

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Área de Concentração Fruticultura de Clima Temperado



Tese

Temperatura e ácido bórico afetam a polinização de oliveiras nas condições de clima temperado

Camila Schwartz Dias

Pelotas, 2023.

Camila Schwartz Dias

Temperatura e ácido bórico afetam a polinização de oliveiras nas condições de clima temperado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Agronomia (área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado).

Comitê de orientação

Orientador: Prof. Dr. Flávio Gilberto Herter

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias

Coorientador: Prof. Dr. Vagner Costa Brasil

Pelotas, 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541t Dias, Camila Schwartz

Temperatura e ácido bórico afetam a polinização de oliveiras nas condições de clima temperado / Camila Schwartz Dias ; Flávio Gilberto Herter, orientador ; Paulo Celso de Mello Farias, Vagner Costa Brasil, coorientadores. — Pelotas, 2023.

75 f. : il.

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

1. *Olea europaea*. 2. Germinação *in vitro*. 3. Boro. 4. Fenologia. 5. Temperatura. I. Herter, Flávio Gilberto, orient. II. Farias, Paulo Celso de Mello, coorient. III. Brasil, Vagner Costa, coorient. IV. Título.

CDD : 634.63

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Banca examinadora

Dr. Flávio Gilberto Herter, Universidade Federal de Pelotas (UFPel/FAEM)

Dra. Maria do Carmo Rasesa; Embrapa Clima Temperado

Dr. Mateus Pasa; Universidade Federal de Pelotas (UFPel/FAEM)

Dr. Jair Natchigal; Embrapa Clima Temperado

Dra. Georgina García Inza; INIA- Las Brujas - Uruguai

*Dedico este trabalho à minha família Elisabete,
Celso, Luiza, Marcelo e Luis pelo amor
incondicional, carinho e incentivo em todos os
momentos da minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço a vida, ao simples fato de existir e ter saúde.

A minha família Elisabete, Celso, Luiza e Marcelo, por acreditarem nos meus objetivos de vida, pelo orgulho creditado a minha trajetória, pelo carinho e apoio emocional em cada passo deste caminho.

Agradeço ao meu companheiro de vida Luis Roberto, por ser minha inspiração, meu “sol” e minha força para superar todos os obstáculos, por acreditar no meu trabalho e por me auxiliar na execução.

Agradeço ao meu orientador Flávio Herter pela confiança, pelos conhecimentos passados a mim, pela sua dedicação em viabilizar a execução deste trabalho, pelo tratamento humanizado e sensível durante estes quatro anos e meio.

Agradeço aos amigos que fizeram parte desta trajetória, deixando mais leve o ambiente de trabalho e auxiliando nas diferentes etapas de execução, em especial a Flávia Lourenço, Mariana Bicca, Tâmara Acosta, Gabriele Leivas, Andressa Schiavon, Juliana da Silva.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Fruticultura de clima temperado, pelas boas conversas e bom humor nas viagens técnicas e durante as disciplinas.

Agradeço a todos os funcionários do INIA-Las Brujas no Uruguai, em especial a David e Juan, pela recepção e pelo auxílio. A Paula Conde-Innamorato, por ter aceitado ser minha orientadora, por ter possibilitado a realização do primeiro capítulo desta tese, pela amizade e suporte durante a minha passagem.

Agradeço a Mercedes Arias e Vivian Severino por fazerem parte do comitê de orientação no Uruguai, pelos ensinamentos e pelo apoio na execução do trabalho.

Agradeço aos meus co-orientadores Paulo Celso de Mello e Vagner Brasil, por serem acessíveis, atenciosos e pela colaboração com o trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder bolsa de estudos.

Resumo

Dias Camila Schwartz. **Temperatura e ácido bórico afetam a polinização de oliveiras nas condições de clima temperado** 2023. 75f. Tese (Doutor em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Os impactos do ambiente em regiões não tradicionais de cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.), sobre as fases de polinização e a fixação dos frutos ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, este estudo teve como objetivo analisar as condições climáticas do Uruguai durante a estação de florescimento em diferentes cultivares de oliveiras no Uruguai e a ação da temperatura sob a polinização. Objetivou também, estudar a ação das baixas temperaturas sobre a polinização, assim como a identificação de cultivares sensíveis a baixas temperaturas e a resposta da aplicação do boro na germinação do pólen. No primeiro experimento, observou-se a fenologia de cinco cultivares de oliveira (Arbequina, Arbosana, Manzanilla, Picual e Koroneiki), foi testada a germinação *in vitro* e avaliado o comprimento do tubo polínico dos grãos de pólen sob as temperaturas de 0°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° e 40°C e a probabilidade de ocorrência de tais temperaturas. Verificou-se que o período de floração, no Uruguai, ocorre do dia 25 de setembro a 16 de novembro. A cultivar Manzanilla é a mais precoce e Arbosana a mais tardia. A temperatura de 10°C inibiu a germinação e comprimento do grão de pólen. As temperaturas de 15 a 20°C não são efetivas para a germinação e comprimento do tubo polínico e a temperatura ótima ocorre entre 25° e 30°C. No Uruguai durante a floração, há uma maior probabilidade de ocorrência de temperaturas de 10 a 20°C. No segundo experimento foi avaliada a germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel visando identificar as cultivares mais sensíveis às baixas temperaturas. Foi avaliada também a concentração de boro adequada (0, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹) para a germinação e o comprimento do tubo polínico de duas cultivares de oliveira sob a temperatura de 15°C. Concluiu-se que a temperatura de 10°C inibiu a germinação dos grãos de pólen das cultivares Galega e Panafiel e reduziu a germinação de Gran Vitale. Poucas horas de exposição a temperatura de 10°C é suficiente para reduzir a germinação e o comprimento dos grãos de pólen das cultivares sensíveis. A concentração de 100mg L⁻¹ é indicada para aumentar os parâmetros em baixa temperatura e as cultivares Arbequina e Koroneiki são tolerantes a baixa temperatura, enquanto que Gran Vitale, Galega e Panafiel são sensíveis.

