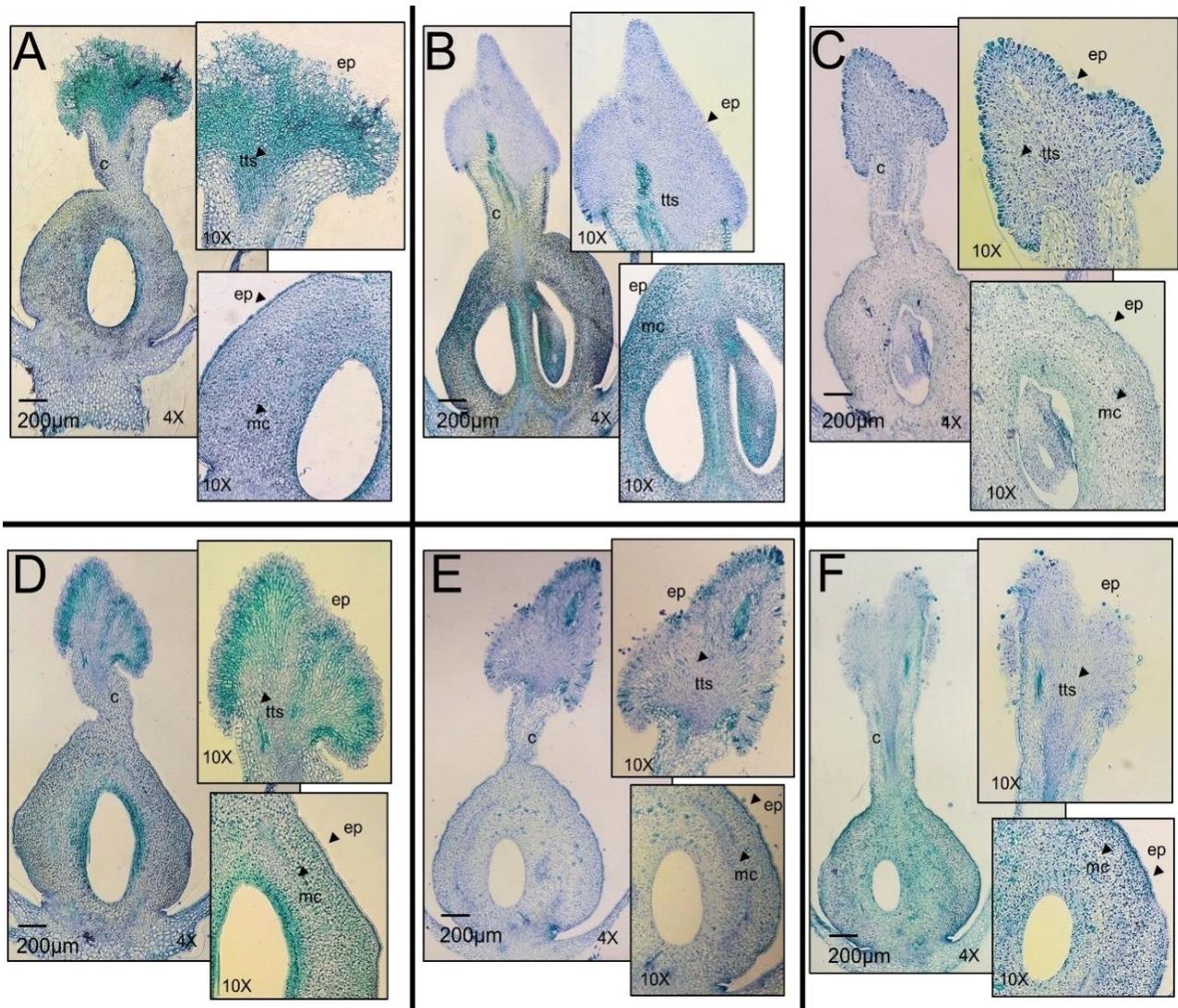


Figura 12. Micrografia de cortes histológicos dos pistilos em oliveira (*Olea europaea*). As amostras correspondem às cultivares: A. 'Arbequina', B. 'Arbosana', C. 'Frantoio', D. 'Koroneiki', E. 'Manzanilla de Sevilla' e F. 'Picual'. Seção longitudinal de um pistilo completo (4X). Um estigma bilobulado, um estilo mostrando um núcleo de tecido transmissor (tts) e o córtex (c), e um ovário. Detalhes de uma seção longitudinal do estigma mostrando papilas externamente orientadas e células estigmáticas internas com espaços intercelulares e seção longitudinal de ovário mostrando uma cutícula externa cobrindo a epiderme (ep), mesocarpo (mc) e as células mais internas do endocarpo (10X).

3.4.4. Análise ultraestruturais dos pistilos

Nas observações de microscopia, o pistilo da oliveira geralmente consiste em um ovário superior, relativamente curto e de estilo simples, e um estigma papilar com dois

lobos (**Figura 13 A-F**). No entanto, apresentaram diferenças notáveis em termos de tamanho e forma entre as seis cultivares estudadas, permitindo o reconhecimento individual.

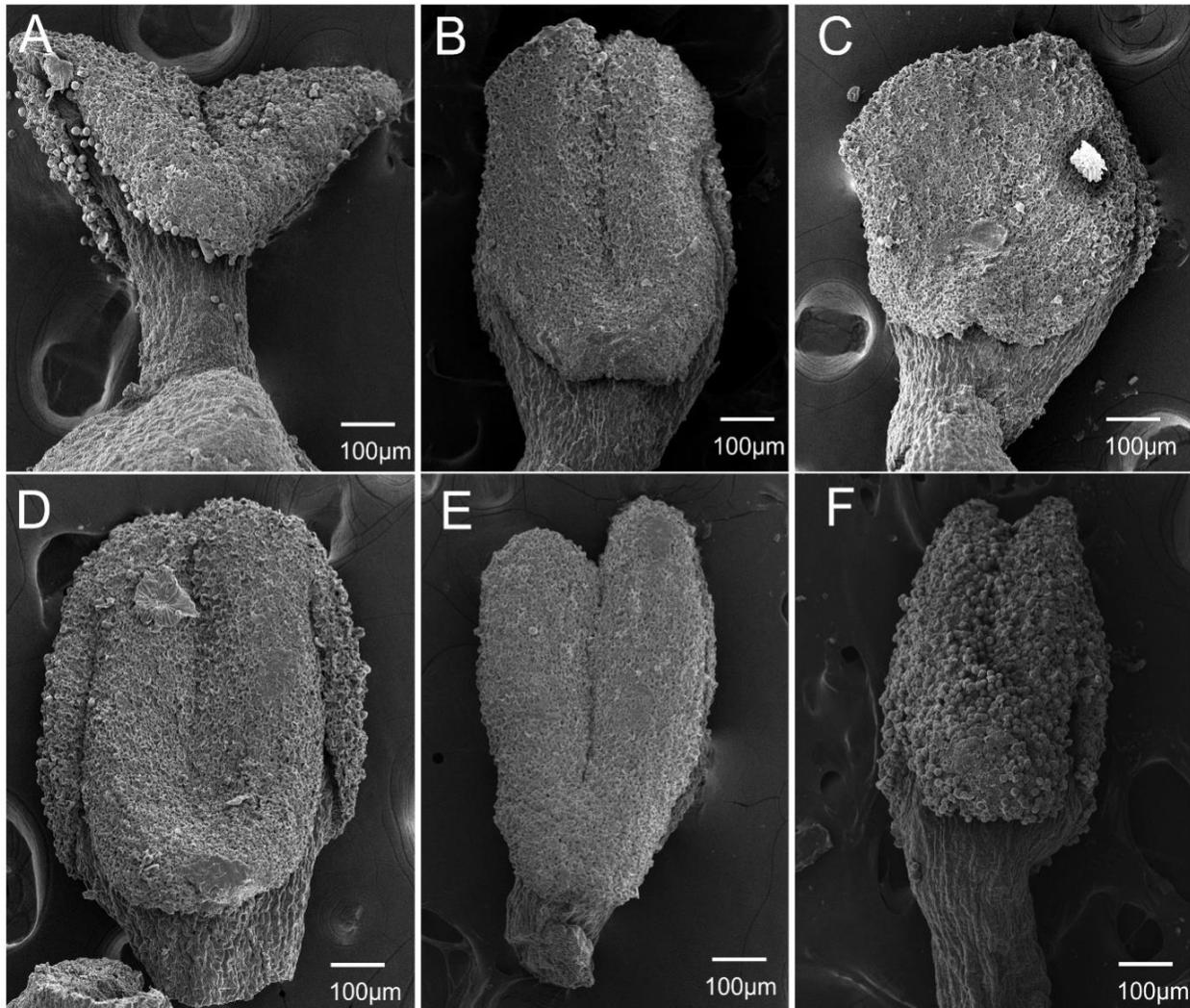


Figura 13. Micrografia eletrônica do estigma da flor de oliveira (*Olea europaea*) observada abaixo de 100X. As amostras correspondem às cultivares: A. ‘Arbequina’, B. ‘Arbosana’, C. ‘Frantoio’, D. ‘Koroneiki’, E. ‘Manzanilla de Sevilla’ e F. ‘Picual’.

Em ‘Frantoio’, o estigma apresenta lóbulos fundidos e indistinguíveis, enquanto nas restantes cinco cultivares os dois lóbulos apresentam fendas com diferentes graus de separação; sendo ‘Arbequina’ aquela que apresentou separação total dos lobos da base do estigma. Da mesma forma, em ‘Arbosana’ e ‘Koroneiki’, a separação de metade

do comprimento dos lobos do estigma não é claramente distinguida e 'Picual' e 'Manzanilla de Sevilla' apresentaram separação dos lobos na área distal.

O OR (razão do ovário) pode ser classificado em dois tipos: esférico e ovoidal, dependendo se o valor for igual a 1 ou se o valor for próximo de 1, respectivamente. O primeiro grupo inclui as cultivares 'Frantoio' (OR $1,034 \pm 0,054$), 'Manzanilla de Sevilla' (OR $1,014 \pm 0,006$) e 'Koroneiki' (OR $1,064 \pm 0,032$), enquanto as das cultivares 'Arbequina' (OR $0,833 \pm 0,012$), 'Arbosana' (OR $1,357 \pm 0,096$) e 'Picual' (OR $0,785 \pm 0,074$) são ovóides, embora 'Arbequina' e 'Picual' tenham eixo transversal maior que o longitudinal (**Tabela 7**).

Dados morfométricos sugerem que 'Koroneiki' tem o StigL (comprimento do estigma) mais longo ($810,619 \pm 19,036$), enquanto 'Arbequina' o menor (StigL $502,162 \pm 18,749$). No entanto, para 'Frantoio' a variável StigW (largura dos lóbulos do estigma, esquerdo e direito juntos) apresentou o estigma mais largo ($632,029 \pm 62,451$), o que difere significativamente dos demais. 'Arbequina', 'Arbosana', 'Koroneiki' e 'Manzanilla de Sevilla', não apresentaram diferenças significativas entre si. Já a 'Picual' teve o menor valor de StigW ($345,677 \pm 7,473$), sendo significativamente diferente de todas as outras cultivares (**Tabela 7**).

Levando em conta o cálculo de toda a área do estigma (SitgA), 'Koroneiki' (SitgA $383996,14 \pm 37647,34$) apresentou o maior valor com potencial de contato para pólen, seguido por 'Frantoio' (SitgA $357536,82 \pm 36906,52$), sendo 'Picual' a cultivar que apresentou a menor área estigmática (SitgA $217471,59 \pm 3080,53$). O estilo mais longo correspondeu ao 'Picual' (SL – comprimento do estilo $478,790 \pm 12,226$), que é o dobro do comprimento da cultivar 'Manzanilla de Sevilla' (SL $237,260 \pm 23,020$). Por sua vez, 'Frantoio' apresentou o estilo com maior diâmetro (SW – largura do estilo $350,825 \pm 8,732$), seguido de 'Arbosana' (SW $341,535 \pm 7,224$), e com 'Arbequina' (SW $185,204 \pm 7,009$) sendo o menor (**Tabela 7**).

Foi realizada uma PCA (**Figura 14**), cuja ordenação mostra o primeiro eixo (CP1), definido por StigL e StigW. O segundo eixo (CP2), claramente caracterizado por SL e StigA. A variância total explicada nos dois primeiros eixos é de 85%.

Tabela 7. Parâmetros ultraestruturais do pistilo Medições indicando diferentes dimensões do pistilo observadas sob microscopia de escaneamento de elétrons das cultivares de oliveira 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual'.

Cultivares		Razão do ovário (OR)	Comprimento do estilo (SL)	Largura do estilo (SW)	Comprimento do estigma (StigL)	Largura dos lóbulos do estigma (StigW)	Área do estigma (StigA)
Arbequina n=25	\bar{x}	0,83 c	295,57 c	185,20 f	502,16 f	518,32 b	259748 b
	s^2	$1,4 \times 10^{-4}$	60,424	49,12	351,53	349,62	$1,8 \times 10^8$
	s	0,01	7,77	7,009	18,749	18,698	13356,31
Arbosana n=25	\bar{x}	1,36 a	343,02 b	341,53 b	682,71 c	505,19 b	344870 a
	s^2	$9,2 \times 10^{-3}$	346,639	52,188	64,677	27,42	$3,5 \times 10^8$
	s	0,09	18,62	7,224	8,042	751,73	18864,2
Frantoio n=25	\bar{x}	1,034 b	332,05 b	350,82 a	561,410 e	632,03 a	357536 a
	s^2	$2,9 \times 10^{-3}$	137,06	76,256	105,148	3900,19	$1,4 \times 10^9$
	s	0,054	11,71	8,73	10,254	62,45	36906,5
Koroneiki n=25	\bar{x}	1,06 b	314,01 b c	239,64 c	810,62 a	473,47 b	383996 a
	s^2	$1,0 \times 10^{-3}$	297,67	51,66	362,38	1835,44	$1,4 \times 10^9$
	s	0,032	17,253	7,187	19,036	17,49	37647,3
Manzanilla de Sevilla n=25	\bar{x}	1,01 b	237,26 d	216,9 d	750,76 b	474,86 b	356844 a
	s^2	$3,6 \times 10^{-5}$	529,93	55,441	11,335	452,18	$3,9 \times 10^8$
	s	0,01	23,02	7,45	10,50	21,26	19742,73
Picual n=25	\bar{x}	0,785 c	478,79 a	201,18 e	628,68 d	345,677 c	217471 b
	s^2	$5,4 \times 10^{-3}$	149,47	55,956	127,740	55,85	$5,7 \times 10^7$
	s	0,07	12,23	7,48	11,30	7,47	3080,5

a) As medidas SL, WL, StigL e StigW são expressas em μm ; StigA é expresso em μm^2 , e OR é sem unidade.

b) Os dados apresentados são, média (\bar{x}), variância (s^2) e desvio padrão(s). Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($P \leq 0,05$).

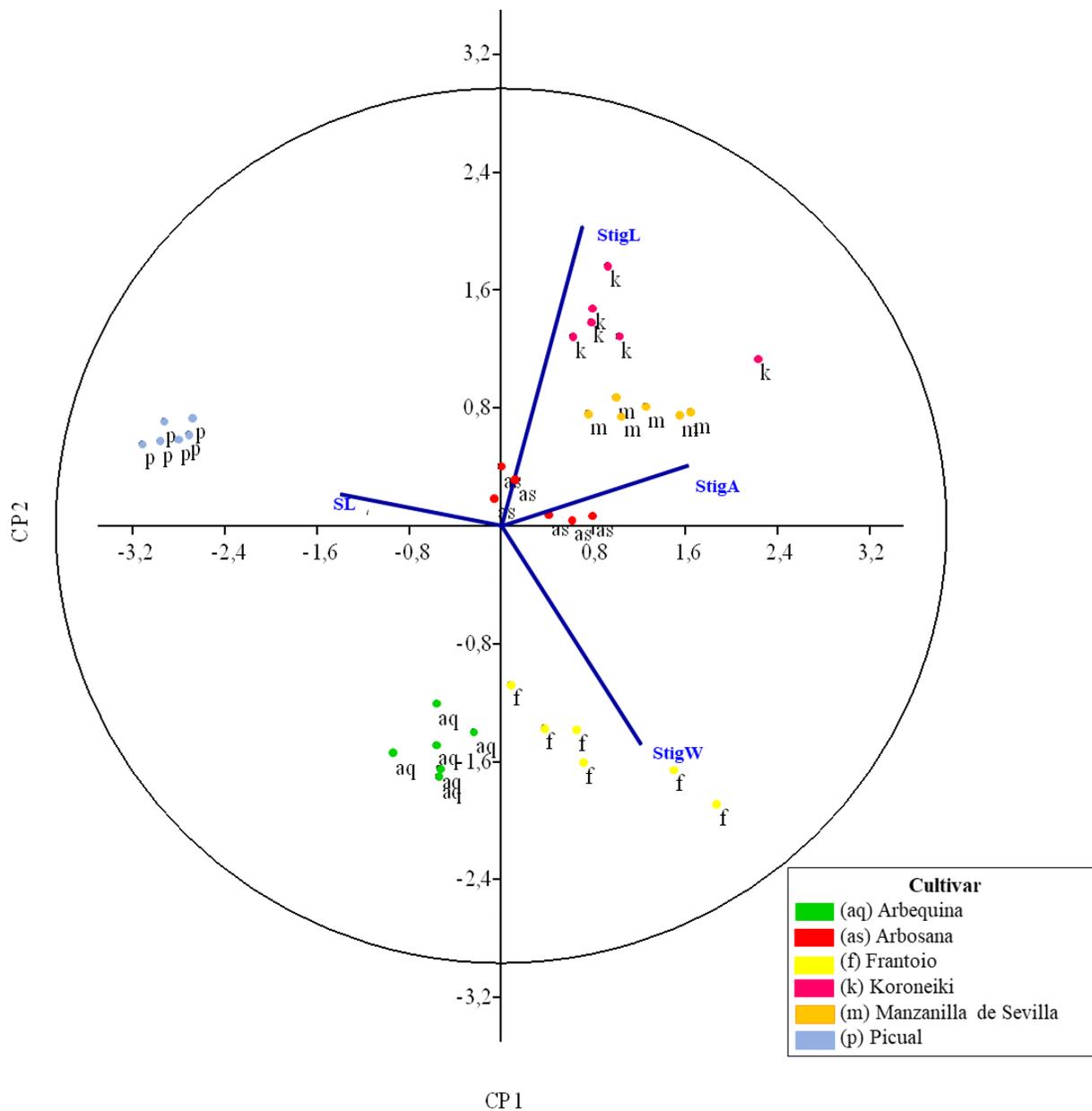


Figura 14. Análise dos Componentes Principais para os parâmetros ultraestruturais do pistilo das cultivares de oliveira ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, ‘Frantoio’, ‘Koroneiki’, ‘Manzanilla de Sevilla’ e ‘Picual’ com base nos vetores das variáveis comprimento do estilo (SL), comprimento do estigma (StigL), largura do estigma (StigW) e área do estigma (StigA).

O eixo do CP1 mostra um gradiente descendente nos valores StigL que separa ‘Koroneiki’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Arbosana’, ‘Frantoio’ e ‘Arbequina’. No entanto, StigW tem um componente no mesmo eixo, mas na direção oposta. O eixo do CP2,

separa claramente 'Picual', que se caracteriza por ter maior comprimento do estilete (SL) e menor área potencial de contato dos lóbulos do estigma.

3.5. Discussão

Apesar da grande difusão da olivicultura no mundo, as informações disponíveis sobre a descrição de suas estruturas reprodutivas são escassas e fragmentadas. Apresenta-se geralmente como uma flor pequena, actinomórfica com tamanho entre 4 e 5 mm, com quatro pétalas brancas ou creme e a mesma quantidade de sépalas verdes em forma de taça (ÖZKAYA et al., 2004; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009). O pistilo é composto por um ovário bilocular superior com estilete curto e estigma bifido, relativamente longo e altamente variável (SEIFI, 2008; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009). Já o androceu é formado por duas grandes anteras amarelas, deiscentes longitudinalmente na maturidade e com número variável de grãos de pólen que parecem depender da cultivar (ROJO, 2014; ROJO et al., 2015; SEIFI, 2008).

Diante dessas informações pouco detalhadas sobre o órgão reprodutor e suas diferenças entre as cultivares, também, pelo fato de não ter sido feita nenhum estudo nesse âmbito na região Sul do Brasil, optou-se por realizar uma caracterização morfológica dos grãos de pólen e do pistilo, visando sua utilização como ferramentas para discriminar as diferentes cultivares.

A combinação de diferentes métodos de identificação de cultivares é altamente recomendada, principalmente em bancos de germoplasma. Porém, até o momento, o uso de caracteres morfológicos do pólen como elementos discriminativos tem sido muito limitado (FENDRI, 2011; FENDRI et al., 2011).

3.5.1. Pólen

Os estudos de viabilidade e desenvolvimento do pólen dependem de fatores ambientais, como fotoperíodo, irradiação, temperatura e umidade relativa (GARCÍA et al., 2015). Ejsmond et al. (2011), citam que a produção de pólen está intimamente relacionada à temperatura ambiente por meio da otimização do número e tamanho dos

grãos produzidos. À medida que a temperatura aumenta, as plantas produzem grãos maiores, mas, como um tamanho maior não compensa totalmente o aumento das taxas de dessecação em temperaturas mais altas, os grãos têm menos chance de polinização bem-sucedida. No entanto, a temperatura não parece afetar significativamente a forma ou estrutura do pólen (EJSMOND et al., 2011; LENOIR et al., 2008). Portanto, as condições ambientais do Sul do Brasil não devem influenciar a morfologia, podendo ser utilizada como características para discriminar as cultivares.

Os estudos mostraram que 'Koroneiki' e 'Arbequina' apresentaram os maiores valores de contagem de grãos de pólen, enquanto os menores valores corresponderam a 'Picual' e 'Manzanilla de Sevilla'. O número de grãos de pólen por flor calculado para Arbequina são próximos aos relatados por SILVA (2014) para a mesma variedade, no entanto, não é o caso do Koroneiki, cujo valor é representativamente muito maior ao reportado. Cabe ressaltar que os valores reportados por Silva (2014) analisando 28 variedades no Brasil mostram intervalos de variação de 56676 na variedade Maria da Fe MGS Mariense até 145458 Ascolano 315 MGS AS 315. As cultivares com pouco pólen apresentaram grãos maiores, enquanto as que produziram grãos pequenos o tiveram em grande quantidade, sendo esta última estratégia a mais adaptada à anemofilia (FAEGRI e VAN DER PIJL, 1979; CARIÑANOS e MARINANGELI, 2021; YAMAMOTO et al., 2007). O número de grãos de pólen por flor para 'Arbequina' e 'Arbosana' foram semelhantes aos relatados por Ferrara et al. (2007), para as mesmas cultivares na Itália (111,258 e 90,180, respectivamente). Da mesma forma, o valor obtido em 'Picual' foi semelhante ao relatado por Aguilera e Ruiz (2012) em localidades espanholas.