Palavras-chave: *Olea europaea*, germinação *in vitro*, boro, fenologia, temperatura.

Abstract

DIAS Camila Schwartz. **Temperature and boric acid resulted in pollination of olive trees under temperate conditions** 2023. 75f. Thesis (Doctor in Agronomy)-Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The impacts of the environment in non-traditional olive growing regions (*Olea europaea* L.), on pollination stages and fruit setting are not yet fully understood. Thus, this study aimed to analyze the climatic conditions in Uruguay during the flowering season in different cultivars of olive trees in Uruguay and the action of temperature on pollination. It also aimed to study the action of low temperatures on pollination, as well as the identification of cultivars sensitive to low temperatures and the response of boron application on pollen germination. In the first experiment, the phenology of five olive cultivars (Arbequina, Arbosana, Manzanilla, Picual and Koroneiki) was observed, in vitro germination was tested and the pollen tube length of pollen grains was evaluated at temperatures of 0°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° and 40°C and the probability of occurrence of such temperatures. It was verified that the flowering period, in Uruguay, occurs from the 25th of September to the 16th of November. The Manzanilla cultivar is the earliest and Arbosana the latest. The temperature of 10°C inhibited germination and pollen grain length. Temperatures from 15 to 20°C are not effective for germination and pollen tube length and the optimum temperature occurs between 25° and 30°C. In Uruguay during flowering, there is a greater probability of occurrence of temperatures of 10 to 20°C. In the second experiment, the in vitro germination of pollen grains of Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega and Panafiel cultivars was evaluated in order to identify the cultivars most sensitive to low temperatures. Adequate boron concentration (0, 100, 200, 300 and 400 mg L⁻¹) for germination and pollen tube length of two olive tree cultivars at a temperature of 15°C was also evaluated. It was concluded that the temperature of 10°C inhibited the pollen grain germination of the Galega and Panafiel cultivars and reduced the germination of Gran Vitale. A few hours of exposure to a temperature of 10°C is enough to reduce germination and pollen grain length in sensitive cultivars. The concentration of 100mg L⁻¹ is indicated to increase the parameters at low temperature and the cultivars Arbequina and Koroneiki are tolerant to low temperature, while Gran Vitale, Galega and Panafiel are sensitive.

Key-words: *Olea europaea*, germination *in vitro*, boron, phenology, temperature.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Maiores produtores mundiais de azeitonas. Fonte: FAO, 2019.	15
Figura 2	Origem do azeite e da azeitona importada pelo Brasil em 2019. Fonte: FAO, 2019.	16
Figura 3	Inflorescência da oliveira. Fonte: Autoral (2019)	22

Capítulo 1

Figura 1	Estádios fenológicos BBCH 61, BBCH 65, BBCH 68. Fonte: INIA Uruguai, 2015.	37
Figura 2	Média das temperaturas máximas e mínimas (°C) das séries históricas 1998 - 2019 em Las Brujas- Uruguai e duração das fases BBCH 61, BBCH 65 e BBCH 68 correspondentes ao início da floração, plena floração e queda das pétalas, respectivamente, para cada cultivar. Pelotas, RS, 2022.	38
Figura 3	Germinação do grão de pólen em porcentagem (A) e comprimento do tubo polínico em μm (B), em resposta ao aumento da temperatura. Barras verticais indicam erro padrão ($n = 4$).	41
Figura 4	Probabilidade de ocorrência de temperaturas entre 0 - 40 ° C, obtidas no INIA- Las Brujas, Uruguai, com base na temperatura média horária para o período de 1998 - 2019, do dia 270 ao dia 320 correspondente à janela de floração da oliveira. As caixas representam o conjunto de dados para cada faixa de temperatura, e o ponto representa a média dos dados e a barra dentro da caixa mostram a mediana. As linhas acima e abaixo	42

representam os valores máximos e mínimos para cada faixa de temperatura. Os pontos acima representam outliers.