De acordo com o sistema de classificação proposto por Valdés et al. (1987), os valores médios de diâmetro máximo obtidos neste estudo, entre 12 e 20 μm , são considerados pequenos, mantendo-se esses valores independentemente dos três locais de estudo. Esses resultados são inferiores aos obtidos em cultivares da Itália, Espanha ou Portugal, que podem variar entre 19 e 38 μm (CASTRO et al., 2010; KOUBOURIS et al., 2012; LANZA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2010). Esse menor tamanho de pólen pode ser devido a uma resposta ecofisiológica das árvores para se adaptar às condições de maior umidade encontradas no Sul do Brasil, em comparação com os níveis de estresse por déficit hídrico que a olivicultura encontra na Bacia do Mar Mediterrâneo.

A grande quantidade de grãos de pólen nas anteras, e o grande número de flores e inflorescências na árvore, no caso da oliveira, compensa a grande perda de pólen durante seu transporte pelo ar (CASTRO et al., 2010; SUÁREZ et al., 2012). Essa perda pode ser afetada pelo excesso de umidade durante o desenvolvimento das flores, limitando e comprometendo ainda mais os dias de polinização efetiva (CUEVAS et al., 2005).

Em 'Koroneiki', o diâmetro máximo, a relação L-W e o índice de tamanho são inferiores aos relatados por Koubouris et al. (2012), cujas medidas foram 22,68 μm ; 1,47 e 3,51, respectivamente. No entanto, as medidas de diâmetro mínimo tendem a ser semelhantes. Para o caso de 'Picual', este estudo apresentou valores de diâmetro máximo e mínimo que mal atingiram a metade dos valores relatados por Castro et al. (2010). Além disso, ao comparar a relação L-W, os grãos aqui analisados tendem a ser esferoidais, enquanto os de Castro et al. (2010) são marcadamente elipsoidais (1,37) quando secos e tendem a ser esferoidais quando hidratados (1,08). Embora a 'Arbequina' tenha apresentado o maior L-W, seu valor ainda é inferior ao valor mínimo apresentado para as três cultivares estudadas por Koubouris et al. (2012), sendo mais evidente o caso de 'Koroneiki', cujo quociente está bem abaixo do valor de 1,45 para a mesma cultivar.

Apesar dos grãos de pólen de 'Manzanilla de Sevilla' serem os maiores, eles atingiram a categoria de grãos pequenos, de acordo com a faixa estabelecida por Valdés et al. (1987), como um sistema de classificação de variedades de oliveira com base nos caracteres polínicos.

Detalhes da exina em cada cultivar são visíveis e podem ser separados morfológicamente. Diferenças específicas também foram encontradas no padrão de exina na Itália, Portugal e Espanha usando microscopia de varredura (FERNANDEZ-FERNANDEZ e RODRIGUEZ-GARCÍA, 1985; FENDRI, 2011; FENDRI et al., 2011; LANZA et al., 1996; PACINI e VOSA, 1979; RIBEIRO et al., 2012). O padrão de exina pode ser utilizado para diferenciar cultivares, pois varia entre cultivares e essa variação é mantida em diferentes ambientes.

'Frantoio' e 'Manzanilla de Sevilla' apresentam diferenças marcantes, pois são caracterizadas por um lúmen reduzido e uma estrutura de paredes largas, com

elementos escultóricos pontiagudos, conspícuos e amplamente espaçados. Por outro lado, 'Arbosana', 'Arbequina', 'Picual' e 'Koroneiki', podem ser facilmente separados por terem uma área de lúmen maior, com elementos estruturais de parede levemente arredondados e sem destaque. Essa combinação de caracteres aumenta a possibilidade de uma identificação correta, uma vez que a maioria dos trabalhos geralmente utiliza apenas tamanho de grão e tamanho de exina (CASTRO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012).

Ao comparar a área do lúmen entre as seis cultivares analisadas, pode-se inferir que, o pólen de 'Frantoio' e 'Manzanilla de Sevilla', cujas áreas do lúmen são pequenas e possuem paredes largas, poderia ser mais pesado para ser transportados pelo vento, se comparados com 'Picual', 'Koroneiki', 'Arbequina' ou 'Arbosana', cujo lúmen é maior e de paredes finas, o que implica ter uma maior relação superfície/volume e, portanto, podem percorrer uma distância maior, o que os torna bons candidatos como culturas doadoras de pólen.

3.5.2. Pistilo

Diferenças no tamanho e forma do pistilo foram encontradas nas cultivares estudadas. A análise anatômica dos pistilos mostrou um estigma com exsudatos na superfície. Segundo estudos, esses exsudatos permitem a aderência, reconhecimento e hidratação dos grãos de pólen (HERRERO, 1992; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009). Além disso, um estilete com organização celular compacta e ovário bilocular, coincide com o observado por Ciampolini et al. (1983). No caso do Picual, observa-se que é composto por papilas dispostas de forma pseudoestratificada, semelhante à estrutura multicelular indicada por Serrano et al. (2008), para a mesma cultivar.

As características diferenciais entre as cultivares sugerem que o órgão feminino poderia ser um caráter morfológico mais estável e útil na identificação de oliveiras. A estrutura do pistilo para 'Picual' foi semelhante à descrição indicada por Serrano (2008), que menciona que possui um estigma papilar bilobado úmido. Além disso, a cultivar possui um estilo simples e sólido semelhante a 'Arbosana', 'Manzanilla' e 'Koroneiki', característica previamente relatada por Rapoport (2008).

No estigma de ‘Picual’ e ‘Koroneiki’, as papilas epidérmicas apresentam claramente uma estrutura com maior área de contato, embora a superfície seja lisa, em contraste com ‘Manzanilla’. A conformação da superfície das papilas presentes em ‘Arbequina’ é complexa e apresenta pequenas fissuras que aumentam ainda mais a superfície de adesão do pólen.

Apesar dos diferentes padrões teciduais observados no estigma e no estilete, uma característica estrutural comum em todas as cultivares foi a semelhança na forma cônica do tecido papilar receptivo do estigma e sua continuidade com o tecido transmissor no estilete. Essa configuração poderia servir como filtro para o desenvolvimento do tubo polínico, pois foi observado que um número reduzido de grãos de pólen penetra além das primeiras camadas das células do estigma (CUEVAS e POLITO, 1997; SÁNCHEZ-ESTRADA e CUEVAS, 2018; SÁNCHEZ-ESTRADA e CUEVAS, 2019; SERRANO et al., 2008; SUÁREZ, 2009).

3.5.3. Análises multivariadas

Neste estudo os caracteres agrupados pela análise de componentes principais, parecem ser eficazes para separar cultivares. No entanto, essa ideia não corrobora a proposta de Xu e Kirchoff (2008), que mencionam que as medidas analisadas separadamente fornecem uma maneira melhor de explorar as diferenças entre cultivares, quando comparadas com análises multivariadas complexas, nas quais as diferenças das cultivares aparentemente não são claras.

3.6. Conclusões

O número de grãos de pólen não parece variar quando a mesma cultivar foi avaliada em diferentes locais, porém, apresentaram diferenças entre as cultivares. As cultivares ‘Koroneiki’ e ‘Arbequina’ apresentaram grãos de pólen menores, porém em maior número, o que as torna boas candidatas como doadores de pólen, além de estarem melhor adaptados à polinização da anemofilia. Características como área de lúmen, largura, altura, forma e distância entre elementos estruturais na parede de grãos de pólen

observados sob microscopia eletrônica de varredura, permitem separar as diferentes cultivares de oliveira. Da mesma forma, o uso de caracteres anatômicos e ultraestruturais dos pistilos, como comprimento de estilo, comprimento, largura e área do estigma, mostrou uma notável uniformidade dentro de cada cultivar examinada, sendo diferente entre as cultivares. O uso da análise de componentes principais pode ser uma ferramenta estatística que permite separar morfologicamente cultivares de oliveira baseadas em caracteres florais, independentemente das condições locais do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

4. CAPÍTULO II - Caracterização e herdabilidade de frutos de cultivares comerciais de oliveira no Sul do Brasil

4.1. Resumo

A oliveira é uma espécie de grande importância histórica e econômica para o mundo. Por ser uma árvore perene, de vida longa, tem apresentado grande variabilidade fenotípica, representada por uma ampla gama de cultivares espalhadas em diferentes países. Existem vários estudos sobre a caracterização da espécie e das cultivares. No entanto, há necessidade de descobrir como essas características fenotípicas são herdadas e como a plasticidade da oliveira pode mudar independentemente de sua origem genética quando as condições ambientais variam. Foi realizado um estudo em seis cultivares comerciais, em um único ano e um único local (Fazenda Mato Grande da empresa Verde Louro, município de Canguçu, RS), a partir da análise do diâmetro máximo e mínimo do fruto com e sem meso e ectocarpo. Além disso, foram feitas análises químicas de qualidade do óleo sob condições de umidade, vento e temperatura do estado do Rio Grande do Sul. A plasticidade fenotípica e a herdabilidade no sentido amplo foram estimadas nas comparações inter e intracultivares. A partir das análises de variância e herdabilidade, observou-se que algumas cultivares como 'Koroneiki' ou 'Picual' tiveram seus caracteres principalmente sob controle genético, enquanto 'Arbequina' foi mais influenciada pelas condições ambientais. As informações derivadas deste trabalho ajudarão a orientar a seleção das cultivares que melhor se adaptam aos ambientes locais da região Sul do Brasil.

4.2. Introdução

O homem ao longo da história tem sido responsável pela propagação do cultivo de oliveiras na bacia do Mar Mediterrâneo. Devido aos interesses comerciais as oliveiras foram introduzidas fora de sua área de origem, como o Sudoeste Asiático, Oceania, África do Sul e América, rompendo assim as barreiras da dispersão natural (ALFIERI et al., 2019). Nesses novos espaços colonizados, a cultura se adaptou a novas e diferentes

condições climáticas, algumas favoráveis e outras limitantes para seu desenvolvimento (LORITE et al., 2018; MOUSAVI et al., 2019).

A maioria das cultivares utilizadas são manejadas e tradicionalmente selecionadas apenas por meio de melhoramento de caracteres agrônômicos representativos, questão que não necessariamente as torna mais adaptadas às condições de produtividade superintensiva dos sistemas agrícolas modernos nos novos lugares colonizados (LAVEE e AVIDAN, 2012; COI, 2023). A oliveira pode sobreviver e se reproduzir em diferentes condições ecológicas devido à alta variabilidade genética dentro da espécie e às várias interações naturais entre as diferentes cultivares e seus ambientes próximos. No entanto, a seleção antropogênica de cultivares adequadas, embora consiga superar as limitações ambientais locais, pode ser confundida com uma maior diversificação de fenótipos, quando na verdade a diversidade genética está sendo reduzida (RALLO et al., 2005; ADAKALIC e LAZOVIC, 2018), para atender às demandas locais do produtor.

Apesar da descrição relativamente recente do genoma da oliveira (CRUZ et al., 2016) e da existência de inúmeras investigações sobre a caracterização genética de várias cultivares (JULCA et al., 2020), há pouca informação conhecida sobre o comportamento hereditário dos caracteres, em parte devido ao lento crescimento e desenvolvimento das árvores (MORA et al., 2008). Além disso, há informações limitadas sobre a correlação entre genótipo e fenótipo e sobre a eficácia da seleção de cultivares bem adaptadas a novos ambientes fora da bacia do Mediterrâneo (MOUSAVI et al., 2019) e especialmente aquelas no Sul do Brasil.

A capacidade das plantas de variar fisiológica e morfológicamente para enfrentar e se adaptar a diversas limitações ou vantagens ambientais, expressando diferenças em seus fenótipos é chamada de plasticidade fenotípica. O grau de plasticidade depende muito da variação genotípica, que pode aumentar ou diminuir a adaptação da planta às condições específicas do ambiente ao seu redor (WHITMAN e ANURAG, 2009). Já a herdabilidade pode ser vista como um parâmetro que expressa a proporção da variação fenotípica total atribuída ao efeito médio dos genes (FALCONER e MACKAY, 1996). No entanto, mudanças nessa ideia levaram à chamada herdabilidade de sentido amplo (H^2), que envolve a proporção da variância que se deve a todos os efeitos genéticos. O papel

mais importante de estimar a herdabilidade é prever o ganho genético (revisado por FERNANDES et al., 2021). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os frutos de oliveiras e estimar os coeficientes de herdabilidade para características agronômicas de seis cultivares comerciais, nas condições edafoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.3. Material e Métodos

Neste estudo foram avaliadas seis cultivares comerciais 'Arbequina', 'Arbosana', 'Frantoio', 'Koroneiki', 'Manzanilla de Sevilla' e 'Picual' de oliveira (*Olea europaea* L.). Dez plantas de cada cultivar foram amostradas (60 árvores no total). Aproximadamente 2 a 3 kg de frutos foram coletados de cada árvore, obtendo-se um número variável de frutos (repetições) avaliados. As coletas foram feitas em fevereiro de 2021, no período de colheita das azeitonas. Após a colheita, os frutos foram armazenados a -20°C até o momento das análises. As oliveiras pertencem à empresa "Verde Louro (Fazenda Mato Grande)" (UTM 31.474477S; 52.9473309W), Município de Canguçu; localizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (**Figura 15**).



Figura 15. Vista panorâmica da olivicultura na Fazenda Mato Grande "Verde Louro", Município de Canguçu, RS, Brasil.

O clima observado durante o tempo de colheita foi caracterizado por apenas dois eventos de precipitação acima de 20 mm e 6 dias com precipitações abaixo dos 10 mm, sendo o restante dias secos. Uma temperatura média de 20,5°C, no entanto, com intervalo mínimo de 14°C e máximo entre 30°C, e radiação solar perto do 4000 KJ m². O vento alcançou velocidade máximo de 9m s⁻¹ (**Figura 16**).

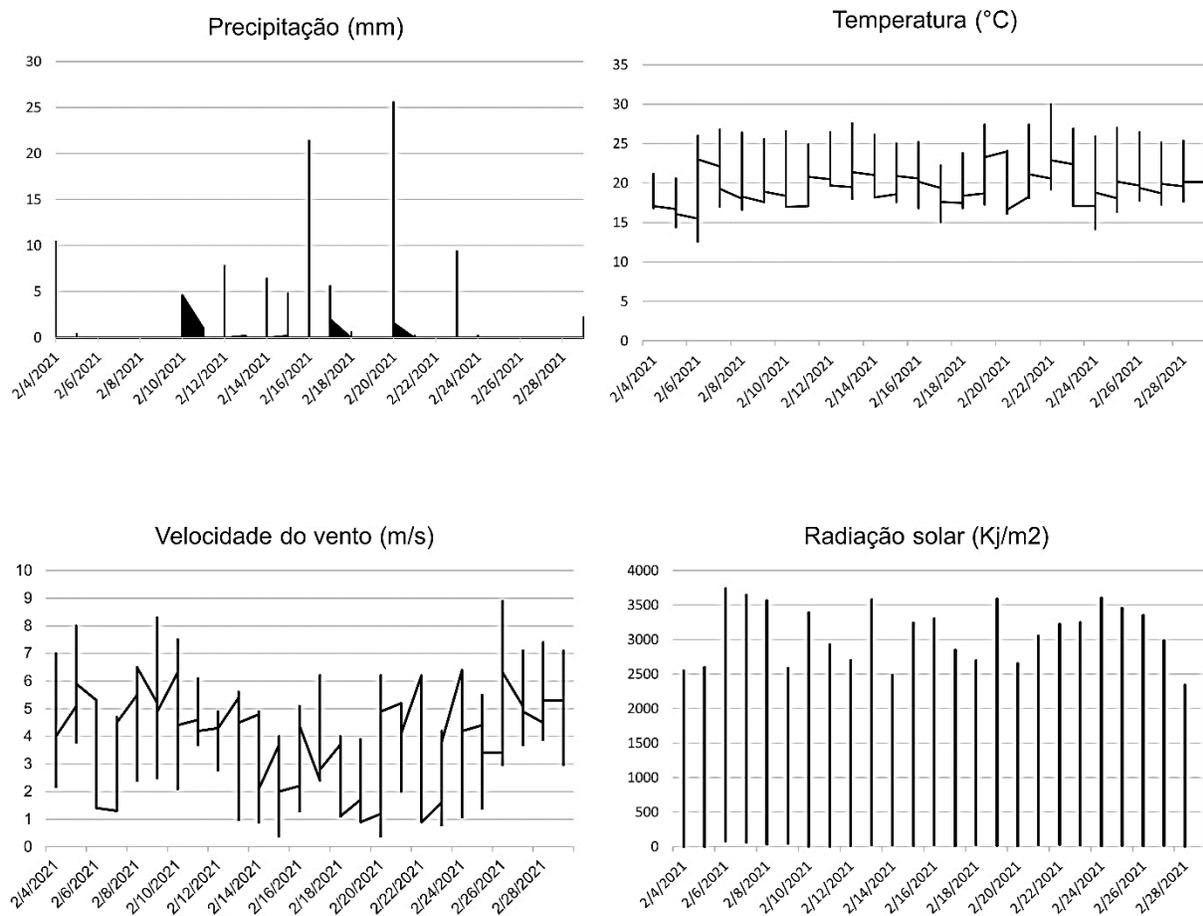


Figura 16. Perfil climático do mês de fevereiro de 2021, durante a colheita de frutos. Dados da Estação Meteorológica de "Canguçu, WMO: A811", com base no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.

4.3.1. Parâmetros biométricos avaliados na fruta

Foram avaliados 33.522 frutos com um paquímetro digital (0,01 mm), marca Starrett. As medidas feitas são: comprimento (FL) e largura do fruto (FW). A partir dessas

variáveis, foi calculada a razão entre comprimento e largura (FL/FW). Com uma balança (marca Shimadzu, precisão de 0,01 g), cada fruto também foi pesado (FFW).

O exo e o mesocarpo (polpa) foram retirados de cada fruto, deixando o endocarpo livre, ao qual foram feitas as medidas do comprimento do endocarpo (EL) e da largura do endocarpo (EW). A partir dessas variáveis, foi calculada a razão entre comprimento e largura (EL/EW). O peso do endocarpo fresco (FEW) também foi medido. Por fim, foi determinado o rendimento de óleo (FY).

4.3.2. Obtenção do azeite e parâmetros medidos

De cada árvore amostrada, 350 g de frutos foram selecionados aleatoriamente para todas as cultivares estudadas. Para a extração do óleo, foi seguido um protocolo descrito por Zarrouk et al. (2008). Para a moagem e esmagamento dos frutos foi utilizado um Multiprocessador de Alimentos Philco PMP1600V (1400W), sendo aplicado por 40 minutos a uma temperatura de 25°C, obtendo-se uma pasta. A pasta oleosa obtida foi centrifugada a 13 g por 3 minutos em uma centrífuga Eppendorf 5810, utilizando tubos de 50 mL. O sobrenadante (óleo) foi recuperado de cada tubo, deixando resíduos vegetais e água no fundo. O óleo obtido foi mantido a 4°C em completa escuridão até a análise.

4.3.2.1. Grau de acidez

A medida do grau de acidez (DA) foi feita com base na metodologia de Moncayo (2016), com modificações. Em uma balança de precisão 0,01g, em um Erlenmeyer de 250 mL foi pesado entre 4 e 6 g de óleo. Adicionou-se 50 mL de etanol-éter a 50% ao óleo, neutralizou-se com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N e agitou-se até a dissolução completa do óleo. Após, 1 mL de indicador de fenolftaleína (1%) foi adicionado e a solução foi agitada. A titulação foi realizada com hidróxido de sódio até que a coloração mudasse para rosa (**Figura 17**). O grau de acidez foi apresentado em porcentagem de ácido oleico.

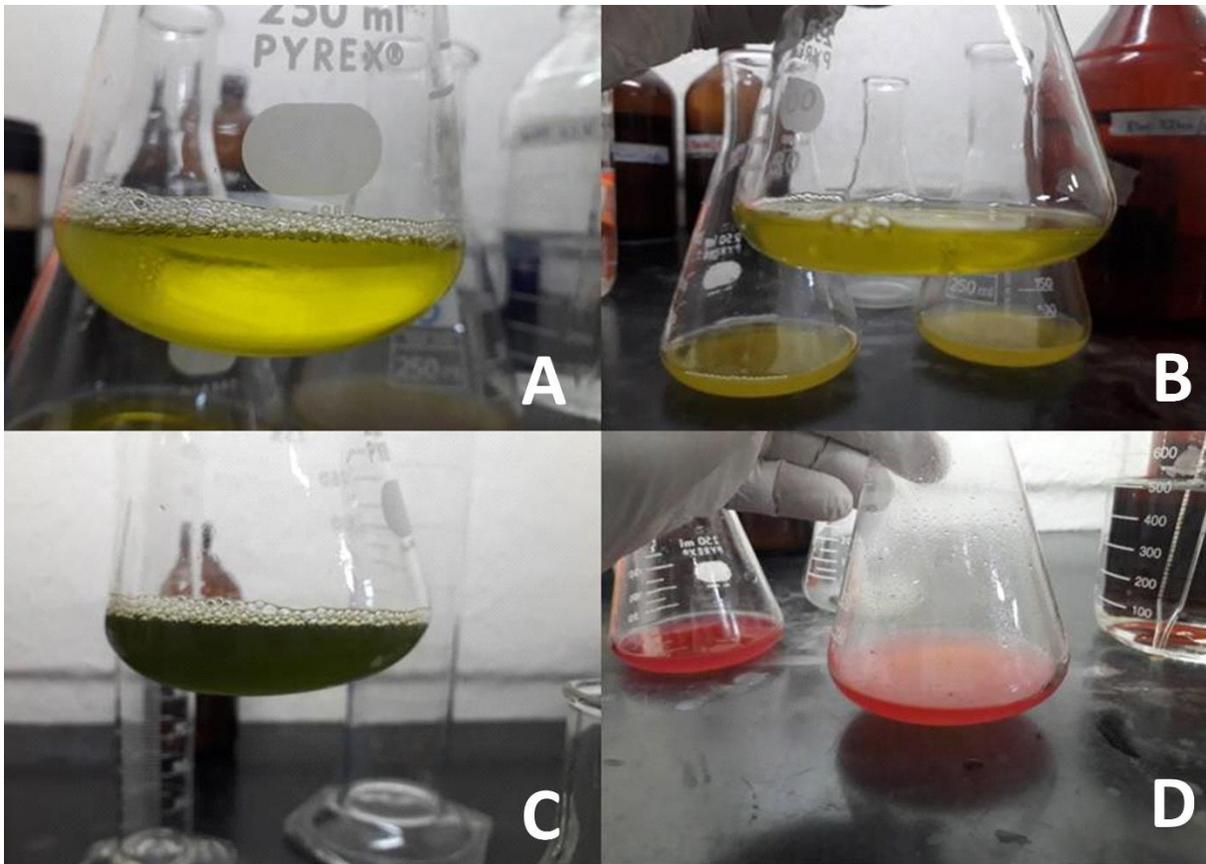


Figura 17. Processo de titulação e determinação do grau de acidez. A. Azeite da cultivar 'Arbequina', B. Azeite da cultivar 'Manzanilla de Sevilla', C. Azeite da cultivar 'Picual' e D. Amostra de azeite após da titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N.

A fórmula utilizada para calcular o grau de acidez expresso em % ácido oleico foi:

$$DA = \frac{Pm * V * N}{P} * 100$$

Onde:

DA: é o grau de acidez expresso em % de ácido oleico,

V: é o volume consumido na titulação de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N,

N: é igual à normalidade do hidróxido de sódio (NaOH),

Pm: é o peso molecular do ácido oleico (aproximadamente 282 g/mol) e

P: é o peso em gramas do óleo.

4.3.2.2. Índice de peróxido

O índice de peróxido (IP) foi determinado pela quantidade de peróxidos presentes nas amostras, que provocam a oxidação do iodeto de potássio em condições de trabalho. Para a detecção de peróxidos, foi utilizada a metodologia de Barranco (2008) e Moncayo (2016) com modificações.

Entre 1,8 e 2,2 g de amostra de óleo foram adicionados em 25 mL de ácido acético-clorofórmio (3:2) e 1 mL de solução de iodeto de potássio (13,7 g de iodeto de potássio e 10 mL de água). Agitou-se suavemente e ficou no escuro por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 75 mL de água destilada e várias gotas de amido para desempenhar o papel de indicador. Foi fortemente agitado e titulado com tiossulfato de sódio (0,002N) até mudar de cor de violeta para branco. Os resultados foram apresentados em mEq de O₂ ativo Kg⁻¹ de óleo.

A fórmula utilizada para calcular o índice de peróxido em mEq de O₂ ativo kg⁻¹ de óleo é:

$$PI = \frac{V * N}{P} * 1000$$

Onde:

PI: é o Índice de Peróxido expresso em mEq O₂ kg⁻¹ de óleo,

V: é o Volume Gasto de Tiossulfato de Sódio (0,002 N) na titulação,

N: é igual à Normalidade do tiossulfato de sódio utilizado na titulação e

P: é o Peso da amostra do azeite.

4.3.3. Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas descritivas das diferentes variáveis. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis FL, FW, EL e EW foram submetidas a transformação dos dados usando Box Cox do pacote bestNormalize do RStudio 4.2.2 (R CORE TEAM, 2018). Todas as outras variáveis apresentaram distribuição normal; portanto, nenhuma transformação foi aplicada. Foi

feita análise de variância (ANOVA). Posteriormente, correlação de Pearson foi realizada usando o pacote estatístico RStudio e PAST (R CORE TEAM, 2018; HAMMER et al., 2021). A variabilidade das variáveis entre as cultivares foi visualizada usando o ViolinPlot com RStudio (R CORE TEAM, 2018) e os contrastes dos dados foram testados com Tukey ($P \leq 0,05$).

As estimativas quantitativas da plasticidade fenotípica (PP) foram calculadas usando uma abordagem simplificada, avaliando o efeito da plasticidade fenotípica dentro de cada árvore em cada cultivar avaliada separadamente. O cálculo foi baseado no desvio padrão das médias dividido pela média das médias ajustadas como covariável. Espera-se que tal covariável influencie a variável ou característica alvo (NAVAS e GARNIE, 2002).

A herdabilidade de sentido amplo (H^2) para todas as características avaliadas é estimada pela relação entre as variações genóticas e fenotípicas entre cultivares utilizando-se a variação das medidas de frutos entre cultivares e entre cada árvore avaliada dentro de cada cultivar.

4.4. Resultados

A análise de variância foi aplicada a todas as variáveis medidas, tanto antes (frutos inteiros) quanto após a extração do exo e do mesocarpo, entre e dentro das cultivares. Em todos os casos, pelo menos uma cultivar foi significativamente diferente (**Tabela 8**). Observou-se que todas as variáveis analisadas apresentaram grande variação entre e dentro das cultivares.

Foi realizada uma análise de correlação de Pearson para as características avaliadas (**Figura 18**). Um padrão associativo com significância positiva esteve presente entre o comprimento (FL) e a largura (FW) do fruto inteiro ($r = 0,78378$; $p = 0,002$). Outras variáveis igualmente altamente correlacionadas foram o peso do fruto fresco (PF), cujos valores apresentaram maior correlação com a largura do fruto (PF) ($r = 0,72112$; $p = 0,002$), do que com o comprimento (FL) ($r = 0,66715$, $p = 0,003$). Padrões de correlação de baixa magnitude igualmente positivos também foram observados entre comprimento

do endocarpo (EL) e largura (EW) ($r = 0,12208$; $p = 0,000$) e peso do endocarpo (FEW) com seu comprimento (EL) ($r = 0,15389$; $p = 0,001$).

Tabela 8. Análises de variância comparando as diferentes medições de frutos entre as cultivares (Arbequina, Arbosana, Frantoio, Koroneiki, Manzanilla de Sevilla e Picual).

Fonte de Variação	SQ	GL	F	Pr(>F)	
Comprimento do fruto (FL)	170,199	5	24,569	1,1e-16	***
Largura do fruto (FW)	620,111	5	101,213	1,3 e-12	***
Razão entre comprimento e largura do fruto (FL/FW)	646,412	5	165,221	1,9 e-14	***
Peso do Fruto (FFW)	74,421	5	155,296	1,21e-16	***
Comprimento do endocarpo (EL)	7,902	5	6,648	1,07e-13	***
Largura do endocarpo (EW)	4,542	5	55,891	2,2e-16	***
Razão entre comprimento e largura do endocarpo (EL/EW)	11,676	5	60,988	6,4e-5	**
Peso do endocarpo (FEW)	6,185	5		4.543e-11	***
Grau de Acidez (DA)	132,283	5	20,54	2,3e-15	***
Índice de Peróxido (PI)	696,466	5	8,02	1,41e-16	***

*SQ: Soma de quadrado, GL: graus de liberdade, F: valor calculado F de Fischer, Pr(>F): contraste com a probabilidade teórica.

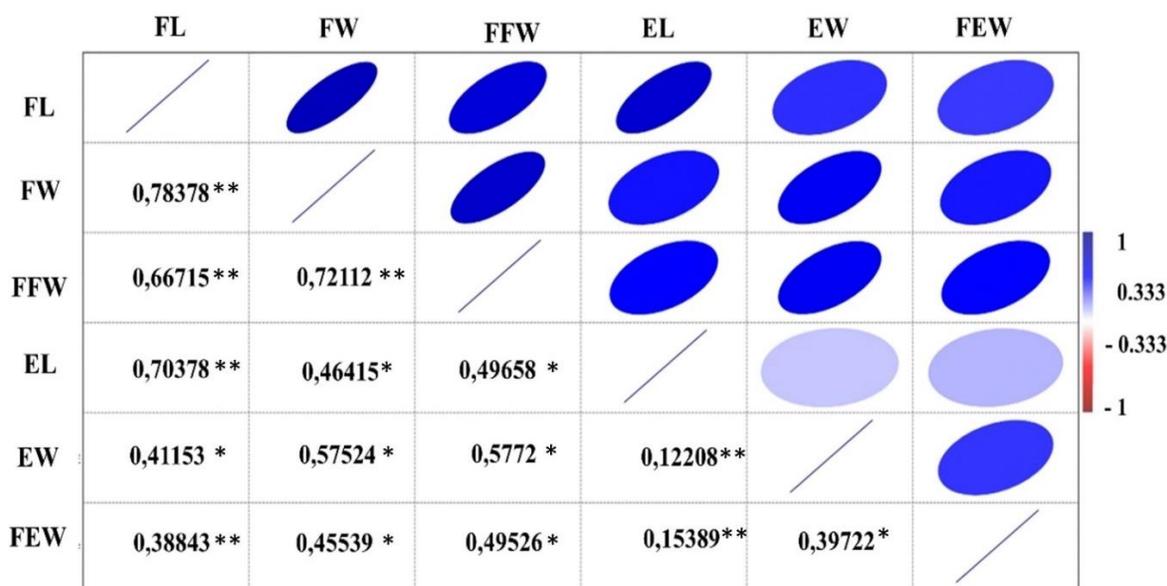


Figura 18. Análise de correlação para as variáveis comprimento do fruto (FL), largura do fruto (FW), peso fresco do fruto (FFW), comprimento do endocarpo (EL), largura do endocarpo (EW) e peso do endocarpo fresco (FEW). Os asteriscos apresentam nível de significância, * 5% e ** 1%.

4.4.1. Caracterização de frutos de diferentes cultivares

Os maiores valores médios da característica FL (comprimento do fruto) foram observados em 'Picual' e 'Manzanilla de Sevilla' (22,21±1,95 e 20,63±1,81 mm, respectivamente), apresentando diferenças significativas em relação às demais cultivares, enquanto a maior variabilidade para esta característica foi detectada em 'Arbequina' e 'Arbosana' (Tabela 9; Figura 19A).

Tabela 9. Caracterização dos frutos de oliveira das cultivares de azeitona 'Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi). As características avaliadas foram: comprimento do fruto (FL); largura do fruto (FW); peso do fruto fresco (FFW); comprimento do endocarpo (EL); largura do endocarpo (EW); peso do endocarpo fresco (FEW); relação entre comprimento e largura do fruto (FL/FW); relação entre comprimento e largura do endocarpo (EL/EW); rendimento de gordura (FY).

Cultivar		FL	FW	FFW	EL	EW	FEW	FL/FW	EL/EW	FY
Aq	\bar{x}	10,22 d	10,0 c	1,48 b	8,35 b	6,8 a	0,48 a	1,00 b	1,24 c	67,22 b
	S	2,80	2,83	0,50	0,96	1,05	0,28	0,05	0,15	18,28
As	\bar{x}	14,99 c	12,54 b	1,48 b	9,77 b	7,6 a	0,48 a	1,15 b	1,29 c	66,90 b
	S	2,20	0,90	0,49	1,16	0,59	0,27	0,05	0,18	17,49 b
Fr	\bar{x}	16,80 b	12,03 b	1,90 b	12,08 a	6,8 a	0,92 a	1,41 a	1,81 b	49,80
	S	1,78	1,16	0,42	1,17	0,84	0,31	0,20	0,29	19,00
Ko	\bar{x}	14,81 c	9,97 c	1,21 b	12,81 a	5,2 a	0,31 a	1,52 a	2,62 a	70,86 a
	S	1,30	1,32	0,38	1,28	1,10	0,08	0,27	0,69	15,76
MS	\bar{x}	20,63 a	17,75 a	3,94 a	12,52 a	7,4 a	0,84 a	1,17 b	1,75 b	76,72 a
	S	1,81	1,27	1,10	1,09	1,37	0,32	0,12	0,44	11,72
Pi	\bar{x}	22,21 a	15,99 a	4,81 a	15,57 a	8,7 a	0,78 a	1,40 a	1,79 b	82,48 a
	S	1,95	1,17	1,19	1,84	0,78	0,15	0,16	0,25	6,50

As medidas (FL, FW, EL e EW) são expressas em μm ; (FFW e FEW) são expressos em gramas (g), FL/FW e EL/EW são sem unidade e FY é expresso em porcentagem.

Os dados são apresentados como média (\bar{x}) e desvio padrão (s). Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

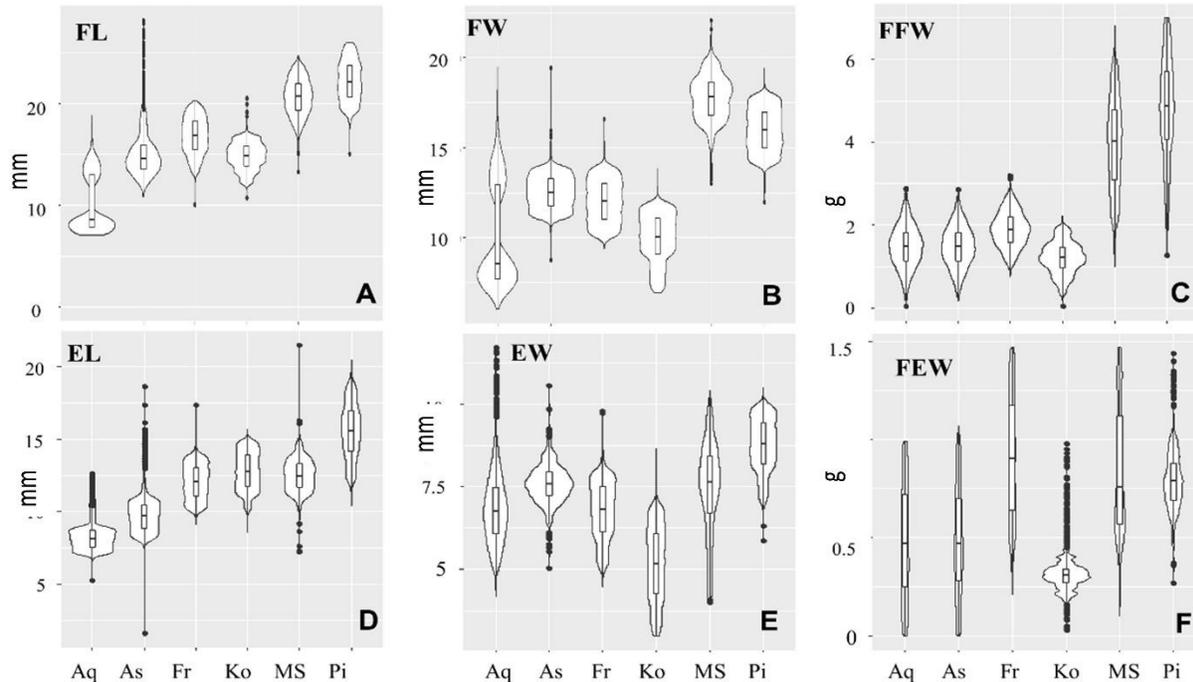


Figura 19. Gráficos de violino representando a variação da medida dos frutos. A. comprimento do fruto (FL), B. largura do fruto (FW), C. peso do fruto fresco (FFW), D. comprimento do endocarpo (EL), E. largura do endocarpo (EW) e F. peso do endocarpo (FEW) de cada cultivar estudada dentro do ambiente de cultivo. Cada violino mostra a distribuição dos dados do nível mínimo ao máximo, com linhas horizontais internas mostrando a média dos dados. Os *boxplots* representam os limites inferior e superior do primeiro e terceiro quartis. Os valores discrepantes (*outliers*) são indicados com pontos pretos. A largura horizontal do violino depende da densidade de dados.

Após a eliminação do exo e do mesocarpo, observou-se uma menor amplitude de variação dos dados no caráter EL (comprimento do endocarpo). O maior valor foi observado em ‘Picual’ ($15,57 \pm 1,84$). As cultivares Koroneiki, ‘Frantoio’ e ‘Arbosana’ apresentaram valores semelhantes entre as médias, porém, ‘Arbosana’ e ‘Manzanilla de Sevilla’ apresentaram dados dispersos ou erráticos (**Figura 19D**).

Considerando a característica EW (largura do endocarpo), pode-se notar uma alta dispersão dos dados em cada uma das cultivares analisadas (**Figura 19E**), não apresentando diferenças significativas. Um caso ainda mais notório ocorre ao analisar o comportamento dos dados FEW (peso do endocarpo) (**Figura 19F**), em que se observa uma grande variabilidade entre o peso de cada endocarpo sem distinção entre as árvores.

Ao considerar cada árvore como uma unidade de produção individual, percebe-se que, para os caracteres FL (comprimento do fruto) e EL (comprimento do endocarpo), todas as cultivares apresentam uma dispersão de valores centrados em intervalos próximos uns dos outros, com exceção da 'Arbequina', cujos indivíduos apresentaram maior diferença no comprimento e largura dos frutos (**Figura 19 A, B**). No entanto, as diferenças para 'Arbequina' tornaram-se menos notáveis entre cada uma das árvores quando o peso de cada fruto foi comparado. Para 'Koroneiki' e 'Picual' observou-se uma tendência oposta de variação no peso de seus frutos.

Levando em conta a variabilidade dentro de cada árvore, analisando cada cultivar individualmente, pode-se observar que na cultivar 'Arbequina', tanto FL quanto FW apresentam diferenças entre as diferentes posições de cada árvore na localidade (**Figura 20 A, B**).

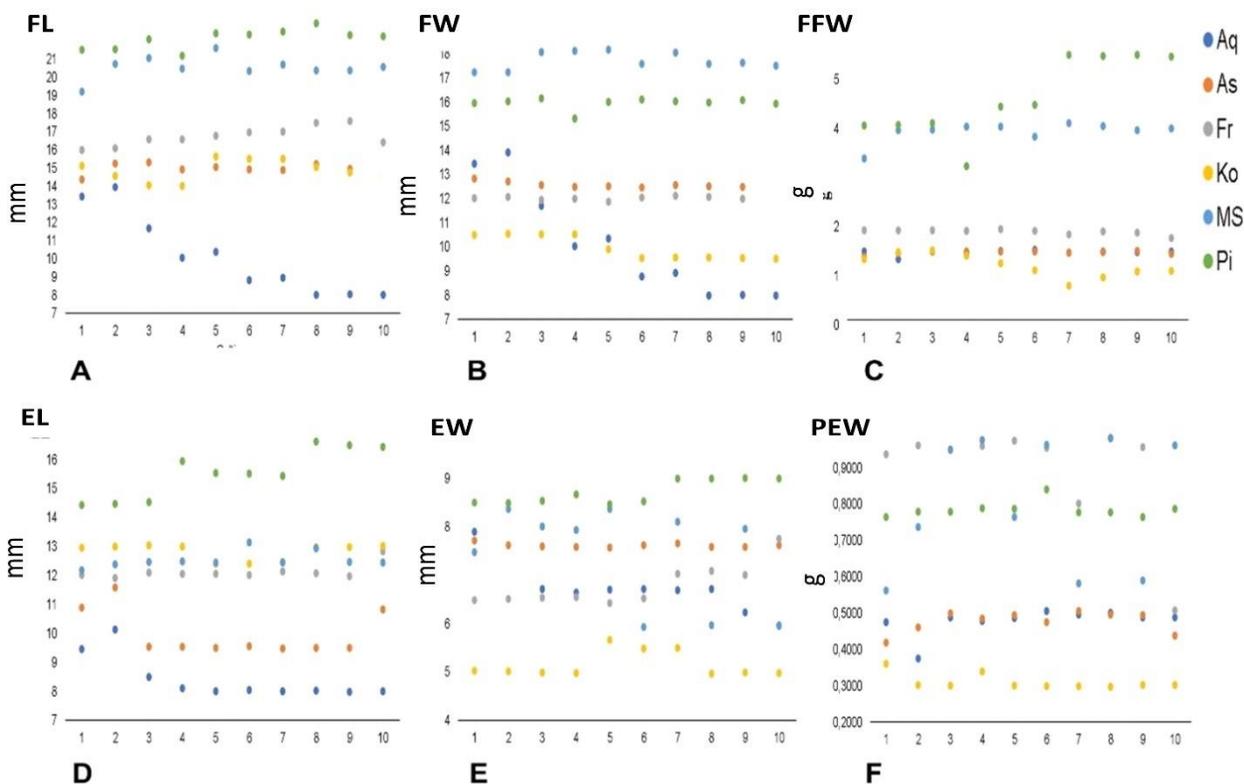


Figura 20. Gráficos de dispersão mostrando a variação das características de frutos considerando cada árvore dentro de cada cultivar. A. comprimento do fruto (FL), B. largura do fruto (FW), C. peso do fruto fresco (FFW), D. comprimento do endocarpo (EL), E. largura do endocarpo (EW) e F. peso do endocarpo fresco (PEW) em cada cultivar estudada no ambiente de cultivo. Cada círculo colorido

é o valor médio da característica de cada árvore para cada cultivar ('Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi)). O eixo x em todos os gráficos representa cada árvore (número de árvores analisadas), enquanto o eixo y corresponde aos valores das características.

4.4.2. Parâmetros medidos em óleos

No caso dos valores do grau de acidez (DA), quase todas as cultivares apresentaram valores entre 0,6 e 2,0 com exceção da cultivar 'Arbequina', que apresentou valores elevados (3,05) (**Figura 21A**).

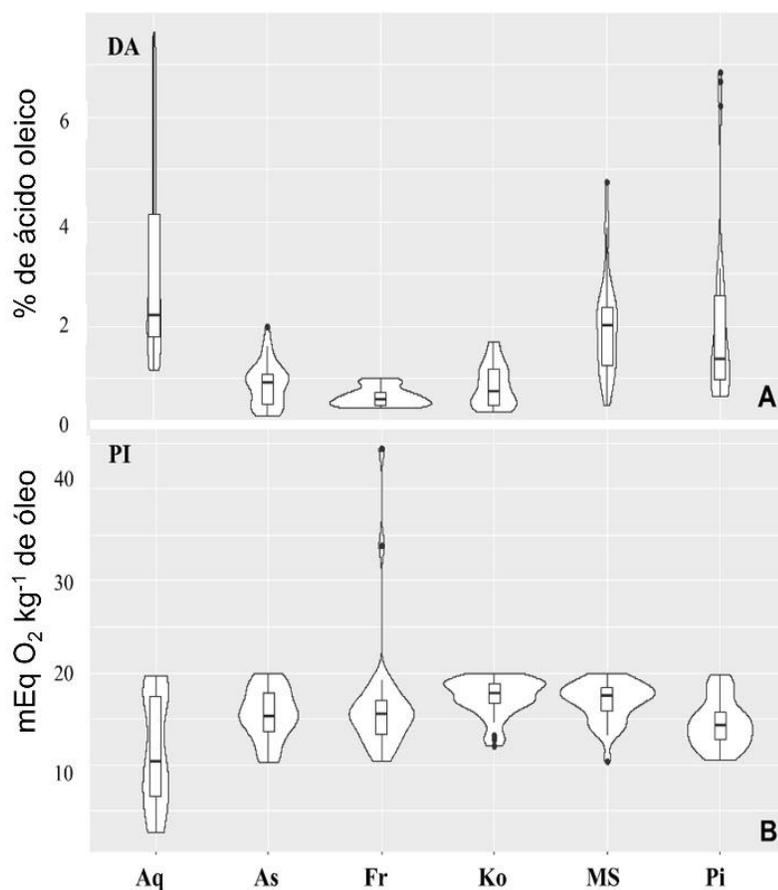


Figura 21. Gráficos de violino representando a variação das variáveis A. Grau de Acidez (DA) e B. Índice de Peróxido (IP) em cada cultivar estudada ('Arbequina'(Aq), 'Arbosana'(As), 'Frantoio'(Fr), 'Koroneiki'(Ko), 'Manzanilla de Sevilla'(MS) e 'Picual' (Pi)) dentro do ambiente de cultivo. Cada violino mostra a distribuição dos dados do nível mínimo ao máximo, com linhas horizontais internas mostrando a média dos dados. Os *boxplot* representam os limites inferior e superior do primeiro e terceiro quartis. Os *outliers* são indicados com pontos pretos. A largura horizontal do violino depende da densidade de dados.