Capítulo 2

- Figura 1 Germinação in vitro de grãos de pólen (A) e comprimento do tubo polínico (B) de cinco cultivares de oliveira (Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel) sob quatro regimes de temperaturas (10, 15, 10-20 e 20 °C) em novembro de 2020. Pelotas, Rio Grande do Sul - Brasil. Letras distintas, representam diferença estatística para temperatura em cada cultivar, pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). 56
- Figura 2 Germinação de grãos de pólen in vitro de duas cultivares de oliveira submetidas a diferentes sob temperatura de 15 °C. Pelotas, novembro de 2020. Rio Grande do Sul- Brasil. Letras minúsculas distintas, indicam diferenças estatísticas entre cultivares na mesma dose pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) 59
- Figura 3 Comprimento do tubo polínico in vitro de duas cultivares de oliveira, sob temperatura de 15°C, submetidas a diferentes doses de ácido bórico no meio.. Pelotas, novembro de 2020. Rio Grande do Sul- Brasil. Letras minúsculas distintas, indicam diferenças estatísticas entre cultivares na mesma dose pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). 60

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1	Germinação do grão de pólen (%) e comprimento do tubo polínico (μm) de cinco cultivares de oliveira observadas no INIA Las Brujas - Uruguai, 2019.	37
----------	---	----

Capítulo 2

Tabela 1	Germinação de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico de cinco cultivares de oliveira sob incubação em diferentes temperaturas. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2020.	55
Tabela 1	Índice de estresse acumulativo (CSRI), em diferentes temperaturas (10, 15 e 10 - 20°C) em comparação com o controle (20 °C) observado para germinação e comprimento do tubo polínico de cinco cultivares de oliveira. Pelotas - RS, Brasil 2020.	57

Sumário

1 Introdução geral.....	
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Importância econômica da oliveira.....	15
2.2 A olivicultura no Brasil.....	17
2.3 Aspectos botânicos.....	18
2.3.1 Origem da oliveira.....	18
2.3.2 Família Oleaceae e gênero <i>Olea</i>	18
2.3.3 Descrição botânica.....	19
2.3.4 Floração da oliveira.....	23
2.3.5 Germinação do pólen.....	24
2.3.6 Fertilização com boro.....	26
3 Fatores climáticos.....	26
4 Referências bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 1.....	33
Baixas temperaturas na primavera podem afetar negativamente o rendimento de oliveiras.....	33
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados	37
Conclusão.....	45

Referencias bibliográficas.....	46
CAPÍTULO 2.....	50
Identificação de cultivares de oliveira sensíveis e tolerantes a baixa temperatura e o papel do boro na floração.....	50
Introdução.....	50
Materiais e Métodos.....	52
Resultados e discussão.....	54
Conclusão.....	62
Referências Bibliográfica.....	63
Considerações finais.....	66
Anexos.....	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie característica da região mediterrânea, conhecida mundialmente pela produção de azeitonas e de azeite de oliva (EL & KARAKAYA, 2009). O azeite é amplamente conhecido como a fonte de gordura na dieta mediterrânea, estando relacionado com vários efeitos benéficos para a saúde, devido à sua composição equilibrada em ácidos graxos e propriedades antioxidantes (BRITO, et al., 2019).

Os cultivos de oliveira se concentram entre as latitudes 30° e 45°, tanto no Hemisfério Norte como no Sul em locais onde, de modo geral, o clima é do tipo Mediterrâneo, caracterizado por verão seco e quente, ocorrendo baixas temperaturas no inverno, o que é de suma importância à obtenção de produções satisfatórias (COUTINHO e JORGE, 2013).

Com o aumento da demanda por azeite de oliva no mercado internacional, o cultivo se expandiu para novas regiões como Estados Unidos, Austrália e China, por apresentarem clima semelhante ao do Mediterrâneo. No entanto, existem olivais sendo cultivados em regiões não tradicionais, sob diferentes condições climáticas como no Brasil, Uruguai e Ilhas Canárias (COUTINHO, et al., 2009; TORRES, et al. 2017; CONDE-INNAMORATO, et al. 2019; MEDINA-ALONSO, et al., 2020).

O cultivo de oliveira no Brasil está em expansão e a produção está concentrada em duas áreas, a serra da Mantiqueira e o estado do Rio Grande do Sul. Este último se destaca como maior produtor nacional, com aproximadamente 6.000 hectares cultivados (SEAPDR, 2022). O estado do Rio Grande do Sul apresenta condições climáticas semelhantes ao Uruguai, país localizado ao Sul com a qual o estado faz divisa. A olivicultura naquele país, é uma atividade relativamente recente, a partir do ano de 2002 o cultivo aumentou consideravelmente passando de 500 para 9.000 hectares através de sistemas modernos, destinados à produção de azeite de oliva virgem (CONDE-INNAMORATO, et al., 2020).

A expansão da produção olivícola para regiões não tradicionais de cultivo exige a adaptação das cultivares às condições climáticas, especialmente precipitação, temperatura e umidade do ar (BORGES, et al., 2017). No Rio Grande do Sul e no Uruguai as médias anuais de volume de precipitação variam entre 1000 a 1900mm e 1100 a 1300mm, respectivamente, volume considerado muito acima do exigido pela cultura que está entre 650 - 800mm. Ademais, as chuvas não são bem distribuídas ao longo do ano e podem ocorrer volumes expressivos durante o florescimento que podem afetar drasticamente o fixação dos frutos (COUTINHO, et al., 2009; CONDE-INNAMORATO, et al., 2019).