Para a análise dos valores do índice de peróxido (IP), o maior valor médio foi identificado na ‘Koroneiki’ (17,34). No entanto, todos os valores médios mostraram condições aparentemente semelhantes mantendo-se na faixa de 12 a 20 mEq O₂ kg⁻¹ de óleo, embora a análise de variância tenha mostrado diferenças significativas entre as médias das diferentes cultivares. A maior variabilidade para esta característica foi observada em ‘Frantoio’, onde os dados foram mais dispersos quando comparados com as outras cinco cultivares analisadas (**Figura 21B**).

4.4.3. Herdabilidade

Os resultados de herdabilidade em sentido amplo (H²) para as variáveis FL, FW, FFW, EL, EW e FEW, para as diferentes cultivares, apresentaram valores elevados entre 0,98 e 0,99. Quando avaliados os valores de herdabilidade dentro de cada uma das cultivares individualmente, pode-se observar que no caso de ‘Arbequina’ e ‘Arbosana’ apresentaram valores médios a baixos (**Tabela 10**). No entanto, o contrário pode ser evidenciado para ‘Koroneiki’ e ‘Picual’.

Tabela 10. Herdabilidade em sentido amplo para cultivares de oliveira, considerando dez árvores para as características: FL: comprimento do fruto; FW: largura do fruto; FFW: peso de fruto fresco; EL: comprimento do endocarpo; EW: largura do endocarpo; FEW: peso do endocarpo fresco; DA: grau de acidez; PI: índice de peróxido.

	FL	FW	FFW	EL	EW	FEW	DA	PI
H ²	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,64	0,56
H ² _{Aq}	0,69	0,72	0,76	0,89	0,39	0,84	0,49	0,52
PP _{Aq}	27,96	28,28	33,45	11,55	15,29	58,28	37,30	27,32
H ² _{As}	0,80	0,76	0,76	0,69	0,34	0,60	0,53	0,61
PP _{As}	14,67	7,21	33,20	11,84	7,76	55,52	26,10	26,54
H ² _{Fr}	0,88	0,76	0,84	0,74	0,79	0,98	0,48	0,60
PP _{Fr}	10,59	9,62	21,94	9,69	12,40	33,47	38,15	21,56
H ² _{Ko}	0,96	0,95	0,99	0,88	0,89	0,98	0,85	0,79
PP _{Ko}	8,78	13,27	31,50	10,00	21,33	26,68	5,27	7,96
H ² _{MS}	0,77	0,75	0,86	0,92	0,79	0,88	0,74	0,67

PP_MS	8,77	7,13	27,85	8,70	18,38	38,04	7,88	16,35
H ² _Pi	0,97	0,90	0,99	0,99	0,98	0,89	0,83	0,85
PP_Pi	8,79	7,31	24,78	11,82	8,87	19,09	9,68	8,93

Abreviaturas: H² = herdabilidade no sentido amplo considerando todos os genótipos. H²_Aq 'Arbequina', H²_As 'Arbosana', H²_Fr 'Frantoio', H²_Ko 'Koroneiki', H²_MS 'Manzanilla de Sevilla', e H²_Pi 'Picual'; PP = plasticidade fenotípica.

4.5. Discussão

O primeiro estudo abrangente testando cultivares de oliveiras em diferentes locais com várias condições climáticas foi relatado recentemente (MOUSAVI et al., 2019). Este trabalho propõe um estudo semelhante, porém incluindo ainda mais caracteres biométricos nas condições do Sul do Brasil.

Ao levar em conta os valores de FFW, tanto 'Picual' quanto 'Manzanilla de Sevilla' apresentaram valores semelhantes aos citados por Íñiguez et al. (1999) e Vila (2004). Ao considerar cada árvore como uma unidade de produção individual, quase todas as cultivares apresentaram uma dispersão de valores similares e próximos uns dos outros, com exceção da 'Arbequina', mostrando maiores valores quando essas árvores foram plantadas na parte elevado do terreno, expostas ao vento, quando comparadas às plantadas na parte mais baixa do terreno.

Para 'Koroneiki' e 'Picual' observou-se variação no peso de seus frutos, sendo os frutos mais pesados produzidos em árvores 'Koroneiki' posicionadas nas áreas altas com maior exposição ao vento, enquanto para 'Picual' os mais pesados foram aqueles das árvores plantadas em áreas mais baixas.

Levando em conta a variabilidade dentro de cada árvore, a cultivar 'Arbequina' apresentou diferenças entre as diferentes posições de cada árvore na localidade quando comparadas às demais cultivares. Embora as demais cultivares apresentaram diferenças entre as árvores, sua variância é baixa.

Os frutos com maior teor de polpa, fator relacionado ao rendimento de óleo (FY), foram os da 'Picual' (82,48%), seguidos da 'Manzanilla de Sevilla' (76,72%) e da 'Koroneiki' (70,86 %). No entanto, esses valores são muito baixos quando comparados aos padrões estabelecidos por Rallo e Cuevas (2017), que mencionam que podem ser

superiores a 95%. Pode-se inferir com estes resultados que a colheita dos frutos está sendo realizada na fase fenológica III, sendo caracterizada pelo rápido crescimento dos frutos devido ao alargamento das células do mesocarpo, que determina seu tamanho final. Durante esta fase, começa a ocorrer a biossíntese do óleo e seu acúmulo nas células parenquimatosas da polpa (lipogênese). A disponibilidade de água nesta fase determina o tamanho final do fruto e seu teor de óleo, porém, embora inchados com água, ainda não desenvolveram o óleo necessários para a colheita com rendimentos ótimos (RALLO e CUEVAS, 2017).

A acidez é um dos parâmetros que definem a qualidade do azeite, sendo expressa em gramas de ácido oleico por 100 gramas de azeite, medindo a quantidade de ácidos graxos livres presentes na amostra de azeite (TOUS et al., 1997). Portanto, é um índice ligado às alterações dos frutos e à hidrólise de glicerídeos em processo de elaboração e conservação, alertando para as alterações hidrolíticas sofridas pelos óleos. Seu aumento se deve principalmente à hidrólise dos triglicerídeos, que pode ser devido ao tempo de maturação dos frutos no momento da colheita ou ao armazenamento inadequado antes da moagem (TOUS et al., 1997).

No caso dos valores do grau de acidez (DA), quase todas as cultivares apresentaram valores dentro da faixa dos azeites virgens que corresponde entre 0,8% até um máximo de 2% (COI, 2023), com exceção da cultivar 'Arbequina', que apresentou valores elevados de acidez, o que indicou baixa qualidade do azeite no momento da análise. A maior variabilidade para esta característica foi detectada em 'Arbequina', 'Picual' e, em menor grau, 'Manzanilla de Sevilla', onde os dados são mais disseminados quando comparados a 'Arbosana', 'Frantoio' e 'Koroneiki', que apresentaram médias e variâncias menores.

Peróxidos ou compostos de oxidação inicial se originam se o óleo não for protegido da luz e do calor, ou não for armazenado em recipientes adequados. Os óleos virgens não devem exceder um valor de peróxido de 20 miliequivalentes de oxigênio por quilograma de óleo. Portanto, quanto maior o valor de peróxido, menor a capacidade antioxidante do óleo (TOUS et al., 1997).

A herdabilidade tem sido amplamente estudada no melhoramento de plantas, sendo estimada em sentido amplo como a proporção da variabilidade observada

causada pelos efeitos gênicos totais e sua interação com o ambiente (MOUSAVIC et al., 2019; FERNANDES et al., 2021).

Os resultados de herdabilidade em sentido amplo para as características analisadas, para as diferentes cultivares, apresentaram valores que indicam que cada cultivar apresenta estabilidade genotípica e aparentemente são pouco influenciadas pelo ambiente. Um caso especial é a H^2 para FL (comprimento do fruto), que foi muito superior ao mencionado por Mousavi et al. (2019). Porém, no caso dos resultados dos caracteres avaliados em óleos como grau de acidez e peróxidos se aproximam dos apresentados no mesmo trabalho.

Os valores de herdabilidade dentro da cultivar em 'Arbequina' e 'Arbosana', são médios a baixos, indicando que o ambiente tem alta influência sobre os frutos. O contrário ocorreu em 'Koroneiki' e 'Picual', cujos valores mostram que grande parte da variação fenotípica encontrada se deve ao genótipo, sem apresentar fortes variações devido ao ambiente.

Este estudo representou um primeiro esforço para avaliar a plasticidade do fenótipo de uma amostra de cultivares comerciais de oliveiras, levando em consideração caracteres de grande importância econômica, relacionados à composição do fruto e do azeite. A variação das diferentes características pode ser devido a diferenças hereditárias entre cultivares, no entanto, a variabilidade dentro de cada cultivar pode ser resultado da plasticidade fenotípica diante de diferentes condições ambientais (MOUSAVI et al., 2019). Compreender como o ambiente e o genótipo compartilham a responsabilidade pela variabilidade dos caracteres é crucial prever a resposta da planta a várias condições de estresse, temperaturas ou regimes hídricos (MORAN et al. 2016). Quando a herdabilidade foi analisada em sentido amplo comparando as seis cultivares analisadas neste estudo, os valores ficam em torno de 99%, demonstrando a estabilidade de cada uma das identidades genotípicas estudadas. No entanto, quando cada uma das cultivares foi analisada individualmente, elas apresentaram diferentes níveis de plasticidade para cada característica, ou seja, uma influência ambiental diferente foi observada para cada combinação de cultivar e característica.

Apesar dos dados limitados a uma única colheita para este estudo, foi utilizada a contextualização de Falconer e Mackay (1996), que mencionam que, quando mais de

uma medida de caráter for feita em cada indivíduo, como foi o caso de cada árvore em que cada fruto compreende uma repetição da variável, a variação fenotípica pode ser dividida em variação dentro de indivíduos e variação entre indivíduos, podendo-se observar o que ocorre dentro de cada cultivar. Esse particionamento leva a uma taxa de componente de variação chamada repetibilidade, que mostra quanto é ganho com a repetição de medições, prevendo o desempenho futuro de registros anteriores. A partição da variância correspondente à repetibilidade não faz parte da variância genética, pois é a variância ambiental, com isso, poderia ser tomada como a variância ambiental que deriva da variabilidade entre os frutos dentro de cada árvore.

Apesar da 'Arbequina' ser classificada como uma das cultivares de azeitona mais cultivadas no mundo e altamente preferida no Brasil, os valores obtidos neste estudo mostraram uma alta variação em termos de tamanhos de frutos, pesos e parâmetros medidos no azeite, obtendo-se baixos valores de herdabilidade, devido à influência do ambiente. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Mousavi et al. (2019), que menciona sua plasticidade genotípica. As características medidas para as cultivares 'Picual' e 'Koroneiki' apresentaram valores altos e estáveis, que concordam com os indicados para as mesmas cultivares na Espanha e Grécia, em todos os ambientes. Igualmente, Mousavi et al., (2019) e Nicotra et al., (2015), mencionam que, as cultivares 'Manzanilla de Sevilla' e 'Frantoio', possuem maior capacidade de adaptação, sendo neste caso mínima a interação desfavorável $G \times E$, mas, às vezes, essa interação pode ser muito favorável.

Altos valores de herdabilidade no sentido amplo foram encontrados para as variáveis medidas no óleo para as cultivares 'Picual', 'Koroneiki' e 'Manzanilla', sendo semelhantes ou até superiores aos citados por Navas-Lopez et al. (2019) e Mousavi et al. (2019). Chama a atenção para o local de cultivo que, valores elevados de temperaturas máximas e mínimas podem afetar negativamente a porcentagem de ácido oleico, principalmente se ocorrerem durante os meses mais quentes, quando os frutos estão se desenvolvendo e o óleo se acumula no mesocarpo coincidindo com o mencionado por Servili et al., 2015 e Mousavi et al., 2019. Há relatos de que, em ambientes argentinos, o teor de ácido oleico estava no nível mínimo em todos os ambientes. Portanto, os azeites de áreas quentes apresentaram consistentemente

menor teor de ácido oleico e maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados, independentemente das cultivares (MOUSAVI et al., 2019), resultando entre 50 e 85% de ácidos graxos para este estudo.

Trabalhos como o de Mousavi et al. (2019), sugerem que, do ponto de vista do melhoramento, os critérios de seleção devem considerar cultivares com alta estabilidade e plasticidade adaptativa, principalmente em relação à adaptação às mudanças climáticas. Extrapolando esses critérios neste estudo, apesar da aparente adaptabilidade da 'Arbequina' no Sul do Brasil, a produtividade dessa cultivar parece depender em grande parte do ambiente quando comparada a 'Koroneiki' ou 'Picual'.

Muitos estudos têm usado índices de plasticidade fenotípica para resumir a expressão de características ambientalmente contingentes para uma determinada espécie, conjunto de espécies ou populações dentro de uma determinada espécie (VALLADARES et al., 2006). Nesta pesquisa, explorou-se o potencial de comparação de genótipos de uma abordagem quantitativa da plasticidade fenotípica baseada no índice de plasticidade fenotípica (PP). Os resultados permitiram observar grandes diferenças entre cada um dos valores das variáveis analisadas dentro de cada cultivar separadamente. A plasticidade fenotípica tem sido extensivamente estudada em plantas, o que pode ter efeitos muito drásticos em seu crescimento e desenvolvimento induzidos pelo ambiente. Recentemente, alguns estudos têm focado nos aspectos de plasticidade que estão mais diretamente relacionados ao sucesso reprodutivo e funcional das plantas, sendo capazes de responder às mudanças nas condições ambientais através da plasticidade de muitos aspectos de seus fenótipos.

4.6. Conclusões

A estimativa de herdabilidade mostrou que algumas cultivares como 'Koroneiki' ou 'Picual' tiveram suas características principalmente sob controle genético, enquanto 'Arbequina' foi particularmente regulada pelo ambiente, sob as condições locais de estudo da variedade na Região Sul do Brasil.

5. CAPÍTULO III - Avaliação da germinação *in-vitro* de pólen de oliveiras sob condições de armazenado em baixas temperaturas

5.1. Resumo

Foi estudado o efeito do armazenamento (diferentes tempos e temperaturas), assim como o uso de glicerina como meio de proteção contra danos ocasionados pelo frio, sobre a germinação *in vitro* do pólen nas cultivares de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki'. O pólen foi armazenado a 26°C, 5°C, -20°C e -80°C por um período de tempo de 136 dias, sendo esse número de dias o momento que o pólen deixou de apresentar sinais de germinação após o armazenamento. A germinação *in vitro* do pólen foi determinada pelo desenvolvimento do tubo polínico em meio agar-sacarose, meio nutritivo mais adequado para cultura da oliveira. Foi determinado o efeito do tempo de armazenamento, temperaturas, cultivar e interação desses fatores na germinação do pólen. A temperatura de -20°C e -80°C foram adequadas para um período de 80 dias de armazenamento de pólen das cultivares 'Arbequina' e 'Koroneiki', atingindo o limite mínimo de 30% de germinação, o que pode ser considerado para utilização no melhoramento genético. Os resultados mostram que o armazenamento de pólen de oliveira em temperaturas abaixo de zero reduz a necessidade de coleta do material fresco necessário no momento de cruzamento na época de polinização.

5.2. Introdução

O conhecimento sobre a biologia do pólen é essencial para o planejamento de cruzamentos controlados em programas de conservação e melhoramento genético de espécies vegetais, principalmente aquelas de interesse agrônomo (JALCA et al., 2019; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022). A conservação do pólen tornou-se um componente importante para a pesquisa básica, bem como para a troca e preservação de germoplasma (HANNA, 1994; EINHARDT, 2006; FERES, 2009; CAMAYO et al., 2021). Por exemplo, armazenando pólen é possível reduzir os riscos fitossanitários, uma vez que pragas ou doenças raramente são transferidas através do mesmo (com exceção de

alguns vírus), o que permite segurança na transferência e troca de germoplasma (HAY, 2021). Em programas de melhoramento genético, pólen conservado é considerado uma das principais alternativas para a conservação de alelos, facilitando o cruzamento controlado entre genótipos de interesse agrônômico (DAFNI e FIRMAGE, 2000, GANESHAN et al., 2008).

Desde o século passado, vários métodos foram testados para armazenar pólen em diferentes espécies (RAJASEKHARAN et al., 1994, GARCÍA et al., 2015), demonstrando que a temperatura e a umidade são fatores importantes para sua conservação. Por esta razão, foi possível prolongar a viabilidade do pólen diminuindo seu teor de umidade, além de colocá-los em condições de criopreservação (GARCÍA et al., 2015; CAMAYO et al., 2021). Em muitos experimentos, a necessidade de reduzir o teor de água antes da exposição a baixas temperaturas parece ser um aspecto que requer atenção especial, embora em casos especiais o teor de água não possa ser reduzido a um nível crítico sem causar danos graves à ativação (SHIVANA e JOHRI, 1985). Nos ensaios de polinização artificial é necessário o conhecimento da viabilidade dos grãos de pólen, que varia de acordo com a espécie, seu grau de maturidade e fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa do ar (ZAMBON et al., 2018; CÁLIC et al., 2021), e pode ser alterada durante o armazenamento.

O pólen conservado deve manter sua viabilidade altamente integral e daí a necessidade de monitorar essa capacidade antes, durante e após a conservação. Dessa forma, é possível estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen de cada espécie podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar e fertilizar, tornando-se uma importante ferramenta para o melhoramento das culturas (BRITO et al., 2010; ZAMBON et al., 2018; CÁLIC et al., 2021).

O Brasil se projeta como um grande importador mundial de azeitonas e azeites, mas quer mudar essa visão para se tornar autossuficiente e um exportador competitivo de classe mundial pela qualidade de seus produtos. Portanto, várias pesquisas estão sendo realizadas que contemplam a biologia floral (CHACÓN-ORTIZ et al., 2022b) e o armazenamento de pólen de oliveira em condições de baixas temperaturas. De todas as cultivares com potencial produtivo, no Brasil a 'Arbequina' parece ser a cultivar com maior preferência a ser utilizada (ZAMBON et al., 2018), no entanto, segundo os resultados

obtidos não deveria ser a mais recomendada por sua alta variabilidade em qualidade de azeites.

A alta variação na expressão floral na oliveira, seja entre diferentes anos (LAVEE et al., 1996), entre diferentes cultivares (SEIFI et al., 2008; COI, 2007; LAVEE et al., 1996; CHACÓN-ORTIZ et al., 2022), além dos problemas de autoincompatibilidade (SEIFI et al., 2008), marcam sua dependência da polinização cruzada. Nessas condições, existem várias propostas de polinização artificial como alternativa temporária ou permanente, que pode ser adaptada para grandes plantações ou superintensivas (TOUS et al., 2003). Para isso, ainda devem ser desenvolvidos métodos eficientes e econômicos para a coleta de grandes quantidades de pólen, manutenção, armazenamento em baixas temperaturas e garantia de viabilidade ao longo do tempo (ZAMBON et al., 2018). Adicionalmente, deve-se trabalhar com o estabelecimento de perfis e a identificação de plantas doadoras de pólen com auxílio de técnicas moleculares (DE LA ROSA et al., 2002; BRETON et al., 2021). Por isso, o objetivo do trabalho foi o testar metodologias utilizando baixas temperaturas a fim de preservar a viabilidade polínica durante o armazenamento em duas cultivares de oliveiras da região do Sul do Brasil.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Material vegetal e condições de coleta

O estudo foi realizado durante os meses de setembro do 2021 a fevereiro do 2022. As amostras de pólen foram coletadas em setembro, de árvores ao acaso que tinham flores em antese das cultivares 'Arbequina' e 'Koroneiki', tanto da Fazenda Mato Grande da empresa "Verde Louro" (UTM 31.474477S; 52.9473309W), Município de Canguçu; quanto da Estação Arroio Moreira da empresa "Olival Dom Feliciano" (UTM 31.636978S; 52.548517W), Cascata Incra, Município Pelotas. Os dois locais de coleta são no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de pólen de 500 flores de 10 plantas de cada cultivar em cada lugar.

Para a realização desse experimento, os botões florais das cultivares foram selecionados ao acaso em estágio de “botão” em pré-antese; dividindo-as equitativamente em dois grandes grupos. Um grupo para estudos de conservação de pólen sem glicerina; e o outro grupo usando agente protetor glicerina.

As flores foram transportadas em tubo falcon com Silica gel a 5°C de temperatura até chegar ao laboratório do CGF (Centro de Genômica e Fitomelhoramento), localizado na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão. As flores foram mantidas em tubos falcon de 50mL enquanto foi realizado o experimento, sendo colocado cada grupo em sua respectiva temperatura de armazenagem antes de serem distribuídas segundo o desenho do experimento.

5.3.1.1. Experimento I: Conservação dos grãos de pólen sob diferentes temperaturas e tempo

Amostras de botões florais de cada uma das cultivares foram subdivididas em quatro, para serem conservadas sob quatro temperaturas (26°C, 5°C; -20°C e -80°C). Todos os botões florais, antes de ser colocados nas suas correspondentes temperaturas, foram colocados em tubos de 50 mL, com sílica gel e mantidos a uma temperatura de 28°C, por 24 horas, para que ocorresse a antese e para que os grãos de pólen tivessem seu teor de umidade reduzido (CUCHIARA et al. 2012; ZAMBON et al. 2018).

De cada botão foram tiradas as anteras sob um microscópio estereoscópico Marca Meiji Techno EMZ-13, sendo colocadas 10 anteras por microtubo do tipo eppendorf, para cada cultivar. Foi realizado um teste de germinação do tubo polínico para se determinar a viabilidade inicial dos grãos de pólen. Passadas as 24 horas, os microtubos foram distribuídos entre os tratamentos 26°C, 5°C; -20°C e -80°C (20 microtubos por tratamento).

Passadas 24, 48 e 72 horas após o armazenamento foram realizadas novas avaliações de viabilidade do pólen. A partir das 72 horas, as avaliações foram realizadas a cada 7 dias até não observar o desenvolvimento do tubo polínico nas amostras. Cada avaliação foi feita com 4 repetições.

Em cada evento de avaliação os grãos de pólen foram transferidos para o meio de cultura com o auxílio de uma espátula de metal. Posteriormente, foram mantidas em BOD na ausência de luz a 27°C por 48 horas, sendo contados os grãos de pólen germinados (com tubos polínicos desenvolvidos com tamanho de duas vezes o diâmetro máximo do grão de pólen) e não germinados (pólen sem evidencia de crescimento do tubo) com auxílio de um microscópio de luz modelo Leica DM750 a 10x de aumento (ZAMBON et al., 2018).

O meio de cultura utilizado para testar a germinação do tubo polínico antes e após as diferentes formas de armazenamento consistiu de ágar batata-dextrose 0,5%, sacarose 15%, ácido bórico 400 mg L⁻¹ e pH ajustado para 6,0 (SILVA et al., 2016; ZAMBON et al., 2018).

5.3.1.2. Experimento 2: Conservação dos grãos de pólen sob diferentes concentrações de glicerina, temperaturas e tempo

O pólen de botões florais da cultivar 'Arbequina' foi mantido em 20%, 30% e 40% de glicerina, que por sua vez foram subdivididos em 4 subgrupos mais pequenos para ser conservadas sob temperaturas (26°C, 5°C; -20°C e -80°C).