A temperatura é uma das variáveis mais importantes para o desenvolvimento das culturas. Para todas as espécies de plantas, existe uma faixa que favorece o crescimento e o florescimento. Temperaturas fora da amplitude adequada, mesmo que por um tempo restrito de exposição, podem causar sérios danos. No caso da oliveira, temperaturas de 35 – 40°C afetam aspectos fisiológicos e a fase reprodutiva da cultura (KOUBOURIS, et al., 2019; KOUBOURIS, et al., 2009).

A ação das temperaturas sobre a fase reprodutiva é tema de muitas pesquisas, em virtude das previsões de aumento da temperatura ocasionado pelas mudanças climáticas nas regiões tradicionais de cultivo (BENLLOCH-GONZÁLEZ, et al., 2018). Hedhy (2011), ressalta que o estresse ocasionado tanto por alta temperatura quanto por baixa temperatura durante a fase de floração interfere diretamente sobre a produção e a rentabilidade das culturas.

A polinização das oliveiras é realizada pelo vento, e os grãos de pólen podem percorrer um longo caminho até chegar ao estigma que deve estar receptivo. Durante o percurso, os grãos de pólen estão sujeitos a ação dos ventos, chuvas, temperatura e umidade relativa. Estudos realizados demonstram que a temperatura ideal para germinação dos grãos de pólen é de 25°C (CUEVAS, et al. 1994) e temperaturas acima de 30°C reduzem drasticamente a germinação. No entanto, o efeito é dependente da a cultivar em estudo (KOUBORIS, et a., 2009; VULETINSELAK, et al., 2013).

A hipótese principal a ser testada é de que as condições climáticas do Rio Grande do Sul e do Uruguai possam interferir na germinação dos grãos de pólen das principais cultivares e que as cultivares menos sensíveis a estas condições seriam uma forma de reduzir problemas de fixação de frutos.

Este trabalho teve como objetivo determinar as temperaturas do Uruguai no período de floração das oliveiras: o efeito sobre a germinação dos grãos de pólen das principais cultivares do Uruguai e do Rio Grande do Sul, estabelecer um índice de estresse com relação às temperaturas no processo de germinação dos grãos de pólen e do crescimento do tubo polínico de diferentes cultivares e ainda, estudar o papel do boro no processo de germinação dos grãos de pólen sob baixas temperaturas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica da oliveira

A produção mundial de azeitonas se concentra em países com clima mediterrânico, destacando-se como os cinco principais produtores mundiais a Espanha (5.965 mil ton), Grécia (3.240 mil ton), Itália (2.194 mil ton), Marrocos (1.912 mil ton), Turquia (1.525 mil ton) (Figura 1). Somados, estes países representam aproximadamente 65% da produção mundial (FAO, 2019).

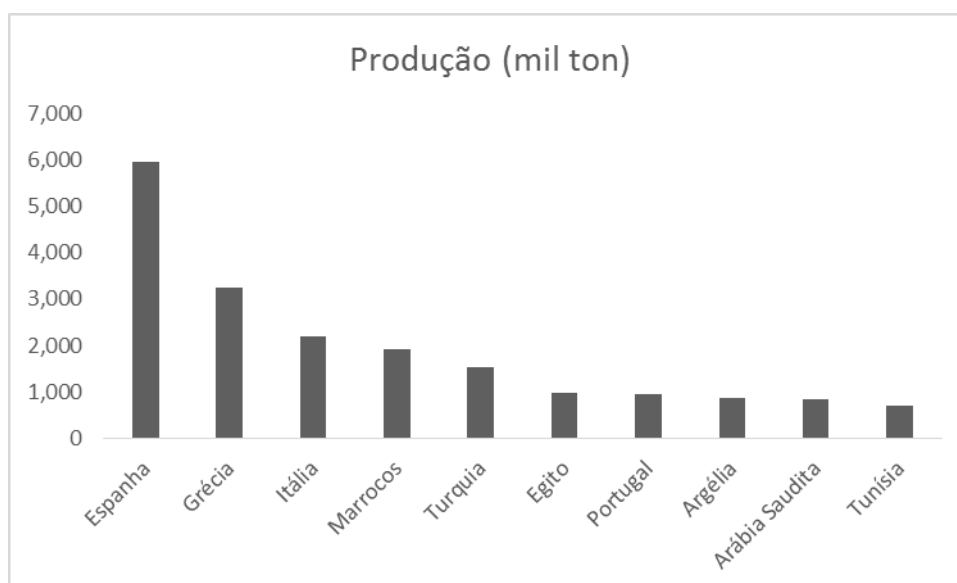


Figura 1. Maiores produtores mundiais de azeitonas. Fonte: FAO, 2019.

Dentre os países que mais importam azeitonas, os Estados Unidos detêm a 1ª posição, importando 305.000ton de azeite de oliva e 146.000ton de azeitonas de mesa, seguida pelo Brasil, que ocupa a 2ª posição neste ranking importando 59.500ton de azeite de oliva e 114.000ton de azeitonas de mesa (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2017).

A origem do azeite e das azeitonas comercializadas no Brasil é diversa, destacando-se os países: Portugal (66%), Espanha (16,5%), Argentina (6,7%), Chile (4,3%), Itália (4,1%), Tunísia (1,6%) e outros (Figura 2). Com relação a importação de azeite, 84,2% atende as exigências para a classificação de azeite extra virgem e 14,5% é classificado apenas como azeite de oliva (FAO, 2019).

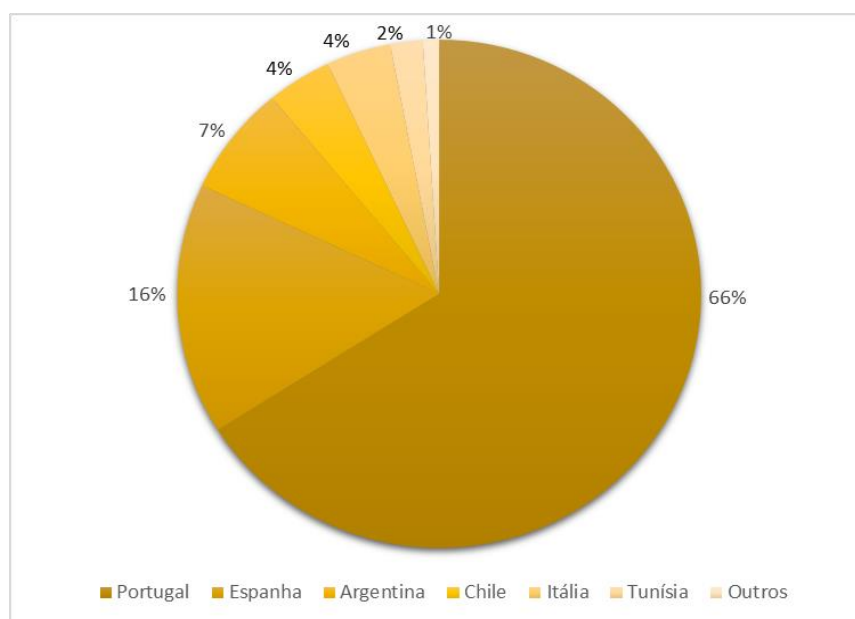


Figura 2. Origem do azeite e da azeitona importadas pelo Brasil em 2019.

Fonte: FAO,2019.

Os dados demonstram a importância econômica da cultura diante da grande dependência de importação de produtos e subprodutos da oliveira pelo Brasil. O cultivo de oliveiras no Brasil está em expansão, sendo os principais locais de cultivo a Serra da Mantiqueira, que abrange os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, e o estado do Rio Grande do Sul que

atualmente é o maior produtor nacional. Outros estados apresentam um cultivo ainda incipiente, é o caso dos estados de Santa Catarina, Paraná e Bahia (KIRST, 2019).

Nos últimos anos novas áreas de cultivo surgiram em diferentes países como África do Sul, EUA, Austrália, Argentina e Chile, as quais possuem um clima semelhante ao observado no Mediterrâneo. No entanto, ao redor do mundo, existem olivais sendo cultivados sob diferentes condições climáticas (HERRERA-CACERES et al., 2017).

2.2 A olivicultura no Brasil

A colonização por parte dos espanhóis no século XVI, trouxe a oliveira para as Américas. A cultura foi introduzida no México, em 1560, depois o cultivo se expandiu para o Peru, Califórnia, Chile e Argentina, onde ainda hoje se encontra uma das plantas trazidas durante a Conquista, a velha oliveira Arauco (COI, 2022).

No Brasil, as oliveiras foram introduzidas pela colonização portuguesa e difundiu-se por todas as regiões, porém não obteve sucesso em virtude das políticas praticadas na época. A oliveira era frequentemente observada próxima a igrejas e capelas durante o período colonial do Brasil, representando um vínculo com a religião. Porém, quando o país começou a praticar uma pequena comercialização do produto, a família real ordenou o corte das árvores em virtude da concorrência com os produtos da metrópole. Apenas em 1940, com a imigração europeia pós guerra, o cultivo reapareceu (TERRAMOTO et al. 2010).

O cultivo de oliveiras no Brasil está em expansão e está concentrado em dois locais de cultivo: a Serra da Mantiqueira e no estado do Rio Grande do Sul. A Serra da Mantiqueira é uma região que apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo e compreende os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, onde a área de produção é de aproximadamente 2.000 hectares de oliveiras (KIRST, 2019). O Estado de Minas Gerais, conta com aproximadamente 300 hectares, onde estima-se que 50% da área seja plantada com a cultivar

Arbequina, seguido pelas cultivares MGS GRAP5, MGS Mariense e Koroneiki, todas destinadas a produção de azeite (SILVA, et al. 2012).