No início do processo foi realizado um teste para se determinar a viabilidade inicial dos grãos de pólen. O tempo dos testes e a quantidade de repetições manteve os mesmos critérios que as avaliações do primeiro experimento.

Em cada avaliação os grãos de pólen foram lavados com água estéril e centrifugados a 13000g antes de ser transferidos com uma espátula de metal ao meio de cultura e mantidos em BOD na ausência de luz a 27°C por 48 horas. Os grãos de pólen germinados/não germinados foram contados. O meio de cultura foi o mesmo descrito anteriormente (ZAMBON et al. 2018).

As análises sob microscópio ótico Marca Meiji Techno EMZ-13 com objetiva 40X, foram realizadas tanto no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) e no Laboratório de Fitossanidade na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

5.3.2. Análise estatística

Para o primeiro experimento, foram avaliados dois modelos estatísticos. O primeiro tri-fatorial com as duas cultivares juntas baseado nos fatores (cultivares ('Arbequina' e 'Koroneiki'), tempo (dias) e temperatura (°C)), e o segundo modelo bifatorial calculado independente para cada cultivar com fatores (tempo (dias) e temperatura (°C)). Para o segundo experimento, foi feita análise somente para a cultivar 'Arbequina', sendo tri-fatorial baseado nos fatores (concentração glicerina (%), tempo (dias) e temperatura (°C)).

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas com os testes de Shapiro-Wilk e Levene. Os dados apresentaram distribuição normal, e nenhuma transformação foi aplicada. Foi feita ANOVA e análise de regressão ($p \leq 0,05$) com o auxílio do pacote estatístico RStudio 4.2.2 (R CORE TEAM, 2018).

5.4. Resultados

A aplicabilidade dos testes de viabilidade para o pólen das cultivares de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki' foi avaliada com base na germinação e desenvolvimento dos tubos polínicos formados após 24 h de cultivo, podendo ser facilmente reconhecidos ao microscópio (**Figura 22**).

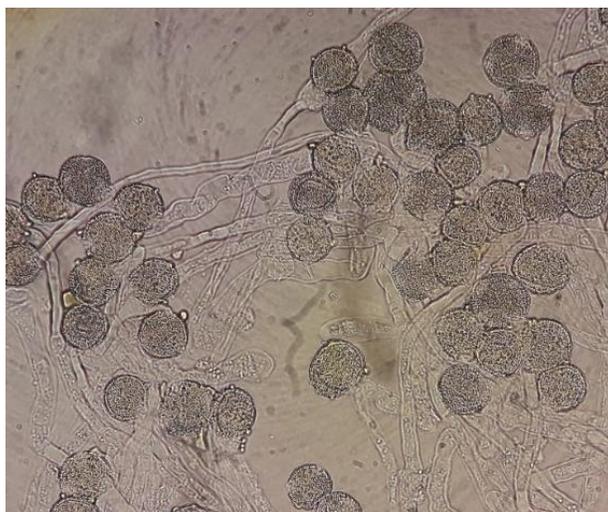


Figura 22. Vista do crescimento do tubo polínico sob microscópio óptico. Objetiva 100X.

Para otimizar a temperatura adequada para preservação do pólen viável, a análise de variância revelou que o tipo de cultivar, a temperatura, o período de armazenamento e a interação entre esses fatores influenciam a viabilidade do pólen de oliveira após o armazenamento (**Tabela 11**).

Tabela 11. Análises de variância comparando os diferentes níveis dos fatores estudados e suas possíveis interações: cultivar ('Arbequina', 'Koroneiki'), tempo (dias) e a temperatura (+26°C, +5°C, -20°C, -80°C).

Fonte de Variação	SQ	GL	F	Pr(>F)	
Interceptação	670.807	1	26.871,0751	< 2,2e-16	***
Cultivar	2.475	1	99,1516	< 2,2e-16	***
Tempo (dias)	405.601	14	1160,5373	< 2,2e-16	***
Temperatura (°C)	112.840	3	1506,7157	< 2,2e-16	***
Cultivar:tempo	615	14	1,7598	0,0430430	*
Cultivar:temperatura	469	3	6,2674	0,0003719	***
Tempo:temperatura	74.321	42	70,8842	< 2,2e-16	***
Cultivar:tempo:temperatura	1.728	42	1,6482	0,0088928	**
Residual	8.987	360			

*SQ: Soma de quadrado, GL: graus de liberdade, F: valor calculado F de Fischer, Pr(>F): contraste com a probabilidade teórica.

Foi feita uma regressão, que gerou a equação linear preditora apresentada abaixo. De acordo com o modelo da cinética da viabilidade do pólen tomando em consideração as duas cultivares nas diferentes temperaturas e o tempo de armazenado:

$$Y = 51,7195 - 0,5118(X) - 0,4186(Z) + 0,0030(XY)$$

Onde: Y=Viabilidade do pólen; X=tempo(dias); Z=temperatura(°C).

O modelo linear apresentou um erro padrão residual de 19,15, coeficiente de determinação $R^2 = 0,7148$, R^2 ajustado= 0,7105 e p-value: $< 2,2 \times 10^{-16}$. Observou-se que o pólen armazenado em 26°C (temperatura ambiente), em apenas 3 dias, diminuiu drasticamente sua viabilidade, evidenciado pela ausência de tubo polínico (**Figura 23a**). Na temperatura ambiente ocorreu uma perda de viabilidade de ao menos 80-90% da viabilidade.

No armazenamento à temperatura de 5°C (geladeira), os grãos de pólen com 17 dias, ainda apresentaram viabilidade em torno de (56%), e após esse período houve diminuição drástica da germinação polínica, sendo que aos 38 dias 75% do material apresentava-se inviável (**Figura 23a**).

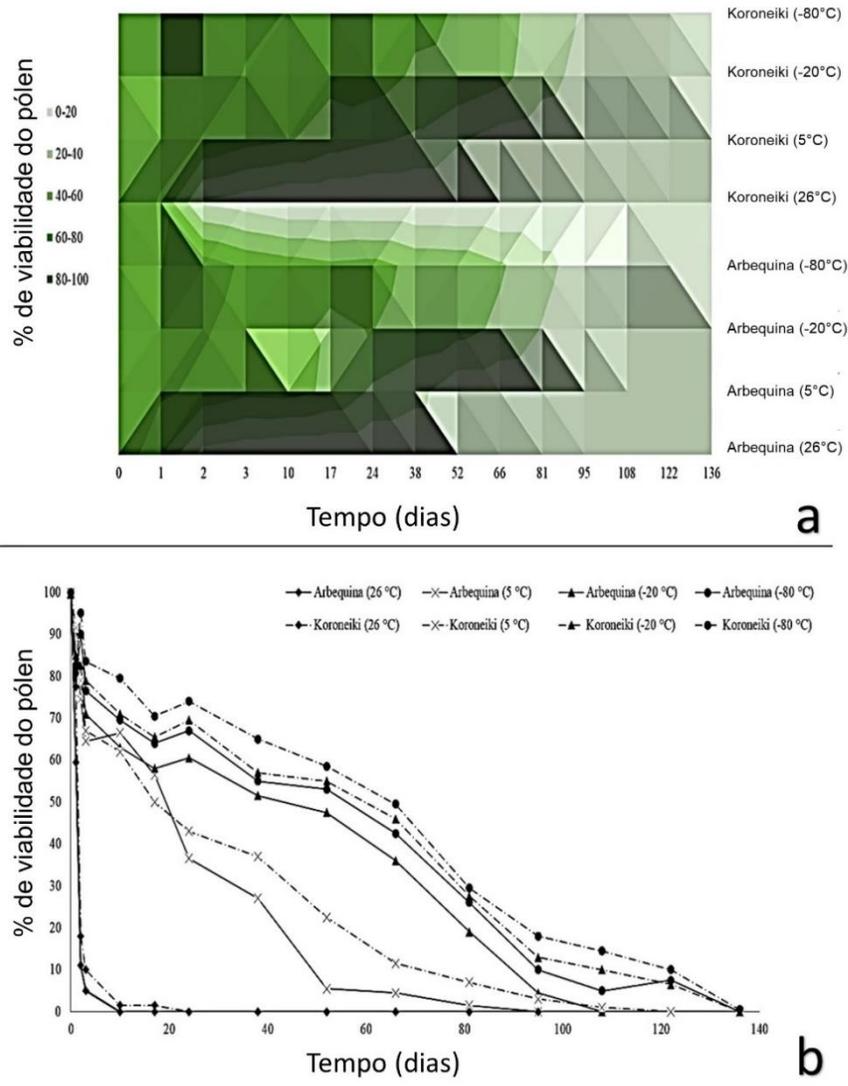


Figura 23. Viabilidade para grãos de pólen das duas cultivares em conjunto, armazenadas sob quatro temperaturas (26°C, 5°C, -20°C, -80°C) e diferentes períodos de tempo. **a.** Vista do gráfico de área que mostra a intersecção entre as duas cultivares ('Arbequina' e 'Koroneiki'), os diferentes tempos avaliados e as quatro temperaturas testadas. Cores verdes escuras representam altos níveis de viabilidade de desenvolvimento do tubo polínico, enquanto cores sinza mostram baixa viabilidade. **b.** Gráfico de linhas, podendo-se observar o comportamento da viabilidade ao longo do tempo e comparando cada uma das temperaturas testadas em cada cultivar separadamente.

O armazenamento a -20°C (freezer) apresentou resultado superior aos outros tratamentos, mantendo a viabilidade do pólen durante mais tempo. Aos 52 dias de armazenamento os grãos de pólen ainda apresentavam uma porcentagem de germinação em torno de 46%. No caso do armazenamento a -80°C (ultrafreezer) foram observados resultados similares aos apresentados pela temperatura -20°C. Aos 52 dias de armazenamento os grãos de pólen ainda tinham uma porcentagem de germinação em torno de 54%. Temperaturas abaixo do -20°C (freezer) representaram mais dias de armazenamento, mantendo o pólen viável acima de 30% próximo de 80 dias de conservação (**Figura 23a**).

Apesar de apresentar interações entre as duas cultivares avaliadas, foram feitas análises para avaliar cada cultivar independentemente. Para o caso de 'Arbequina' observou-se diferenças significativas em cada fator avaliado além da interação entre os fatores dentro da cultivar. A regressão feita para a cultivar 'Arbequina' gerou uma equação preditora de terceiro grau. De acordo com o modelo, a queda da viabilidade do pólen depende das diferentes temperaturas e do tempo de armazenamento:

$$Y = 79,81 - 1,609(X) - 8,429 \times 10^{-1}(Y) + 5,363 \times 10^{-3}(XY) + 1,233 \times 10^{-2}(X)^2 - 2,214 \times 10^{-2}(Y)^2 + 1,82 \times 10^{-6}(XY)^2 - 3,732 \times 10^{-5}(X)^3 - 1,715 \times 10^{-4}(Y)^3 + 1,365 \times 10^{-10}(XY)^3$$

Onde: Y=viabilidade do pólen; X=tempo(dias); Z=temperatura(°C).

O modelo apresentou um erro padrão residual de 14,32, coeficiente de determinação $R^2 = 0,8407$, R^2 ajustado = 0,8345 e p-value: $< 2,2 \times 10^{-16}$.

Da mesma forma, a 'Koroneiki' apresentou diferenças significativas em cada fator avaliado. A regressão gerou uma equação preditora de terceiro grau sob as mesmas condições experimentais que para 'Arbequina':

$$Y = 82,92 - 1,55(X) - 9,233 \times 10^{-1}(Y) + 4,378 \times 10^{-3}(XY) + 1,22 \times 10^{-2}(X)^2 - 2,045 \times 10^{-2}(Y)^2 + 1,753 \times 10^{-6}(XY)^2 - 4,059 \times 10^{-5}(X)^3 - 1,395 \times 10^{-4}(Y)^3 + 1,388 \times 10^{-10}(XY)^3$$

Este modelo apresentou um erro padrão residual de 14,54, coeficiente de determinação $R^2 = 0,8425$, R^2 ajustado = 0,8363 e p-value: $< 2,2 \times 10^{-16}$.

O comportamento das duas cultivares foi relativamente similar (**Figura 23b**). Observou-se que a viabilidade do pólen armazenado em temperatura de 26°C diminuiu drasticamente nos primeiros dois a três dias. O tempo máximo de viabilidade alcançado pelo pólen das duas cultivares armazenadas a -80°C foi entre 122 e 136 dias, no entanto, 50% de perda de viabilidade já tinha sido alcançado entre 52 e 66 dias.

Nas temperaturas de 5°C e -20°C, o pólen das oliveiras, tanto em 'Arbequina' quanto 'Koroneiki', mostraram sinais de preservação em relação à temperatura ambiente. No entanto, no caso de 5°C, 50% de viabilidade foi alcançado apenas aos 20 dias, caindo posteriormente. Sob armazenamento a -20°C o comportamento dos grãos de pólen foi semelhante a -80°C.

Quando se considera o armazenamento dos grãos de pólen aplicando três concentrações de glicerol (20%, 30% e 40%) na cultivar 'Arbequina' verifica-se efeito significativo da temperatura -20°C e -80°C, tempo e tratamento com glicerina (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variância comparando os diferentes níveis dos fatores estudados e suas possíveis interações: % Glicerina (Controle 0%, 20%, 30% e 40%), temperatura (+26°C, +5°C, -20°C, -80°C) e diferentes períodos de armazenamento.

Fonte de Variação	SQ	GL	F	Pr(>F)	
Interceptação	348.044	1	32.3002	<2,2e-16	***
% Glicerina	2.774,2031	3	5,232	0,0011	**
Tempo (dias)	824.826,5770	14	342,865	0,0001	**
Temperatura (°C)	213.375,2114	3	413,915	1,126e-16	***
Glicerina:temperature	137	9	0.014	1,0000	
Tempo:temperature	79.1510	42	73,1843	< 2,2e-16	***
Glicerina:tempo:temperatura	1.728	126	1,6482	0,068	
Residual	2413366	224			

*SQ: Soma de quadrado, GL: graus de liberdade, F: valor calculado F de Fischer, Pr(>F): contraste com a probabilidade teórica.

Pode-se observar que não existem diferenças entre as porcentagens de glicerina testadas. Além disso, esse tratamento parece não influenciar a cinética da viabilidade dos grãos de pólen armazenados em baixas temperaturas ao longo tempo (**Figura 24**).

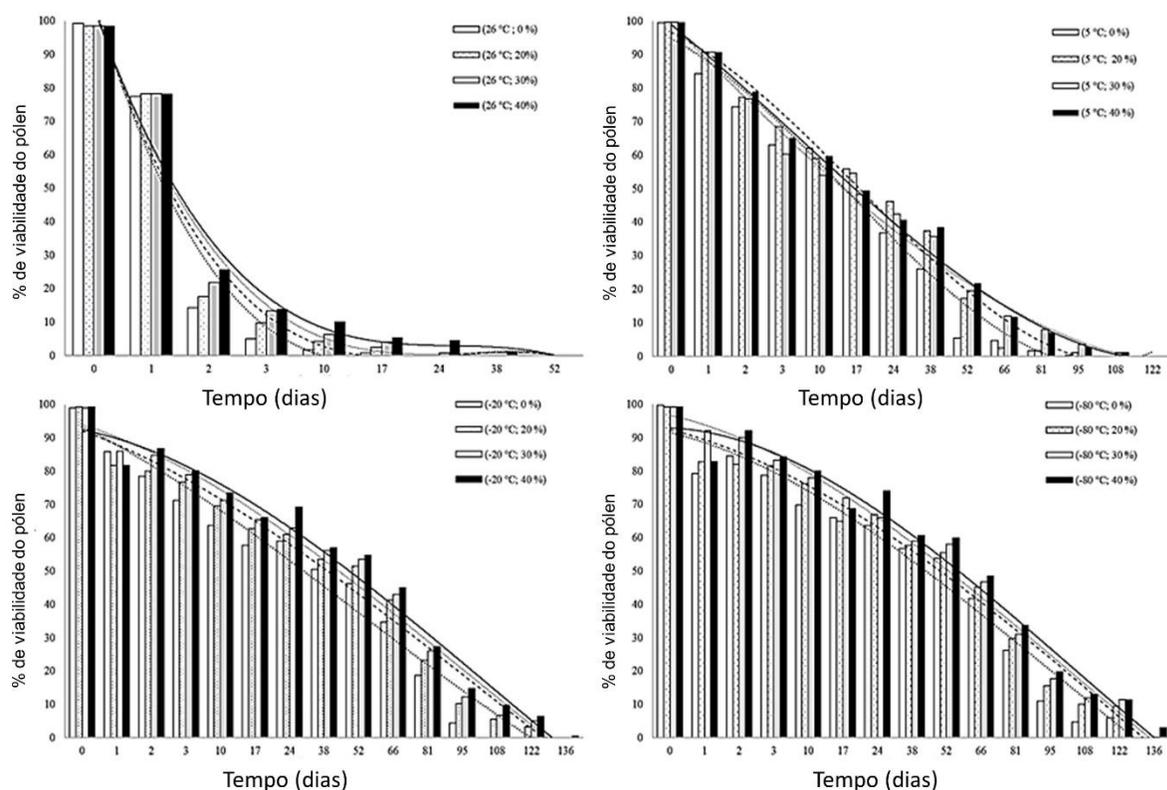


Figura 24. Gráficos comparando a germinação do pólen após o armazenamento na mesma temperatura sob diferentes teores de glicerina (0%, 20%, 30%, 40%) e por diferentes períodos.

5.5. Discussão

A preservação de pólen em baixas temperaturas é considerada um importante método de armazenamento a longo prazo, pois interrompe a atividade metabólica e a deterioração, minimizando alterações genéticas (HARDING, 2004; HAY & SERSHEN, 2021).

Existem vários trabalhos que mencionam a diminuição da viabilidade do pólen das oliveiras após a preservação em baixas temperaturas (XU et al., 2014; ZAMBON et al., 2018; ŞENBAS et al., 2022), que contrastam com as afirmações de Zhang et al. (2009) e Zhang et al. (2022), que não observaram diferenças significativas na viabilidade de pólen fresco e preservado em frio. Por outro lado, há trabalhos que mencionam que a viabilidade do pólen de noz-pecã pode ser maior após a criopreservação (-196°C), em

comparação com o pólen fresco ou armazenado em temperatura ambiente (SPARKS e YATES, 2002; BHAT et al., 2012). Há relatos, nos quais armazenaram com sucesso o pólen de *Camellia* e *Actinidia*, imersas em nitrogênio líquido. No momento do teste de viabilidade após de um ano, os grãos foram descongelados rapidamente imergindo-os diretamente no meio de cultivo para o desenvolvimento do tubo polínico, após o período de incubação não foi observada diferenças nas taxas de germinação (HILL, 1988; LI et al., 2010; BORGHEZAN et al., 2011). Isto é contraditório com resultados em criopreservação de pólen de *Prunus* (ZHANG, 2007), no qual as respostas variaram entre as diferentes espécies de plantas (LI et al., 2010). Porém, a criopreservação é mais complexa e possui um gasto mais elevado quando comparado ao armazenamento em freezer (-20°C).

Apesar das grandes quantidades de pólen produzidas nas oliveiras na época de floração, os grãos que conseguem alcançar o estigma não são sempre aptos para fertilizar devido aos diversos problemas de incompatibilidade (ROJO, 2014). Fato que, nos últimos anos, fez com que o interesse da indústria olivícola na preservação do pólen tenha ganhado grande aceitação. Da mesma forma, os programas de melhoramento necessitam de pólen viável durante um período de tempo mais prolongado daquele que ocorre naturalmente, visto que a espécie é perene e não permite o controle do florescimento a partir da época de semeadura, como ocorre em plantas anuais.

Neste estudo, os grãos de pólen mantidos a 26°C apresentaram uma diminuição drástica de viabilidade após o segundo dia de armazenamento, reduzindo 82% para 'Koroneiki' e 89% para 'Arbequina'. Resultado consistente com o mencionado por Zambon et al. (2018).

Tem sido mencionado que, 30% de germinação do pólen pode ser considerado uma taxa aceitável para fertilização em árvores frutíferas (SILVA et al., 2016; ZAMBON et al., 2018). Os resultados para o percentual de viabilidade em temperatura ambiente, foi de 18% para 'Koroneiki' e 11% para 'Arbequina,' ocorrido entre 90 e 122 dias, sendo considerado muito baixo para seu uso tanto em programas de melhoramento quanto em uso comercial, embora está acima do valor reportado por Zambon et el. (2018).

Nos demais tratamentos, que envolveram redução da temperatura, as taxas de viabilidade do pólen foram superiores. No caso de -80°C, houve germinação do pólen

até 122 dias de armazenamento para 'Arbequina' e 136 dias para 'Koroneiki', ultrapassando o máximo de 105 dias reportado por Zambon et al. (2018). Neste estudo, em ambas cultivares, a viabilidade mínima necessária de 30% para uso em programas de melhoramento foi obtida até aos 82 dias armazenamento sob temperatura -80°C.

Os resultados obtidos neste estudo parecem estar longe de alcançar um método viável de manutenção da viabilidade do pólen sob baixas temperaturas por períodos prolongados. Por outro lado, Alba et al. (2011) armazenaram 12 cultivares de oliveira 'Carolea', 'Cima di Melfi', 'Coratina', 'Faresana', 'Fasolina', 'Gremignolo', 'Leccino', 'Manzanilla', 'Nocellara', 'Nociara', 'Palmarola', 'Rotondella' e 'Mean', durante 1 ano em nitrogênio líquido a -196°C. Os autores observaram que, apesar de ocorrer quedas drásticas feitas pelo congelamento com nitrogênio, independentemente da cultivar, houve a manutenção da viabilidade dos grãos de pólen de algumas cultivares acima do limite de 30% (ALBA et al., 2011; DINATO et al., 2020).

Vários fatores afetam a viabilidade dos grãos de pólen, dentre os quais se pode destacar o genótipo, condições iniciais do grão de pólen em relação a temperatura externa e umidade do ar, teor de água do grão, substâncias de reserva, maturidade dos gametas, suas interações e tempo de conservação (ALBA et al., 2011). Portanto, manter a viabilidade por mais tempo em baixas temperaturas provavelmente está relacionado à redução no metabolismo dos grãos de pólen, favorecendo uma maior longevidade do material (CUCHIARA et al., 2012; ZAMBON et al., 2018).

Atenção deve ser dada aos tratamentos de pré-congelamento, principalmente em relação ao teor de água, para evitar a cristalização do gelo durante o processo de congelamento. As estratégias existentes são baseadas na secagem com ar, liofilização, desidratação osmótica, adição de protetores de frio e metabolismo adaptativo. As técnicas devem ser adaptadas para cada espécie, como é o caso de *Olea europaea* L., que necessita de mais experimentos para se estender a um período de armazenamento prolongado, em temperatura ultrabaixa, padronizando o teor de umidade do pólen antes do congelamento (ALBA et al., 2011).

Neste estudo, foi testada a viabilidade de grãos de pólen com diferentes teores de glicerina, sob diferentes temperatura e tempo, a fim de encontrar novos meios de preservação. Os resultados não mostraram diferenças na viabilidade do pólen

armazenado com e sem o uso de glicerina. Não foram encontrados estudos que suportem ou rejeitem o uso de glicerina ou outra substância como meio de proteção do pólen de oliveiras ou espécies de similar característica sob armazenamento em baixas temperaturas.

5.6. Conclusões

As temperaturas de -20°C e -80°C foram as mais adequadas para manter a viabilidade do pólen após o armazenamento nas cultivares 'Arbequina' e 'Koroneoiki'. Ambas cultivares mantiveram o limite mínimo de germinação de 30% aos 80 dias, podendo ser considerado para uso no melhoramento, ou até mesmo nas propriedades, quando não há disponibilidade de pólen durante o período reprodutivo. Os resultados mostraram que o armazenamento de pólen de oliveira em temperaturas abaixo de zero pode ser uma ferramenta para reduzir a necessidade de coleta do material fresco necessária no momento de cruzamento. No entanto, os resultados não são favoráveis para considerar o armazenamento a longo prazo, para uso na safra seguinte.

6. Considerações finais

Independentemente das flutuações na produção das oliveiras no mundo, a crescente demanda do mercado está levando a uma exploração industrial intensiva ou superintensiva. Por isso, é preciso encontrar uma forma de rentabilizar o negócio e, sobretudo, atingir o equilíbrio de renda a longo prazo, questão complicada no Brasil, cuja produtividade está ligada ao clima, à fertilidade da terra e à alternância produtiva, além de demonstrar sua qualidade local em um mercado e cultura ainda incipiente. Dessa forma, para alcançar um alto padrão de produtividade no Brasil devem ser realizados mais estudos para conhecer a cultura e quais cultivares poderiam se adaptar melhor às condições locais.

Este estudo tenta mostrar as causas da baixa produtividade de oliveiras nas condições ambientais no Rio Grande do Sul a partir da avaliação de aspectos morfológicos do sistema reprodutivo e aspectos genéticos relacionados com a herdabilidade e adaptação dos plantios comerciais.

No primeiro estudo foi possível observar que o número de grãos de pólen não parece variar quando a mesma cultivar foi avaliada em diferentes locais. Além disso, foi mostrado como o uso de caracteres anatômicos e ultra estruturais dos pistilos e do pólen permitem separar morfológicamente cultivares de oliveira, sendo uma ferramenta útil frente ao caos que gera sua identificação incorreta nas condições locais do Estado do Rio Grande do Sul.

O segundo estudo permitiu verificar como as condições ambientais influenciam a herdabilidade dos diferentes caracteres de fruto. Foi mostrado que as cultivares 'Koroneiki' ou 'Picual' tiveram seus caracteres controlados principalmente pelo genótipo, enquanto 'Arbequina' foi mais influenciada pelas condições ambientais.

Por fim, o terceiro estudo demonstrou a possibilidade de conservação de 30% da viabilidade do pólen, sendo mantido na temperatura de -80°C por até 80 dias, o qual pode ser utilizado pelos agricultores quando a oferta ou as condições ambientais não são as mais adequadas, e pelos melhoristas da cultura. Novos estudos são necessários

para prolongar o tempo de conservação, permitindo sua utilização entre safras diferentes.

7. Referências

ACKERMANN, M.; GORGA, L. Situación de la cadena del olivo. **Opypa, Ministerio de Ganadería, Agricultura y pesca, República Oriental del Paraguay**. p. 289-303, 2019.

ADAKALIC, M.; LAZOVIC, B. Morphological, chemical and molecular characterization of 'old olive' (*Olea europaea* L.) from Montenegro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-13, 2018.

AGUILERA, F.; RUIZ, L. Microclimatic-induced fluctuations in the flower and pollen production rate of olive trees (*Olea europaea* L.). **Grana**, v. 51, p. 228-239, 2012.

ALAGNA, F.; CACERES, M.; PANDOLFI, S.; COLLANI, S.; MOUSAVI, S.; MARIOTTI, T.; CULTRERA, N.; BALDONI, L.; BARCACCIA, G. The Paradox of Self-Fertile Varieties in the Context of Self-Incompatible Genotypes in Olive. **Front. Plant Sci.**; v. 10: n. 725, 2019.

ALBA, V.; MONTEMURRO, C.; SABETTA, W.; PASQUALONE, A.; BLANCO, E. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. **Science Horticulturae**, v. 123, p. 11-16, 2009.

ALBA, V.; SABETTA, W.; SUMMO, C.; CAPONIO, F.; SIMEONE, R.; BLANCO, A.; PASQUALONE, A.; MONTEMURRO, C. Olive (*Olea europaea* L.): Southern-Italian Biodiversity Assessment and Traceability of Processed Products by Means of Molecular Markers. P. 53-70. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (eds.) **The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution**. ISBN: 978-953-51-4394-9. 2011.

ALBERTINI, E.; TORRICELLI, R.; BITOCCHI, E.; RAGGI, L.; MARCONI, G.; POLLASTRI, L.; DI MINCO, G.; BATTISTINI, A.; PAPA, R.; VERONESI, F. Structure of genetic diversity in *Olea europaea* L. cultivars from central Italy. **Mol Breeding**, v. 2011, n. 27, p. 533-547, 2011.

ALFIERI, S. M.; RICCARDI, M.; MENENTI, M.; BASILE, A.; BONFANTE, A.; DE LORENZI, F. Adaptabilidad de los cultivares de olivo a nivel mundial a la disponibilidad de agua en el futuro clima mediterráneo. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 24, p. 435-466, 2019.

ALI, M.; BAHADUR, S.; HUSSAIN, A.; SAEED, S.; KHURAM, I.; ULLAH, M.; SHAO, J.; AKHTAR, N. Foliar epidermal micromorphology and its taxonomic significance in *Polygonatum* (Asparagaceae) using scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, p. 1381-1390, 2020.

ALI, M.; LIU, Y.-J.; XIA, Q.P.; BAHADUR, S.; HUSSAIN, A.; SHAO, J.W.; SHUAIBET M. Pollen micromorphology of eastern Chinese *Polygonatum* and its role in taxonomy by using scanning electron microscopy. **Microsc Res Tech**, v. 84, p. 1451-1461, 2021.

ALMEIDA, I.; ANTUNES, L. Necessidades climáticas e influência do clima sobre adaptação, produção e qualidade. In: ANTUNES, L.E.C.; HOFFMANN, A. **Pequenas frutas: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 194 p, 2012.

ANDRÉS, F. **Enfermedades y plagas del olivo**. 2ª Ed. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L.; Jaén, 1991.

ANTOGNOZZI, E.; STANDARDI, A. Influenza dell'epoca di trattamento con prodotti cascolanti sulla redditività del lavoro di raccolta nella cv. Moraiolo. **Rivista di ortoflorofrutticoltura italiana** v. 62, n. 3, 1978.

APARICIO, C. **El olivo (*Olea europaea* L.) y el estrés salino. Importancia de los reguladores del crecimiento**. 2016. 354f. Tese (doutorado), Universidad de Jaén. 2016.

ARENAS-CASTRO, S.; GONÇALVES, J.F.; MORENO, M.; VILLAR, R. Projected climate changes are expected to decrease the suitability and production of olive varieties in southern Spain. **Science of the total environment**, v. 709, e. 136161, 2020.

ARSEL, H.; CIRIK, N. General Overview of Olive Breeding in Turkey. **OLIVAE**, v. 52, n. 25-27, 1994.

ARZANI, K.; JAVADY, T. Study of flower biology and pollen tube growth of mature olive tree cv `Zard'. **Acta Hortic**, v. 586, p. 545-547, 2002.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein and oil content, peroxide index and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) grown in six tropical and sub tropical ecosystems of South America. **Tropical Science, London**, v. 44, n. 3, p. 131-135, 2004.

BALDONI, L.; CULTRERA, N.; MARIOTTI, R.; RICCIOLINI, C.; ARCIONI, S.; VENDRAMIN, G.; BUONAMICI, A.; PORCEDDU, A.; SARRI, V.; OJEDA, M.; TRUJILLO, I.; RALLO, L.; BELAJ, A.; PERRI, E.; SALIMONTI, A.; MUZZALUPO, I.; CASAGRANDE, A.; LAIN, O.; MESSINA, R.; TESTOLIN, R. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. **Mol Breed**, n. 24, p. 213-231, 2009.

BALDONI, L.; TOSTI, N.; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G.; GERMANA, M.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic structure of wild and cultivated olives in the Central Mediterranean Basin. **Ann Bot**, n. 98, p. 935-942, 2006.

BARRAL, P.; SUAREZ, C.; BATANERO, E.; ALFONSO C.; ALCHE, J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; VILLALBA, M.; RIVAS, G.; RODRÍGUEZ, R. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. **Biochem. J.**; v. 2005, n. 390, p. 77-84, 2005.

BARRANCO D.; RALLO L. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Departamento de Pomología ETSIA, Universidad de Córdoba. **Junta de Andalucía Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, España**, p. 107-111, 1984.

BARRANCO, D.; RALLO, L. Olive Cultivars in Spain. **HORTTECH**, v. 10, n. 1, p. 107-110, 2000.

BARRANCO, D. La elección varietal en España. **Olivae**, v. 59, p. 54-58, 1995.

BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El Cultivo del olivo** (8ª Ed). Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, 2008.

BARRANCO, D.; CIMATO, A.; FIORINO, P.; RALLO, L.; TOUZANI, A.; CASTAÑEDA, C.; SERAFINI, F.; TRUJILLO, I. **World olive catalogue of olive varieties**. International Olive Oil Council, 2000.

BARRANCO, N.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, D.; RALLO R.; L. **El Cultivo del Olivo** (3ª Eds). Madrid, España. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, 1999.

BARTOLINI, G.; PREVOST, G.; MESSERI, C.; CARIGNANI, G. **Olive germplasm: cultivars and world-wide collections**. Seed and Plant Genetic Resources Service, F.A.O. Rome, Italy. 1998.

BARTOLINI, G.; SIMONTACCHI, M.; TAMBUSI, E.; BELTRANO, J.; MONTALDI, E.; PUNTARULO, S. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**, n. 50, p. 373-381, 1998.

BELAJ, A.; TRUJILLO, I.; DE LA ROSA, R.; RALLO, L.; GIMENEZ, M. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. **J Am Soc Hort Sci**, n. 126, p. 64-71, 2001.

BESNARD, G.; RUBIO, R.; CHRISTIN, P.A.; VARGAS, P. Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. **Annals of Botany**, v. 104, p. 143-160, 2009.

BESNARD, G.; BRETON, C.; BARADAT, P.; KHADARI, B.; BERVILLE, A. Cultivar identification in the olive *Olea europaea* L. based on RAPDs. **J Am Hort Sci**, n. 126, p. 668-675, 2001.

BESNARD, G.; KHADARI, B.; NAVASCUES, M.; FERNANDEZ-MAZUECOS, M.; EL BAKKALI, A.; ARRIGO, N.; BAALI-CHERIF, D.; BRUNINI-BRONZINI, D.E.; CARAFFA, V.; SANTONI, S.; VARGAS, P.; SAVOLAINE, V. The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary

domestication in the northern Levant. **Proc R Soc B: Biol Sci**, v. 280, n. 1756, p. 20122833, 2013.

BHAT, Z.; DHILLON, W.; SHAFI, R.; RATHER, J.; MIR, A.; SHAFI, W.; RASHID, R.; BHAT, J.; RATHER, T. E.; WANI, T. Influence of Storage Temperature on Viability and In Vitro Germination Capacity of Pear (*Pyrus* spp.) Pollen. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 11, 2012.

BLÁZQUEZ, A.; WEIGEL, D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 404, p. 889-892, 2000.

BORGHEZAN, M.; CLAUMAN, A.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M.; ORTH, A. In vitro viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 338-344, 2011.

BÖHM, J.; GODINHO, C.; COELHO, F. **O grande livro da oliveira e do azeite**. Lisboa: Dinalivro. Pp. 288. ISBN: 9789725766200, 2013.

BRANCA, G.; BRAIMOH, A.; ZHAO, Y.; RATII, M.; LIKOETLA, P. Are there opportunities for climate-smart agriculture? Assessing costs and benefits of sustainability investments and planning policies in Southern Africa. **Journal of Cleaner Production**, v. 278, p. 123847, 2021.

BRAVO, M.; GÓMEZ, P.; KAEN, R.; MONTALBAN, D.; OVEJERO, D.; ANRADA, C. Determinación de la época de estabilización de nitrógeno, fosforo y potasio foliar en olivos, del valle central de la provincia de Catamarca. **Rev. del Cizas**, v. 5, n. 1-2, p. 81-90, 2004.

BRETON, C. M.; FARINELLI, D.; KOUBOURIS, G.; FAMIANI, F.; RAYMOND, M.; BERVILLÉ, A. A dual-Successive-Screen Model at Pollen/Stigma and Pollen Tube/Ovary Explaining Paradoxical Self-Incompatibility Diagnosis in the Olive Tree-An Interpretative Update of the Literature. **Plants**, v. 10, n. 1938, 2021.

BRITO, A.C.; SOUZA, J.; REBOUÇAS, T. E.; AMARA, C. Propriedade do pólen e do stigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 208-2014, 2010.

BUENO, M.; LENDINEZ, M.; APARICIO, C.; CORDOVILLA, M. Effect of salinity on polyamines and ethylene in *Atriplex prostrata* and *Planta gocoronopus*. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 596-600, 2014.

ĆALIĆ, D.; MILOJEVIĆ, J.; BELIĆ, M.; MILETIĆ R.; ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ, S. Impact of Storage Temperature on Pollen Viability and Germinability of Four Serbian Autochthon Apple Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 709231, 2021.

CAMAYO, D.; CAYÓN, D.; LIGARRETO, G. Pollen viability and germination in *Elaeis oleifera*, *Elaeis guineensis* and their interspecific hybrid. **Pesq. Agropec. Trop. Goiânia**, v. 51, e 68076, 2021.

CARIÑANOS, P; MARIANGELI, F. An updated proposal of the Potential Allergenicity of 150 ornamental Trees and shrubs in Mediterranean Cities. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 63, e.127218, 2021.

CARRERAS, A. **Genes implicados em la floración del olivo**. 2014. 50f. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 2014.

CASTILLA-GARCIA, M.; BLAS-ANGULO, M.; CATUNTA-MAMANI, N.; CHAPARRO-AGUILAR, E. Variedades de Olivo (*Olea europaea* L.) de importancia económica de los departamentos Tacna y Moquegua. **Ciencia & Desarrollo**, v. 20, n. 1, p. 87-95, 2021.

CASTILLO, J.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O. **Antioxidant e Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract**. Elsevier Inc.; Amsterdam, The Netherlands, 2010.

CASTRO, A.J.; REJON, J.D.; FENDRI, M.; JIMÉNEZ-QUESADA, M.J.; ZAFRA, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.C.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I.; ALCHÉ, J.D. Taxonomical

discrimination of pollen grains by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging of autofluorescence. In: MENDEZ-VILAS, A.; DIAZ, J. (Eds.) **Microscopy Book. Series 4'**. (Formatex Research Center, Bada-Joz). 2010. p. 607-613.

CAVAGNARO, P.; JUÁREZ, J.; BAUZA, M.; MASUELLI, R. Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. **Agriscientia**, v. 18, p. 27-35, 2001.

CHACÓN-ORTIZ, A.; BUSANELLO, C.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; DA MAIA, L.; FERNANDO, J.A.; PEGORARO, C. Use of microstructural characteristics of pollen and pistil to identify olive cultivars in Southern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Science (ONLINE)**, v. 44, e 62297, 2022a.

CHACÓN-ORTIZ, A.; DA MAIA, L. C.; OLIVEIRA, A.C.; VENSKE, E.; PEGORARO, C. Characterization and heritability of fruit from olive cultivars in the south of Brazil. **Bragantia**, v. 81, e 4522, 2022b.

CHIAPPETTA, A.; MUZZALUPO, I. Botanical description. In: MEZZALUPPO, I. (Ed.). **Olive germoplasm - The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy**. Rijeka: InTech, 2012, p.383.

CHIAPPETTA, A.; MUTO, A.; MUZZALUPO, R.; MUZZALUPO, I. New rapid procedure for genetic characterization of Italian wild olive (*Olea europaea*) and traceability of virgin olive oils by means of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 226, n. 2017, p. 42-49, 2017.

CIAMPOLINI, F.; CRESTI, M.; KAPIL, R.N. Fine structural and cytochemical characteristics of style and stigma in olive. **Caryologia**, v. 36, p. 211-230, 1983.

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

CONDE, P.; VILLAMIL, J.; BRUZZONE, J.; LEONI, C.; ZOPPOLO, R.; VILLAMIL, J. **Catálogo de cultivares de olivos evaluados en INIA-Uruguay**. Boletín de divulgación N° 117, INIA. p.77, 2019.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **Catálogo mundial de variedades de olivo**. Madrid: Cuéllar, L. p. 360, 2000.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **The origin and expansion of olive tree**. Disponível em: www.internationaloliveoil.org. Acessado: maio de 2020.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **Análisis sensorial del aceite de oliva - norma – Análisis sensorial: vocabulário general básico**. Madrid: COI, T.20/Doc. n. 4/Ver.1, 2007.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **Statistical Olive Oil Dashboard**. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/12/IOC-Olive-Oil-Dashboard-1.html#production-2>. Acessado: janeiro de 2023.

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

COUTINHO, E.F.; WREGÉ, M.S.; REISSER, C.; ALMEIDA, I.R.; STEINMETZ, S. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.): clima**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

CRUZ, F.; JULCA, I.; GÓMEZ-GARRIDO, J.; LOSKA, D.; MARCET-HOUBEN, M.; CANO, E.; GALÁN, B.; FRIAS, L.; RIBECA, P.; DERDAK, S.; GUT, M.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA, J.; GUT, I.; VARGAS, P.; TYLER S.; ALIOTO, T.; GABALDÓN, T. Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. **Gigascience**, v. 5, n.29. 2016.

CUCHIARA, C.; DOS ANJOS S.; BOBROWSKI, V. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 59, n.1, p. 82-87, 2012.

CUEVAS, J.; RALLO, L.; RAPOPORT, H.F. Crop load effects on floral quality in olive. **Scientia Horticulturae**, v. 59, p. 123-130, 1994.

CUEVAS, J.; POLITO, V.S. Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. **Horticultural Science**, v. 32, p. 1056-1058, 1997.

CUEVAS, P.; LEE, O.; HART, J.; DEAKTOR, R. Improving science inquiry with elementary students of diverse backgrounds. **Journal of Research in Science Teaching**, v. 42, p. 337-357, 2005.

CUEVAS, J.; PINILLOS, V. Polinización artificial en olivo recolección. **Agricultura**, v.75, p. 418-424, 2006.

CUEVAS, J.; POLITO, V. The role of staminate flowers in breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): An andromonoecious, wind-pollinated taxon. **Ann. Bot. (Lond.)**, n. 93, p. 547-553, 2004.

CUEVAS, J. **Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y fructificación de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.)**. PhD diss, Univ.; Córdoba Spain. 1992.

CUEVAS, J.; DÍAZ-HERMOSO, A.; GALIAN, D.; HUESO, J.; PINILLOS, V.; PRIETO, M.; SOLA, D.; POLITO, V. Response to cross pollination and choice of pollinisers for the olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca' and 'Picual'. **Olivae**, n. 85, p. 26-35, 2001.

CUEVAS, A.; LORENZO, C.; PÉREZ, M.; BENITO, A.; SASTRE, B. Evaluación de la productividad de distintas variedades de olivo en la Comunidad de Madrid bajo condiciones de secano y regadío, 2016.

D'IMPERIO, M.; VISCOSI, V.; SCARANO, M.; D'ANDREA, M.; ZULLO, B.; PILLAET, F. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 2011, p. 229-240, 2011.

DAFNI, A. **Pollination ecology: A practical approach**. (Oxford University Press, Oxford). 1992.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 113-132, 2000.

DAG, A.; BUSTAN, A.; AVNI, A.; TZIPORI, I.; LAVEE, S.; RIOV, J. Timing of fruit removal affects concurrent vegetative growth and subsequent return bloom and yield in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 469-472, 2010.

DANTAS, A.; PEIXOTOII, M.; NODARI, R.; GUERRA, M. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 27, n. 3, p. 356- 359, 2005.

DE CANDOLLE, P.; LOUIS, A. **Origine des plantes cultivees**. Paris: G. Bailliere, 1983.

DE LA ROSA, R.; RALLO, L.; RAPOPORT, H. Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. **HortScience**, v. 35, n. 7, p. 1223-1227, 2000.

DE LA ROSA, R.; JAMES, C.M.; TOBUTT, K. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 265-267, 2002.

DE LA ROSA, R.; LEÓN, L.; GUERRERO, N.; RALLO, L.; BARRANCO, D. Preliminary results of an olive cultivar trial at high density. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 58, p. 392-395, 2007.

DE OLIVEIRA, S.; SOUZA, R.; AONA, L.Y.S.; DUARTE, F.V.; SOARES, T.L.; ROSSI, M.L.; SOUZA, E.H. Pollen morphology and viability of *Tillandsia* (Bromeliaceae) species by light microscopy and scanning electron microscopy. **Microsc Res Tech**, v. 84, p. 441-459, 2021.

DEL RIO, A. Difesa: fitofagidell'oliveto. Consorzi Interprovinciale per la Frutticoltura Cagliari-Oristano-Nuoro, ed. Manuale di olivicoltura. **Cagliari**. p. 229-246, 2003.

CAMAYO, DJ.; CAYÓN, D.; LIGARRETO, G. Pollen viability and germination in *Elaeis oleifera*, *Elaeis guineensis* and their interspecific hybrid. **Pesq. Agropec. Trop. Goiânia**, v. 51, e 68076, 2021.

DINATO, N.B.; SANTOS, I.R.I.; VIGNA, B.B.Z.; FERREIRA, A.; FAVERO, A.P. PERSPECTIVE: Pollen Cryopreservation for Plant Breeding and Genetic Resources Conservation. **Cryo Letters**, v. 41, n. 3, p. 115-127, 2020.

DOMÍNGUEZ, E.; GARCÍA-PANTALEÓN, F.; GALÁN, C.; GUERRA, F.; VILLAMANDOS, F. Variations in the concentrations of airborne *Olea* pollen 127 and associated polinosis in Córdoba (Spain): A study of the 10-year period 1982- 199. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 3, n. 3, p. 121-129, 1993.

DONOSO, J.; BASTIAS, R.; LEMUS, G.; SILVA, L. **Comportamiento fenológico del olivo (*Olea europea* L.) en tres localidades de la VI región, temporada 2005-2005**, INIA Chile, 2006.

DOS SANTOS, F.; MAGALHÃES, J.; MARINI, P.; BICCA, A.; MARTINS, N.; PEIXOTO, D.; FERREIRA, L.; COUTINHO, E.; MUNT, D. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo in vitro de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **R. bras. Bioci.; Porto Alegre**, v. 13, n. 3, p. 130-133, 2015.