A olivicultura no estado de São Paulo abrange aproximadamente 600 hectares, reunindo cerca de 82 produtores. Os olivais estão presentes em 49 municípios do estado, onde se pode destacar as cidades de Lorena, Silveiras, Cunha, Campos do Jordão, Espírito Santo do Pinhal, Santo Antônio do Pinhal, São Bento do Sapucaí e São Sebastião da Gramma. Na safra de 2021/2022, os olivais de São Paulo contribuíram com 360 toneladas de azeitonas e 45mil litros de azeite. As cultivares mais plantadas no estado são Arbequina, Frantoio, Picual, Koroneiki, Coratina e Arbosana (KIRST, et al. 2019; SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2022).

O estado do Rio Grande do Sul, localizado ao Sul do Brasil, é maior produtor de azeitonas do país com uma área de cerca de 5.986 hectares cultivados. De acordo com a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do estado, existem 321 olivicultores distribuídos em 108 municípios dentre eles, pode-se destacar os municípios de Encruzilhada do Sul, Canguçu, Pinheiro Machado, Caçapava do Sul, São Sepé, Cachoeira do Sul, Santana do Livramento, Bagé, Barra do Ribeiro e Sentinela do Sul. A maior parte dos municípios produtores está localizado na metade Sul do estado. O setor conta com cerca de 17 fábricas, conhecidas como lagares e produção estimada de 448,5mil litros de azeite e 70 marcas de azeite (SEAPDR, 2022). As principais cultivares encontradas nos olivais do estado são: Arbequina, Koroneiki, Picual, Arbosana, Frantoio, Coratina, Manzanilla e Galega.

2.3. Aspectos botânicos

2.3.1 Origem da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore característica da região mediterrânea, conhecida mundialmente pela produção de azeitonas e de azeite de oliva (EL & KARAKAYA, 2009). É uma das frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem. Seu cultivo remonta a 6.000 anos a.c. Originária de uma região geográfica que ocupa desde o Sul do Cáucaso até as altiplanícies do Irã,

Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se pelo Chipre até o Egito, povoando todos os países que margeiam o Mediterrâneo. A partir do século XV, com as viagens oceânicas de Colón, Magalhães e Juan Sebastián Elcano, passou a estender-se ao Novo Mundo (EMBRAPA, 2009).

2.3.2 Família Oleaceae e gênero Olea

A espécie pertence à família Oleaceae, que abrange 25 gêneros dos quais fazem parte aproximadamente 600 espécies distribuídas em clima temperado e tropical em diferentes regiões do mundo. No entanto a oliveira é a única espécie que produz frutos comestíveis. Essa espécie pertence ao gênero *Olea*, que inclui 33 espécies e nove subespécies. Seis destas subespécies formam uma subseção ou complexo *Olea*: *O. europaea*, *O. cuspidata*, *O. laperrinei*, *O. maroccana*, *O. cerasiformis* e *O. guanchica*. Este complexo estende-se pela Macronésia (*O. cerasiformis* e *O. guanchica*), Mediterrâneo (*O. europaea*), África (*O. maroccana*) e regiões asiáticas (*O. cuspidata*). A taxonomia reconhece uma estreita relação entre a oliveira cultivada e sua parente silvestre, admitindo duas variedades dentro da subespécie *Olea europaea*: *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* e *O. europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (RAPOPORT, et al. 2016).

2.3.3 Descrição botânica

Graças à sua estrutura xerofítica, desenvolve-se bem, mesmo em ambientes com verões longos, quentes e secos, e com baixos índices pluviométricos. É cultivada no sul da Europa, nos países mediterrâneos, como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia. A cultura expandiu-se para outros países, cujas características de clima são semelhantes às de países do sul da Europa, como Norte da África, América do Norte e América do Sul, além de alguns países da Ásia (ALBIN e VILAMIL, 2003).

A oliveira é uma árvore polimórfica de folhagem persistente, crescimento lento e grande longevidade. Geralmente, a altura da oliveira cultivada é mediana, oscilando entre 4 a 8m de altura, ainda que possam ser encontradas árvores com mais de 15 a 20m de altura com troncos de 1,5 a 2m de diâmetro. O sistema

radicular apresenta as funções de ancorar a planta, absorver água e nutrientes, sintetizar materiais orgânicos e armazenar nutrientes. A maior proporção de raízes está a uma profundidade de solo de 60 a 70cm. As raízes com calibre maior se desenvolvem nos primeiros 20cm, a partir da superfície. Quando o solo é pesado, as raízes fibrosas crescem próximas da superfície do solo e em solos de textura mais leve, o sistema radicular é extenso. O sistema radicular durante os primeiros 3 a 4 anos se desenvolve verticalmente e posteriormente, se desenvolve lateralmente (THERIOS, 2009).

Plantas jovens apresentam uma forte tendência em formar um tronco de eixo único. Ao longo do tronco, surgem brotações laterais provenientes de duas gemas laterais que estão presentes em cada nó. As ramificações oriundas das brotações das gemas laterais são distribuídas ao longo do tronco de forma dispersa ou irregular. Os ramos podem ser divididos em ramos primários ou principais, que formarão a estrutura principal da planta sendo inseridos diretamente no tronco e os ramos secundários, inseridos nos ramos primários, constituindo a copa da árvore (BACELAR et al., 2009; RAPOPORT, et al. 2016).

As gemas não apresentam estruturas morfológicas que permitam a sua distinção entre gemas vegetativas e reprodutivas. A diferenciação em gemas férteis é resultado de uma complexa combinação de fatores endógenos e exógenos, e poderá seguir um dos quatro caminhos: (1) desenvolvimento de uma inflorescência, (2) crescimento de uma brotação, (3) continuar dormente e (4) morte e abscisão (LAVEE, 1996; RAPOPORT, et al. 2016). Na oliveira, a indução floral para o próximo ano, ocorre 2 meses após a plena floração, provavelmente antes do endurecimento do endocarpo do frutos. Os eventos de produção de frutos para a safra do ano e o estímulo para a formação de gemas férteis que produzirão frutos na próxima safra ocorrem concomitantemente na planta. A diferenciação das gemas ocorre em duas etapas, a primeira fase é conhecida como estímulo indutivo e ocorre durante o verão sendo governada pelos fatores endógenos, enquanto que a segunda fase necessária seria durante o inverno, influenciada principalmente pelo acúmulo de frio. O processo é concluído se as

condições climáticas necessárias para cada uma das fases indutivas forem atendidas, em cada estação (ANDREINI, et al. 2008; RAPAPORT, et al. 2016).

As folhas são coreáceas, de coloração verde-acinzentada, mais clara na face inferior, persistentes, com aspecto lanceolado e dispostas de forma oposta. Cada folha cresce ao longo de dois anos e pode ter duração de até três anos (BACELAR, et al., 2009; CRUZ, et al., 2012).

As flores são radiadas e tetrâmeras, apresentam dois estames, ovário súpero, bicarpelar, sincárpico e são classificadas como hermafroditas. As flores são formadas no ano anterior à floração e são originadas das gemas localizadas nas axilas das folhas, de brotações novas. As gemas florais são pequenas, e compostas por 4-5 nós, cada um com dois primórdios foliares em posições opostas. Na oliveira, as flores hermafroditas são totalmente funcionais, ou seja, capazes de formar frutos, porém também podem ser formadas flores estaminadas. As flores estaminadas apresentam pistilo abortado e são incapazes de produzir frutos (BACELAR, et al., 2009; CRUZ, et al., 2012; REALE, et al. 2009). Estudos apontam que a competição por recursos interfere no abortamento do pistilo, também descrito como o termo andromonoicia, que indica a formação de flores perfeitas (hermafroditas) e estaminadas (ou seja, masculinas ou com abortamento do pistilo). Em oliveiras, a competição entre flores e frutos em desenvolvimento ocorre muito cedo, durante o florescimento e desenvolvimento do fruto e afeta tanto o abortamento do pistilo quanto a fixação dos frutos (ROSATI, et al., 2011). Outra limitação potencial para a fixação do fruto em oliveiras é o desenvolvimento anormal do óvulo, em que o saco embrionário não consegue se diferenciar (RALLO et al., 1981). Essas características tem um importante componente genético (variedades), mas também é fortemente influenciada por condições ambientais e nutricionais (FERNANDEZ-ESCOBAR, et al., 2008).

As flores são formadas em inflorescências de 1,5 a 4,0 cm de comprimento que se desenvolvem a partir das gemas laterais ou diretamente no ápice do caule (Figura 3). A panícula, como é denominada a inflorescência, tem um eixo central ou raque, no qual as flores individuais ou flores secundárias ao eixo, surgem em

uma série de pontos de ramificação simétricos. Uma inflorescência pode conter de 10 a 35 flores, das quais apenas uma ou algumas flores darão origem a frutos. O número de flores por inflorescência é influenciada pelo cultivar, pelas condições de crescimento, incluindo a posição da inflorescência na planta e brotação (RAPOPORT, et al. 2016).



Figura 3. Inflorescência da oliveira. Fonte: Camila Schwartz Dias (2019).

Os frutos são denominados drupas, são pequenos, com formato que varia de elipsoidal a globosos com pericarpo rico em lipídeos (BACELAR, et al., 2009; CRUZ, et al., 2012). Os frutos são utilizados para extrair o azeite e compõem a base da dieta Mediterrânea. A composição do azeite é principalmente formada por triglicerídeos e uma variedade de compostos em pequenas quantidades. Entre os glicerídeos, o azeite apresenta um alto teor de ácidos graxos e sobretudo, uma elevada proporção de ácidos graxos monoinsaturados. Os ácidos insaturados podem chegar a 85% de sua composição, devido ao alto teor de ácido oleico, que pode variar de 70 – 85% e outros ácidos graxos como linoleico e ácido palmítoleico. No caso das gorduras saturadas, estas correspondem a aproximadamente 14% da composição do óleo, basicamente devido aos ácidos

palmítico e esteárico. Quanto a outros compostos, representam menos de 2% da composição do óleo e grande parte deste grupo são os compostos fenólicos, embora também existam compostos lipofílicos como o α -tocoferol (vitamina E) (LOPEZ, et al. 2020)