DRAGO, D. **Caracterización de la flor, cuajado y frutos de cultivares autóctonos de olivo en El Maestrazgo (Castellón)**. 2015. 187f. Tese (doutorado) Universitat Politècnica de València, 2015.

DU, T.; ZHAO, C.; LIU, J. The pollen of *Solanum* L. and its systematic significance. **Palynology**, v. 42, p. 291-310, 2018.

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

EJSMOND, M.J.; WROŃSKA-PILAREK, A.; EJSMOND, D.; DRAGOSZ-KLUSKA, M.; KARPIŃSKA-KOŁACZEK, P.; KOŁACZEK, D.; KOZŁOWSKI, J. Does climate affect pollen morphology? Optimal size and shape of pollen grains under various desiccation intensity. **Ecosphere**, v. 2, n. 10, p. 117, 2011.

FABBRI, A.; LAMBARDI, M.; OZDEN-TOKATLI, Y. Olive Breeding. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. (Eds) **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**. Springer, New York, NY. 2009.

FABBRI, A.; BENELLI, C. Flower bud induction and differentiation in olive. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 131-141, 2000.

FABBRI, A.; HORMAZA, J.; POLITO, V. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **J Am Soc Hort Sci**, n. 120, p. 538-542, 1995.

FABBRI, A.; BARTOLINI, G.; LAMBARDI, M.; KAILIS, S. **Olive propagation manual**. Austrália, p.3066, 2004.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The Principles of Pollination Ecology**. (3ed Edition, New York, Pergamon), 1979.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK. 1996.

FAOSTAT. Food and agriculture organization. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. 2019. Acesso em: 14 jun. 2022.

FARIA-MACHADO, A.; WILHELM, A.; GUEDES, A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, L.; GONÇALVES, E.; JORGE, R.; SCOFANO, M.; BIZZO, H.; ANTONIASSI, R. Qualidade de azeites extravirgens produzidos no Brasil. **I Congresso Luso-Brasileiro de**

Horticultura - Sessão Olivicultura, 2018. Disponível em: http://www.aphorticultura.pt/actas-portuguesas-de-horticultura_nordm-29.html. Acesso em: 14 outubro 2022

FENDRI, M.; TRUJILLO, I.; TRIGUI, A.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I.; ALCHÉ, J.D. Simple sequence repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a Tunisian germoplasm collection. **Hort Science**, v. 45, n. 10, p. 1429-1436, 2010.

FENDRI, M.; REJÓN, J.D.; RODRÍGUEZ, M.I.; ALCHÉ, J.D. **Evaluación de un método de clasificación varietal basado en la utilización de los caracteres morfológicos del polen en variedades de olivo**. XV Scientific-technical symposium of olive oil, p. 1-8. 2011.

FENDRI, M. **Discriminación varietal en Polen de Olivo (*Olea europea* L) mediante características morfológicas y marcadores microsatélites**. 2011. 237f. Tese (doutorado) em Biología Agraria y Acuicultura, Universidad de Granada, 2011.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Universidade de São Paulo, 2009.

FERNANDES, R.C.; BUSANELLO, C.; VIANA, V.E.; VENSKE, E.; DE OLIVEIRA, V.F.; LOPES, J.L.; DA MAIA, L.C.; DE OLIVEIRA, A.C.; PEGORARO, C. Genetic variability and heritability of agronomic traits in a wheat collection used in southern Brazil. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 2021.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. Pollen grain aperture in *Olea europaea* L. **Rev Palaeobot Palynol**, n. 85, p. 99-109, 1994.

FERNANDEZ, R.; GÓMEZ-VALLEDOR, G. Cross-pollination in 'Gordal Sevillana' olives. **Hort Science**, n. 20, 1985.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; BENLLOCH, M.; NAVARRO, C.; MARTÍN, G. The time of floral induction in olive. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 2, p. 304-307. 1992.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; NAVARRO, S.; MELGAR, J. Effect of nitrogen status on frost tolerance of olive trees. **Acta Hortic** 924, 41-44. 2011.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; SÁNCHEZ-ZAMORA, M.; GARCÍA-NOVELO, J.; MOLINA, C. Nutrient removal from olive trees by fruit yield and pruning. **Hort Science**, v. 50, n. 3, p. 1-5, 2015.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I. Ultraestructura y desarrollo de la pared celular del grano de polen del olivo (*Olea europaea*): ii. Zona **Apertural**. **An. Asoc. Palinol. Leng. Esp**, v. 2, p. 237-246, 1985.

FERRARA, G.; CAMPOSEO, S.; PALASCIANO, M.; ANGELO, G. Production of total and stainable pollen grains in *Olea europaea* L. **Grana**, v. 46, p. 85-90, 2007.

FONTAO, E. **Organización del sector olivarero Malagueño**. Discurso de ingreso como Académica de Número, p. 9-17, 2014.

FORTUNY, J. **Metodología del análisis sectorial en el sistema agroalimentario, aplicada al subsector oleica catalán: evaluación de la competitividad, el progreso tecnológico y la eficiencia económica empresarial**. 2002. 127f. Tese (doutorado), Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Universitat Politècnica de Catalunya, 2002.

FRAGA, H.; PINTO, J.; SANTOS, J. Olive tree irrigation as a climate change adaptation measure in Alentejo, Portugal. **Agricultural Water Management**, v. 237, p. 106193, 2020.

FRAGA, H.; MORIONDO, M.; LEOLINI, L.; SANTOS, J.A. Mediterranean Olive Orchards under Climate Change: A Review of Future Impacts and Adaptation Strategies. **Agronomy**, v. 2021, n. 11, p. 56, 2021.

GALÁN, C.; GARCÍA-MOZO, H.; CARIÑANOS, P.; ALCÁZAR, P. E DOMÍNGUEZ-VILCHES, E. The role of temperature in the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in southwestern Spain. **Int J Biometeorol**, v. 45, p. 8-12, 2001.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of pollen. In: REED, B. M. (Ed.). *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, 2008. p. 443-447.

GANINO, T.; RAPOPORT, F. e FABBRI, A. Anatomy of the olive inflorescence axis at flowering and fruiting. *Scientia Horticulturae*, v.129, n.2, p.213-219. 2011.

GANINO, T.; BARTOLINI, A. e FABBRI A. The classification of olive germplasm review. *J Hortic Sci Biotechnol* v.81, p.319-334, 2006.

GARCÍA, L.; RIVERO, M.; e DROPPELMANN, F. Descripción morfológica y viabilidad del polen de *Nothofagus nervosa* (Nothofagaceae). **Bosque (Valdivia)**, v. 36, n. 3, p. 487-496, 2015.

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

GARCÍA, J. **La biodiversidad del olivo (*Olea europaea* L.) en Colombia: estudio molecular, morfológico y fenológico del germoplasma**. Università Degli Studi di Parma, Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale XXIV ciclo. 2012.

GOBBATO, C. Cultura da oliveira e noções sobre a industrialização das azeitonas. **Porto Alegre: Centro**, n. 1945, p. 118, 1945.

GOMES, P. **Olivicultura no Brasil**. São Paulo: Melhoramentos, 1979. 208 p.

GOMEZ, M.; RAPOPORT, H. [de la yema al desarrollo inicial de la aceituna] Descripción de la iniciación floral, floración, cuajado, caída de frutos y endurecimiento del hueso. **Dossier agricultura**, p. 400-406, 2008.

GÓMEZ-GÁLVEZ, F. **Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo**. 2018. 96f. Programa de doctorado

en Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible, Universidad de Córdoba, España, 2018.

GONZÁLEZ, F.; CEBRINO, J. The importance of pollen counts in the air: an example. **Revista de Salud Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 43-51, 2016.

GUERRERO, A. **Nueva Olivicultura**. Madrid, Spain: Ediciones Mundi-Prensa, 1991.

GUERRERO-MALDONADO, N.; LÓPEZ, M.J.; CAUDULLO, G.; DE RIGO, D. *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: SAN-MIGUEL-AYANZ, J.; DE RIGO, D.; CAUDULLO, G.; HOUSTON DURRANT, T.; MAURI, A. (Eds.), **European Atlas of Forest Tree Species**. Publ. Off. EU, Luxembourg, p. e01534b. 2016.

GUL, S.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; BAHADUR, S.; ZAMAN, W.; AYAZ, A.; SHUAIB, M.; BUTT, M.A.; FAZAL, U.; SAQIB, S.; NIZAMANI, M.M.; ZARA, U. Palynological characteristics of selected Lamioideae taxa and its taxonomic significance. **Microscopy Research and Technique**, p. 1-9, 2020.

GULLÓN, P.; GULLÓN, B.; ASTRAY, G.; CARPENA, M.; FRAGA-CORRAL, M.; PRIETO, M.A.; SIMAL-GANDARA, J. Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. **Food Res Int.**, v. 137, n. 109683, 2020.

GUTIERREZ, G. **Diagnóstico del cultivo de olivo en la región Arequipa Perú**. Competitividad Innovación Desarrollo, p.103, 2007.

GUZMAN, C.; ÁVILA, G. **Efectos económicos de la introducción de tecnologías de agricultura de precisión de una explotación olivícola**. 2013. 103f. Universidad del Bío-Bío Facultad de Ciencias Empresariales, Escuela Contador Público y Auditor, 2013.

HABERMAN, A.; BAKHSHIAN, O.; CERESO-MEDINA, S.; PALTIEL, J.; ADLER, C.; BEN-ARI, G.; MERCADO, J.A.; PLIEGO-ALFARO, F.; LAVEE, S.; SAMACH, A. A possible role for flowering locus T-encoding genes in interpreting environmental and

internal cues affecting olive (*Olea europaea* L.) flower induction. **Plant Cell Environ**, v. 40, n. 8, p. 1263-1280, 2017.

HAMMER, O, HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontological Electronic**, v. 4, p 9, 2021.

HANNA, W.N. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. **Crop Science**, v. 34, p. 1681-1682, 1994.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **Cryoletters**, v. 25, p. 3-22, 2004.

HARTMANN, H.; PORLINGIS, I. Effect of Different Amounts of Winter Chilling on Fruitfulness of Several Olive Varieties. **Source: Botanical Gazette**, v. 119, n. 2, p. 102-104, 1957.

HAY, F. **New technologies to improve the *ex situ* conservation of plant genetic resources. Plant genetic resources.** 1st Edition. Burleigh Dodds Science Publishing, p. 32, 2021.

HERRERO, M. From pollination to fertilization in fruit trees. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 27-32, 1992.

HIDALGO, J. Algunas notas para la historia del olivo en Arica, **Idesia**, n. 12, p. 31-50, 1993.

HISAMATSU, T.; KING, R. The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for Flowering Locus T (FT) and gibberellin. **J. Exp. Bot.**, n. 59, p. 3821-3829, 2008.

IBACACHE, G. **Fertilización del Olivo.** Investigación y progreso Agropecuario La Platina 1986.

INFAOLIVA, **Situación de Mercado del Aceite de Oliva 2019-2020.** Federación Española de Industriales Fabricantes de Aceite de oliva. 2019.

ÍÑIGUEZ, A.; PAZ, S.; SÁNCHEZ, L. Variedades del olivo de la Comunidad Valenciana. **Cuadernos de Tecnología Agraria Generalitat Valenciana. Serie Olivicultura**, v. 1, p. 1-24, 1999.

IRISH, V.; SUSSEX, I. Function of the *apetala-1* Gene during *Arabidopsis* Floral Development. **The Plant Cell**, v. 2, p. 741-753, 1990.

ISHTIAQ, S.; HANIF, U.; SHAHEEN, S.; BAHADUR, S.; LIAQAT, I.; AWAN, U.F.; SHAID, M.G.; SHUAIB, M.; ZAMAN, W.; MEO, M. Antioxidant potential and chemical characterization of bioactive compounds from a medicinal plant *Colebrokea oppositifolia* Sm. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 2, e 20190387, 2020.

JACOBSEN, S.; RUNNING, M.; MEYEROWITZ, E. 1991. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems, v. 126, n. 23, p. 5231-5243, 1991.

JALCA, Z.; GARCÍA, L.; CASTRO, J.; VILLAMAR, R.; GUACHAMBALA, M. Condiciones óptimas para almacenamiento del polen de *Ochroma pyramidale*. **Bosque (Valdivia)**, v. 40, n. 2, p. 227-233, 2019.

JULCA, I.; MARCET-HOUBEN, M.; CRUZ, F.; GÓMEZ-GARRIDO, J.; GAUT, B.S.; DÍEZ, C.M.; GUT, I.G.; ALIOTO, T.S.; VARGAS, P.; GABALDÓN, T. Genomic evidence for recurrent genética mixture during the domestication of Mediterranean olive trees (*Olea europaea* L.). **BMC Biology**, v. 18, p. 148, 2020.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138. 1965.

KLEIN, I.; WEINBAUM, S. Foliar application of urea to olive: Traslocation of urea nitrogen as influenced by sink demand and nitrogen deficiency. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.109, p. 356-360, 1984.

KOORNNEEF, M.; HANHART, C.; VAN DER VEEN, J. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Gen Genet**, v. 229, n. 1, p. 57-66, 1991.

KOUBOURIS, G.; METZIDAKIS, I.; VASILAKAKIS, M. Intraspecific variation in pollen viability, germination and ultrastructure of *Olea europaea* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 70, p. 13442-13446, 2012.

KOUBOURIS, G.; METZIDAKIS, I.; VASILAKAKIS, M. Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 2009, p. 209-214, 2009.

LANGGUT, D.; CHEDDADI, R.; CARRIÓN, J.; CAVANAGH, M.; COLOMBAROLI, D.; EASTWOOD, W.; GREENBERG, R.; LITT, T.; MERCURI, A.; MIEBACH, A.; ROBERTS, C.; WOLDRING, H.; WOODBRIDGE, J. The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. **The Holocene**, v. 29, n. 5, p. 902-922, 2019.

LANZA, B.; MARSILIO, V.; MARTINELLI, N. Olive pollen ultrastructure: characterization of exine pattern through image analysis-scanning electron microscopy (IA-SEM). **Scientia Horticulturae**, v. 65, p. 283-294, 1996.

LAVEE, S.; AVIDAN, B.; WODNER, M. A rapid refractometric method for determinations of the oil content in olive (*Olea europaea*) fruit. **Adv. Hort. Sci.**, v. 2, n. 1988, p. 33-37, 1988.

LAVEE, S. Biennial bearing in olive (*Olea europaea*). **Annales: Series Historia Naturalis**, v. 17, p. 101-112, 2007.

LAVEE, S.; AVIDAN, B. Aspects of female heredity in the breeding progeny of different olive cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 949, p. 85-92, 2012.

LAVEE, S.; RALLO, L.; RAPOPORT, H.; TRONCO, A. The floral biology of the olive: effect of flower number, type and distribution on fruitset. **Scientia Horticulturae**, n. 66, p. 149-158, 1996.

LENOIR, J.; GÉGOUT, J.C.; MARQUET, P.A.; RUFFRAY, P.; BRISSE, H. A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. **Science**, v. 320, n. 5884, p. 1768-1771, 2008.

LEÓN-MORENO, L. **Mejora genética por cruzamiento en olivo (*Olea europea* L.): variabilidad, selección en progenies y puesta a punto de la técnica NIRS.** Tese (doutorado) Universidad de Córdoba. 2002.

LEVIN, A.G.; LAVEE, S. The influence of girdling on flower type, number, inflorescence density, fruitset, and yields in three different olive cultivars (Barnea, Picual, and Souri). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 827-831, 2005.

LI, C.; YU, M.; CHEN, F.; WANG, S. In vitro maturation and germination of *Jatropha curcas* microspores. *International Journal of Agriculture and Biology* v. 12, p. 541-546, 2020.

LIU, J.; KITASHIBA, H.; WANG, J.; BAN, Y. e MORIGUCHI, T. Polyamines and their ability to provide environment stress tolerance to plants. **Plant Biotechnology Journal**, n.24, p.117-126. 2007.

LOPEZ, S.; SILVEIRA, V. **Estudios de las variedades de *Olea europaea* L. establecidas en Uruguay, con énfasis en su historia, caracterización morfológica, y diversidad genética a partir de marcadores moleculares.** 2011. 209f. Tese (doutorado) de Engenheiro Agrônomo. UDELAR, Montevideo, Uruguay, 2011.

LÓPEZ-ESCUADERO, F.; MERCADO-BLANCO, J. *Verticillium wilt* of olive: a case study to implementan integrated strategy to control a soil-borne pathogen. **Plant and Soil**, v. 344, p. 1-50, 2010.

LORITE, I.J.; GABALDÓN-LEAL, C.; RUIZ-RAMOS, M.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; LEÓN, L.; SANTOS, C. Evaluation of olive response and adaptation strategies to climate change under semi-arid conditions. **Agricultural Water Management**, v. 204, p. 247-261, 2018.

LOUKAS, M.; KRIMBAS, C. History of olive cultivars based on their genetic distances. **Journal of Horticultural Science**, n. 58, p.121-127, 1983.

LUBNA, Z.; AHMAD, M.; SHAHEEN, M.; SULTANA, S.; REHMAN, S.; AMINA, H. Micromorphological investigation of leaf epidermis and seeds of Vitaceae from Pakistan

using light microscopy and scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 82, n. 4, p. 335-344, 2019.

MAJEED, S.; ZAFAR, M.; AHMAD, M.; KILIC, O.; SULTANA, S.; RAZA, J.; JABEEN, M. Pollen morphological investigations of family Cactaceae and its taxonomic implication by light microscopy and scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, 83, 1–11. 2020.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; FERNÁNDEZ, M.; M'RANI-ALAOUI, M.; MÜNSTER, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. Cell wall reformation by pollen tube protoplasts of olive (*Olea europaea* L.): structural comparison with the pollen tube wall. **Sex Plant Reprod**, n. 15, p. 21-29, 2002.

MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, M. Processing of extracted olive oil pomace residue by hydrothermal or dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis in a biorefinery context, **Renewable Energy**, v. 145, p. 1235-1245, 2020.

MARCH, L.; RIOS, A. **El libro del aceite y la aceituna**. Alianza Editorial, S.A. Madrid, 1989.

MARTIN, G.; FERGUSON, L.; SIBBETT, G. Flowering, pollination, fruiting, alternate bearing, and abscission. In: SIBBETT, G.; FERGUSON, L.; COVIELLO, J.; LINDSTRAND, M. (Eds.). **Olive Production Manual**, p. 49–54. University of California, Agriculture and Natural Resources, Oakland, California. 2005.

MARTIN-PUERTAS, C.; VALERO-GARCÉS, B.; BRAUER, A.; MATA, M.; DELGADO-HUERTAS, A.; DULSKI, P. The Iberian-Roman Humid Period (2600-1600 calyr BP) in the Zoñar Lake varve record (Andalucía, southern Spain). **Quat. Res.**, v. 71, p. 108-120, 2009.

MARTINS, F.B.; PEREIRA, R.A.; TORRES, R.R.; DOS SANTOS, D.F. Climate projections of chill hours and implications for olive cultivation in Minas Gerais, Brazil. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 55, p. 01852, 2020.

MAS, M. **Estudio del comportamiento agronómico y de la calidad de aceite de cuatro variedades de olivo en cultivo superintensivo en seto en Mallorca. Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del medio rural.** 2018. 62f. Universitat de les Illes Balears. 2018.

MATÍAS, A.; TORO, A.; MONTALVÁN, D.; MOLINA, M. **Variedades de olivo cultivadas en las provincias de Catamarca y La Rioja, Argentina.** Buenos Aires: Ediciones INTA, p. 70, 2010.

MEKURIA, G.; COLLINS, G. SEDGLEY M. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. **J. Hort. Sci. Biotechnol**, v. 74, p. 309-314, 1999.

MINELLI, S.; MAGGINI, F.; GELATI, M.T.; ANGIOLILLO, A.; CIONINI, P.G. The chromosome complement of *Olea europaea* L.; characterization by differential staining of the chromatin and in-situ hybridization of highly repeated DNA sequences. **Chromosome Res.** v. 8, n. 7, p. 615-619, 2000.

MORA, F.; TAPIA, F.; IBACACHE, A.; MARTINS, E.; SCAPIM, C. Genetic evaluation of olive clones in the Atacama Desert, Chile. **Agrociencia**, v. 42, p. 777-786, 2008.

MORA, F.; RODOVALHO, M.; DEITOS, A.; ATORGA M. Estratégias Fundamentais para o Desenvolvimento da Cultura da Oliveira no Brasil Revista Trópica. **Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 66, 2007.

MORALES, S.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.; CASTRO, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; ALCHE, J. Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. **Journal of Microscopy**, v. 231, p. 332-341, 2008.

MORAN, E.V.; HARTIG, F.; BELL, D.M. Intraspecific trait variation across scales: implications for understanding global change responses. **Global Change Biology**, v. 22, p. 137-150, 2016.

MORETTINI, A.; PULSELLI, A. L'azione del vento nel trasporto del polline del l'olivo. **Ann. Sperim. Agr.**, n. 7, p. 1187-1218, 1953.

MOUSAVI, S.; DE LA ROSA, R.; MOUKHLI, A.; EL RIACHY, M.; MARIOTTI, R.; TORRES, M.; PIERANTOZZI, P.; STANZIONE, V.; MASTIO, V.; ZAHER, H.; EL ANTARI, A.; AYOUB, S.; DANDACHI, F.; YOUSSEF, H.; AGGELOU, N.; CONTRERAS, C.; MAESTRI, D.; BELAJ, A.; BUFACCHI, M.; BALDONI, L.; LEON, L. Plasticity of fruit and oil traits in olive among different environments. **Scientific reports**, n. 9, p. 16968, 2019.

MUÑOZ-MÉRIDA, A.; GONZÁLEZ-PLAZA, J.; CANADA, A.; BLANCO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; PEDROLA, L.; SICARDO, M.; HERNÁNDEZ, M.; DE LA ROSA, R.; BELAJ, A.; GIL-BORJA, M.; LUQUE, F.; MARTÍNEZ-RIVAS, J.; PISANO, D.; TRELLES, O.; VALPUESTA, V.; BEUZO'N, C. De Novo Assembly and Functional Annotation of the Olive (*Olea europaea*) Transcriptome. **DNA RESEARCH**, v. 20, p. 93-108, 2013.

NAVARRO-AINZA, J.A.; LÓPEZ-CARVAJAL, A. Cuajado de frutos y partenocarpia en olivo 'Manzanillo' con polinización cruzada. **Agronomía Mesoamericana**, v. 24, n. 2, p. 393-400, 2013.

NAVAS, M.L.; GARNIER, E. Plasticity of whole plant and leaf traits in *Rubia perigrina* in response to light, nutrient and water availability. **Acta Oecologica**, v. 23, p. 375-383, 2002.

NAVAS-LOPEZ, J.F.; LEÓN, L.; TRENTACOSTE, E.R.; DE LA ROSA, R. Multi-environment evaluation of oil accumulation pattern parameters in olive. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 139, p. 485-494, 2019.

NEWTON, C.; TERRAL, J.; IVORRA, S. The Egyptian olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*) in the later first millennium BC: origins and history using the morphometric analysis of olive stones. **Antiquity**, v. 80, p. 405-414, 2006.

NICOTRA, A.B.; SEGAL, D.L.; HOYLE, G.L.; SCHREY, A.W.; VERHOEVEN, K.J.; RICHARDS, C.L. Adaptive plasticity and epigenetic variation in response to warming in an Alpine plant. **Ecology Evolution**, v. 5, p. 634-647, 2015.

OBAID, R.; ABU-QAOUD, H.; ARAFEH, R. Molecular characterization of three common olive (*Olea europaea* L.) cultivars in Palestine, using simple sequence repeat (SSR) markers. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 8-17, 2014.

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

OLIVEIRA, A.; SILVA, L.; PIO, R. Cultivo da oliveira. In: PIO, R. (Ed.). **Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões de clima subtropical e tropical**. Lavras: UFLA, 2015. 2015. p. 336-377.

OLIVEIRA, D.; BASTOS, D. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OMRANI-SABBAGHI, A.; SHAHRIARI, M.; FALAHATI-ANBARAN, M.; MAHAMMAD, S.; NANKALI, A.; MARDI, M.; GHAREYAZIE, B. Microsatellite markers-based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea*) collections. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 439-447, 2007.

OTEROS, J. **Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo (*Olea europea* L.)**. 2014. 187f. Tese (doutorado), Departamento de botánica, ecología y fisiología vegetal. Universidad de córdoba, 2014.

OTEROS, J.; GARCÍA-MOZO, H.; VÁZQUEZ, L.; MESTRE, A.; DOMÍNGUEZ-VILCHES, E.; GALÁN, C. Modelling olive phenological response to weather and topography. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 179, p. 62-68, 2013a.

OTEROS, J.; ORLANDI, F.; GARCÍA-MOZO, H.; AGUILERA, F.; BEN DHIAB, A.; BONOFILIO, T.; ABICHOU, M.; RUIZ-VALENZUELA, L.; TRIGO, M.; DÍAZ DE LA GUARDIA, C.; DOMÍNGUEZ-VILCHES, E.; MSALLEM, M.; FORNACIARI, M.; GALÁN, C. Better prediction of Mediterranean olive production using pollen-based models. *Agronomy for sustainable development*, DOI: 10.1007/s13593-013-0198-x. 2013b.

ÖZKAYA, M.T.; ERGÜLEN, E.; ÜLGER, S.; ÖZILBEY, N. Genetic and Biologic Characterization of Some Olive (*Olea europaea* L). Cultivars Grown in Turkey. **Tarım Bilimleri Dergisi**, v. 10, n. 2, p. 231-236, 2004.

OZDEN-TOKATLI, Y.; AKDEMIR, H.; TILKAT, E.; ONAY, A. Current status and conservation of Pistacia germplasm. **Biotechnol Adv.**, v. 28, n. 1, p. 130-141, 2010.

PACINI, E.; VOSA, C.G. Scanning electron microscopy analysis of exine pattern in cultivars of olive (*Olea europaea* L.). **Annals of Botany**, v. 44, p. 745-748, 1979.

PALOMO-RÍOS, E.; NARVÁEZ, I.; MERCADO, J. Olive (*Olea europaea* L.) Genetic Transformation: Current Status and Future Prospects. **Genes**, v. 12, p. 232384845, 2021.

PEREIRA, W.L.; OLIVEIRA, T.T.; KANASHIRO, M.; COSTA, M.R. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 798-806, 2015.

PERICA, S.; BROWN, P.; CONNELL, J.; NYOMORA, A.; DORDAS, C.; HU, H.; STANGOULIS, J. Foliar Boron Application Improves Flower Fertility and Fruit Set of Olive. **HortScience**, v. 36, n. 4, p. 714-716, 2001.

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

PINHEIRO, M.; RODRÍGUEZ, M.; ARNAL, A. Caracterización histoquímica de la etapa temprana del desarrollo del fruto del olivo (*Olea europaea* L.). **Acta bot. bras.**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2002.

PINNEY, K.; POLITO, V. Flower initiation in 'Manzanillo' olive. **Acta Horticulturae**, n. 286, p. 203-205, 1990.

PONTI, L.; GUTIERREZ, A.P.; RUTI, P.M.; DELL'AQUILA, A. Fine-scale ecological and economic assessment of climate change on olive in the Mediterranean Basin reveals winners and losers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 111, p. 5598-5603, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2018.

RAJASEKHARAN, P.E.; RAO, T.; JANAKIRAM, T.; SRINIVASAN, G. Freeze preservation of gladiolus pollen. **Euphytica**. 80. 105-109. 1994.

RALLO, L.; BARRANCO, D.; CABALLERO, J.M.; DEL RÍO, C.; MARTÍN, A.; TOUS, J.; TRUJILLO, I. **Variedades de olivo en España**. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, p. 14-44, 2005.

RALLO, L.; CUEVAS, J. **El Cultivo del Olivo**. Fructificación y Producción. Madrid (España). Ediciones Mundi-Prensa. 2017.

RALLO, L. **Variedades de Olivo en España**. Junta de Andalucía: Mundi-Prensa. 2005.

RALLO, L. Selection and breeding of olive in Spain. **Olivae**, n. 59, p. 46-53, 1995.

RALLO, P.; DORADO, G.; MARTIN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theor Appl Genet.**, v. 2000, n. 101, p.984-989, 2000.

RAMOS, A. **Inducción floral y latencia de las yemas del olivo (*Olea europaea* L.)**. 2000. 153f. Tese (doutorado) Córdoba, UC. ETSIAM. 2000.

RAMOS, A.; RALLO, I.; LAVEE, S. Efecto de la defoliación, de la carga del árbol y de la acumulación de frío en la brotación forzada de yemas de estacas de olivo. **Actas de horticultura**, v. 15, p. 97-102, 1996.

RAPOPORT HF. Botánica y morfología. In: BARRANCO D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Eds). **El Cultivo del Olivo**. 5ª ed. Capítulo 2. Multi-Prensa (Madrid). 2004.

RAPOPORT HF. Botánica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Eds.). **El cultivo del olivo**. Junta de Andalucía-Mundi-Prensa, Madrid Spain. 2008. pp: 37-62.

RAPOPORT, H. Botánica y morfología. In: BARRANCO, D. et al. (ed.). **El cultivo del olivo**. Mundi-prensa, Junta de Andalucía, España. 37-60 p. 1998.

RAPOPORT, H.; HAMMAMI, S.; MARTINS, P.; PÉREZ-PRIEGO, O.; ORGAZ, F. Influence of water deficits at different times during olive tree inflorescence and flower development. **Environmental and Experimental Botany**, n. 77, p. 227-233, 2012.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA (RAE). **Diccionario electrónico de la lengua española**. Disponível em: <https://www.rae.es>. Acesso em: dezembro, de 2022.

RESTREPO-DÍAZ, H.; BELLOCH, M.; VAVARRO, C.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. Potassium fertilization of rainfed olive orchards. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 4, p. 399-403, 2008.

RESTREPO-DÍAZ, H.; BENLLOCH, M.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. Leaf Potassium Accumulation in Olive Plants Related to Nutritional K Status, Leaf Age, and Foliar Application of Potassium Salts. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, n. 7, p. 1108-1121, 2009.

RIBEIRO, H.; CUNHA, M.; CALADO, L.; ABREU, I. Pollen morphology and quality of twenty olive (*Olea europaea* L.) Cultivars grown in Portugal. **Acta Hort.**, v. 949, p. 259-264, 2012.

RIBEIRO, H.; REJÓN, J.D.; FENDRI, M.; CALADO, L.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I.; ALCHÉ, J.D. e ABREU, I. **Discrimination of Portuguese olive cultivars by pollen morphology and ultrastructure.** XVII International Symposium APLE. Ourense (Spain). 2010.

RILEY, F. Olive oil production on Bronze Age in Crete: nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil. **Oxf J Archaeol**, n. 21, p. 63-75, 2002.

ROCA, L.; MORAL, J.; VIRUEGA, J.; ÁVILA, A.; OLIVEIRA, R.E.; TRAPERO, A. Copper fungicides in the control of olive diseases. **FAO olive network**, n. 26, p. 48-50, 2007.

RODRIGO-COMINO, J.; SALVIA, R.; QUARANTA, G.; CUDLÍN, P.; SALVATI, L.; GIMENEZ-MORERA, A. Climate Aridity and the Geographical Shift of Olive Trees in a Mediterranean Northern Region. **Climate**, n. 9, p. 64, 2021.

RODRÍGUEZ-ENTRENA, M.; VILLANUEVA, A.J.; ARRIAZA, M.; GÓMEZ-LIMÓN, J.A. **¿Es rentable el olivar andaluz? Un análisis por sistema productivo.** Córdoba. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, p.1-17, 2016.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ, M. Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of the olive pollen grain (*Olea europaea* L.). **Plant Syst Evol**, n. 171, p. 221-231, 1990.

RODRÍGUEZ-ROJAS, T.; ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; CANUL-KU, J.; CASTILLO-GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; GUILLÉN-SÁNCHEZ, D. Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies

Echeverria en condiciones de invernadero. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 6 n. 1, p. 111-123, 2015.

ROJO, J.; SALIDO, P.; PÉREZ-BADIA, R. Flower and pollen production in the 'Cornicabra' olive (*Olea europaea* L.) cultivar and the influence of environmental factors. **Trees**, 29, p. 1235-1245, 2015.

ROJO, J. **Estudio de la fenología floral del olivo (*Olea europaea* L.) y su relación con las variables ambientales**. 2014. 270f. Tese (doutorado). Universidad de Castilla-La Mancha, España. 2014.

RUIZ, C. Oliveira (*Olea europaea* L.): armazenagem de pólen, propriedades do estigma e efeitos de defensivos agrícolas na microsporogênese. 2016. 60f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

RUIZ, C.; DA SILVA, L.; PIO, R.; BIANCHINI, F.; DE OLIVEIRA, A. Storage of pollen and properties of olive stigma for breeding purposes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 2, p. 291-297, 2018.

RYAN, D.; PRENZLER, P.D.; LAVEE, S.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. **J Agric Food Chem.**, v. 51, n. 9, p. 2532-3538, 2013.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, p. 247-249, 1973.

SAKAR, E.; UNVER, H.; ERCISLI, S. Genetic Diversity Among Historical Olive (*Olea europaea* L.) genotypes from Southern Anatolia Based on SSR Markers. **Biochem Genet**, v. 54, p. 842-853, 2016.

SÁNCHEZ, M.; MUÑOZ, M.; GUERRERO, N.; CUESTA, J.; EXPÓSITO, D.; RAYA, M.; TRAPERO, A. La podredumbre radical del olivo y acebuche. **Hoja divulgativa, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía**, p. 1-6. 2008.

SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; CUEVAS, J. Pollen-pistil interaction in 'Manzanillo' olive (*Olea europaea* L.) under self-, free- and cross-pollination. **Revista Chapingo Serie Horticultura** v. 25, p. 141-150, 2019.

SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; CUEVAS, J. Pollination Strategies to Improve Fruit Set in Orchards of 'Manzanillo' Olive in a Nontraditional Producing Country, Mexico. **Hortecology**, v. 29, n. 3, p. 258-264, 2018.

SANTOS, F. **Variabilidade genética de acessos de oliveira (*Olea europaea* L.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado – RS: baseadas em critérios fisiológicos, morfológicos e moleculares.** 2016. 126f. Tese (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2016.

SANTOS, C.; GABALDÓN-LEAL, C.; BLANCO, M.; PORRAS, R.; LEÓN, L.; DE LA ROSA, R. El Cultivo del Olivo ante el Cambio Climático. Córdoba. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. **Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (SERVIFAPA)**, p.1-18, 2019.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL (SEAPDR). **Folder do Programa Estadual de Olivicultura.** Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>. 2020. Acesso em: 20 de maio de 2021.

SEDGLEY, M. **Wild olive selection for quality oil production. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation.** RIRDC Publication No 00/116 RDC Project No UA-41A. <https://rirdc.infoservices.com.au/items/00-116>. 2000. Acesso em: 2 de março de 2022

SEIFI, E. **Self-Incompatibility of Olive.** 2008. 181f. Tese (Doutorado). Discipline of Wine and Horticulture School of Agriculture, Food and Wine, Faculty of Science, University of Adelaide, 2008.

SEIFI, E.; GUERIN, J.; KAISER, B.; SEDGLEY, M. Flowering and fruit set in olive: a review. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 2, p. 1263-1272, 2015.

ŞENBAŞ, A.; HORZUM, Ö.; DÖLEK-GENCER, C.; ÖZKAYA, M.T. Storage and In-vitro Germination of Some Olive Pollens. **Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences**, v. 32, n. 4, p. 843-852, 2022.

SERRANO, I.; SUÁREZ, C.; OLMEDILLA, A.; RAPOPORT, H.; RODRIGUEZ-GARCÍA, M. Structural organization and cytochemical features of the pistil in Olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual at anthesis. **Sexual Plant Reproduction**, v. 21, p. 99-111, 2008.

SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGIA E HIDROLOGIA DEL PERÚ (SENAMHI), **Boletín de pronóstico de riesgo agroclimático del cultivo del olivo en la cuenca del Rio Caplina**. Informe Técnico v.5, n.2,2020/SENAMHI-DMA-SPC. P.10. 2020.

SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGIA E HIDROLOGIA DEL PERÚ (SENAMHI), **Boletín de pronóstico de riesgo agroclimático del cultivo del olivo en la cuenca del Rio Caplina**. Informe Técnico v.4, n.10,2019/SENAMHI-DMA-SPC. P.10. 2019.

SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; TATICCHI, A.; URBANI, S.; DI MAIO, I.; VENEZIANI, G.; SELVAGGINI, R. New approaches to virgin olive oil quality, technology, and by-products valorization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, p. 1882-1892, 2015.

SHIVANNA, K.; JOHRI, B. The angiosperm pollen: Structure and function. **Current Science**, v. 54, n. 8, p. 368,1985.

SIBBETT, G.; FREEMAN, M.; FERGUSON, L.; POLITE, V. Effect of Topically Applied 'Sevillano' Pollen on Normal seeded and Parthenocarpic "Shotberry" Fruit Set of 'Manzanillo' Olive. **HortTechnology**, v. 2, n. 2, p. 228-230, 1992.

SILVA, E.; REBOITA, M. Estudo da Precipitação no Estado de Minas Gerais -MG. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 13, p. 120-136, 2014.

SILVA, J.M.C.; RAPINI, A.; BARBOSA, L.C.F.; TORRES, R.R. Extinction risk of narrowly distributed species of seed plants in Brazil due to habitat loss and climate change. **Peer J**, v. 7, e7333, 2019.

SILVA, L. **Caracterização agroindustrial de cultivares de Oliveira com potencial econômico para o Sul de Minas Gerais**. 2011. 84f. Dissertação (Mestre em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração produção vegetal). Universidade Federal de Lavras, 2011.

SILVEIRA, A.; LÓPEZ, S.; GÁNDARA, J.; PEREIRA, J. **Reseña Histórica del Cultivo de Olivo en Uruguay desde la Época Colonial hasta el presente**. 2012.

SINGH, R.; KAR, P. Compatibility studies in some olive cultivars. **Progressive Horticulture**, v. 12, p. 9-15, 1980.

SKODRA, C.; MICHAELIDIS, M.; DASENAKI, M.; GANOPOULOS, I.; THOMAIDIS, N.S.; TANOU, G. Unraveling salt-responsive tissue-specific metabolic pathways in olive tree. **Physiologia Plantarum**. <https://doi.org/10.1111/ppl.1356>. 2021.

SOLERI, D.; KOEHMSTEDT, A.; ARADHYA, M.K.; POLITO, V.; PINNEY K. Comparing the historic olive trees (*Olea europaea* L.) of Santa Cruz Island with contemporaneous trees in the Santa Barbara, CA area: a case study of diversity and structure in an introduced agricultural species conserved in situ. **Genet Resour Crop Evol**. v. 57, p. 973-984, 2010.

SOUTHWICK, S.; OLSON W.; YEAGER J.; WEISS K.G. Optimum timing of potassium nitrate spray applications to “French” prune trees. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 121, p. 326-333, 1996.

SPARKS, D.; YATES, I. Pecan Pollen Stored Over a Decade Retains Viability. **Hortscience**, v. 37, p. 176-177, 2022.

SUÁREZ, C.G. **Caracterización estructural e histoquímica del pistilo durante la fase progámica e implicación de pectinas y AGPs en las interacciones polen-pistilo** en el olivo. 2009.

SUAREZ, M.; ROMERO, M.; RAMO, T.; MACIA, A.; MOTILVA, M. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 1463-1472, 2009.

SUÁREZ, C.; CASTRO, A. J.; RAPOPORT, H. F.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Morphological, histological and ultrastructural changes in the olive pistil during flowering. **Sexual Plant Reproduction**, v. 25, p. 133-146, 2012.

TAAMALI, W.; GEUNA, F.; BASSI, D.; DAOUD, D.; ZARROUK, M. SSR marker-based DNA fingerprinting of Tunisian olive (*Olea europaea* L.) varieties. **J Agron.**, n. 7, p. 176-181, 2008.

TAGUAS, F. **El cultivo del olivo en el departamento de Boyacá-diagnóstico y plan de acción**-. Ediciones cisnecolor, 83p. Bogotá. 2009.

TAPIA, F.; IBACACHE, A.; SIERRA, C.; LARRAÍN, P.; RIVEROS, F.; MARTÍNEZ, L.; VALLENAR. Seminario manejo agronómico industrial olivícola. 2009.

TERAMOTO, J.; BERTOCINI, E.; PANTANO, A. Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. Infobibos-Organização de Eventos Científicos, Cursos e Treinamentos, 2010. Online. Artigo em Hypertexto. 2013. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/Historico%20Oliveira/index.htm. Acesso em: 18 de Nov de 2022.

TJAMOS, E.; GRANITI, A.; SMITH, I.; LAMBERTI, F. Conference on olive diseases. **EPPO Bulletin** n. 23, p. 365-550, 1993.

TOUS, J.; ROMERO, A.; PLANA, J. Plantaciones superintensivas en olivar: comportamiento de 6 variedades. **Agricultura** n. 851, p. 346-350, 2003.

TOUS, J.; ROMERO, A.; PLANA, J.; GUERRERO, L.; DIAZ, I.; HERMOSO, F. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva arbequina obtenidos en distintas zonas de España. **Grasas y aceites**, v. 48, p. 415-424, 1997.

TRAPERO, A.; BLANCO, M. Enfermedades. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Eds.). **El cultivo de olivo**. Coedición Junta de Andalucía / Mundi-Prensa, Madrid, p. 595-656, 2008.

TRAPERO, A. ROCA, L.; MORAL, J.; LÓPEZ-ESCUADERO, F.; BLANCO- LÓPEZ, M. Enfermedades del olivo. **Phytoma España**, n. 209, p. 18-28, 2009a

TRAPERO, A.; ROCA, L.; MORAL, J. Perspectivas futuras del control químico de las enfermedades del olivo. **Phytoma España** n. 212, pp. 80-82. 2009b.

TRAPERO, A.; ROCA, L.; MORAL, J.; TRAPERO, C.; LÓPEZ-ESCUADERO, F. Capítulo 7: Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. In: ALONSO-MIELGO, A. El olivar ecológico. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación: Mundi-prensa, 457p.: il. 2011, p: 209-256.

TRIGO, M.; JATO, V.; FERNÁNDEZ, D.; GALÁN, C. **Atlas aeropalínológico de España, León**. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones. 2008

TRUJILLO, I.; RALLO, L.; ARÚS, P. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 120, n. 2, p. 318-324, 1995.

UMBER, F.; ZAFAR, M.; ULLAH, R.; BARI, A.; KHAN, M.Y.; AHMAD, M.; SULTANA, S. Implication of light and scanning electron microscopy for pollen morphology of selected taxa of family Asteraceae and Brassicaceae. **Microscopy Research and Technique**, 1-12. 2021.

VAL, A. **Caracterização genética de oliveira utilizando marcadores moleculares**. 2011. 100f. Tese (doutorado), Universidad de Lavras: UFLA, 2011.

VALDÉS, B.; DÍEZ, M.J.; FERNÁNDEZ, I. **Atlas polínico de Andalucía Occidental**. Inst. Des. Regional y Exma. Diputación de Cádiz. Sevilla, España. 1987.

VALLADARES, F.; SANCHEZ-GOMEZ, D.; ZAVALA, M. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 1103-1116, 2006.

VÁZQUEZ, L. Estudio aerobiológico y fenológico de una planta de interés económico: el olivo. 2000. Tese Doctoral. Universidad de Córdoba. 2000.

VILA, L. **Guía completa del cultivo del olivo**. Editorial De Vecchi. Barcelona. 2004.

VULETIN, G.; CUEVAS J.; GORETA, S.; PERICA, S. Pollen tube performance in assessment of compatibility in olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 36-43, 2014.

WREGE, M.; STEINMETZ, S.; GARRASTAZU, M.; REISSER JÚNIOR, C.; ALMEIDA, I.; HERTER, F.; CARAMORI, P.; RADIN, B.; MATZENAUER, R.; BRAGA, H.; PRESTES, S.; CUNHA, G.; MALUF, J.; PANDOLFO, C. Atlas climático da região sul do Brasil: estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, v. 1, p. 332, 2011.

WREGE, M.S.; FICK, E.F.; PANTANO, A.P.; OLIVEIRA, J. Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. **Rev. Bras. Frutic.; Jaboticabal**, v. 37, n. 3, p. 656-666, 2015.

WU-BIAO, W.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Sexual compatibility within and between olive cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnol**, v. 77, n. 6, p. 665-673, 2002.

XU, F.; KIRCHOFF, B.K.; Pollen morphology and ultrastructure of selected species of Magnoliaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 150, p. 140-153, 2008.

YAMAMOTO, L.F.; KINOSHITA, L.; MARTINS, F.R. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. **Acta Bot. Bras**, v. 21, n. 3, 2007.

ZADOKS, J.; CHANG, T.; KONZAK, C. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, n. 6, p. 415-421, 1974.

ZAMBON, L.; OLIVEIRA, L.; DA SILVA, R.; BIANCHINI, F.E.; OLIVEIRA, A. Storage of pollen and properties of olive stigma for breeding purposes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 2, p. 291-297, 2018.

ZARROUK, W.; HADDADA, F.M.; BACCOURI, B.; OUESLATI, I.; TAAMALLI, W.; FERNANDEZ, X.; LIZZANI-CUVELIER, L.; DAOUD, D.; ZARROUK, M. Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 81-88, 2008.

ZHANG, M.Y.; LU, L.; WORTLEY, A.H.; WANG, H.; LI, D.Z.; BLACKMORE, S. Evolution of angiosperm pollen: 4. Basal Eudicots1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 102, n. 1, p. 141-182, 2017.

ZHANG, Y.; STEINER, A.L. Projected climate-driven changes in pollen emission season length and magnitude over the continental United States. **Nat Commun. Mar 15**, v.13, n. 1, p.1234, 2022.

ZOHARY, D.; SPIEGEL-ROY, P. Beginnings of fruit growing in the Old World. **Science**, n. 187, p. 319-327, 1975.