Em todo o mundo existem mais de 200 variedades de oliveiras, sendo que, muitas vezes, variedades idênticas possuem nomes distintos dependendo da região em que são cultivadas (CABALLERO, 2012). As diferentes variedades de oliveira produzem frutos com características peculiares, com distintos tamanhos, sabores e composição (RYACHI, et al., 2011). Estes frutos conferem características distintas ao azeite produzido, ademais variações dependem de fatores relacionados ao cultivo (irrigação e fertilização), as práticas culturais (colheita e grau de maturação), fatores tecnológicos (pós-colheita e sistema de extração) e área geográfica de produção (altitude, latitude e características edáficas) (QARNIFA, 2019).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos publicados relatam preocupação com a produção de oliveiras em virtude da ação das mudanças climáticas, sobretudo na zona do Mediterrâneo. É esperado um aumento de 2-5°C na temperatura do ar para os próximos anos, além de eventos mais frequente e extremos como períodos de seca e ondas de calor para esta região (BENLLOCH-GONZÁLEZ, 2018).

2.3.4 Floração da oliveira

A floração na oliveira ocorre em inflorescências paniculadas que contém uma mistura de flores perfeitas (hermafroditas) e imperfeitas (estaminadas). As flores hermafroditas apresentam um pistilo que é composto por um grande estigma com estilete curto e ovário bilocular com quatro óvulos. O androceu, sistema reprodutor masculino, consiste em dois estames onde estão localizadas as anteras amarelas brilhantes, que estão ligadas a base por um curto filamento (RAPAPORT, et al. 2016). Nas flores estaminadas, o desenvolvimento do pistilo é falho em vários estágios de diferenciação do gineceu, que resulta em um órgão

não-funcional: um pistilo necrótico com estames funcionais (CUEVAS, et al. 1999; VULETIN SELAK, et al. 2012).

As características florais tradicionalmente consideradas importantes para a frutificação da oliveira são a relação entre o número de flores perfeitas e flores estaminadas e a porcentagem de flores perfeitas. Estas características diferem significativamente entre as cultivares, demonstrando uma estreita relação genética que controla o abortamento do pistilo, mas também podem ser influenciadas por condições ambientais, como temperatura, nutrição da planta, disponibilidade de água e competição interna por reservas quando há um grande número de flores. Além disso, flores que estão localizadas próximas ao ápice do pedicelo e no primeiro pedicelo tendem a formar flores hermafroditas, enquanto que flores no segundo pedicelo geralmente são estaminadas (FERNÁNDEZ-ESCOBAR, et al. 2008; LAVEE et al., 2002; VULETIN SELAK, et al., 2012; HAPAPORT, et al. 2016).

Nas oliveiras, as flores estaminadas aumentam a doação de pólen para fertilizar outras flores, sendo uma estratégia importante já que a polinização ocorre pelo vento. A polinização é influenciada pela velocidade do vento e pelas chuvas, além de sofrer com a alta temperatura ou ventos quentes, que podem causar a desidratação do pólen e do estigma, reduzindo a fertilização das flores (REALE, et al., 2006).

As cultivares de oliveiras expressam vários graus de auto-incompatibilidade e interincompatibilidade (RAPAPORT, et al. 2016). O grau de auto-incompatibilidade em oliveiras é influenciado por condições ambientais e varia de acordo com o local de plantio e de ano para ano. Estudos realizados recentemente, comprovam que a cultivar Arbequina, amplamente utilizada nos olivais brasileiros, é auto-incompatível e portanto, necessita cultivares polinizadoras. No estudo realizado por Sánchez-Estrada e Cuevas (2018), foi demonstrado que as melhores cultivares para polinizar Arbequina são as cultivares Picual e Manzanilla.

2.3.5 Germinação do grão de pólen

A compreensão do processo de fecundação pode reduzir problemas de auto-esterilidade em oliveiras. A compatibilidade entre cultivares deve ser observada já que a emissão de pólen em tempo diferente do período receptivo da cultivar comercial, pode levar ao menor sucesso reprodutivo,. Do contrário, uma maior coincidência na polinização cruzada seria mais efetiva. (CUEVAS, 1992; REALE, et al. 2006).

A frutificação depende de uma série de processos reprodutivos combinados ao longo da indução floral e dos processos ontogenéticos, floração e polinização, fase progâmica e desenvolvimento pós-zigótico do fruto. A fase progâmica envolve a chagada do pólen, adesão e germinação em estigmas receptivos, crescimento do tubo polínico através do pistilo até atingir um óvulo viável e fertilização. O período de polinização efetivo (EPP) é comumente utilizado para estudar a interação entre o pistilo e o pólen, envolvendo a longevidade do óvulo e o tempo necessário para que o crescimento do tubo polínico atinja o estigma e fecunde o óvulo (RIELLA, et al. 2022).

O pólen é produzido pelas anteras em ampla quantidade, variando entre 70.000 a 90.000 grãos de pólen por antera (ORLANDI, et al. 2003; FERRARA, et al. 2007). A viabilidade do grão de pólen e sua germinação são essenciais para garantir a fertilização. O estudo da viabilidade infere sobre a capacidade do grão de pólen germinar e crescer, no entanto os grãos de pólen podem não germinar no ambiente *in vitro* ou *in vivo*, se não houver condições adequadas. Vários métodos foram desenvolvidos para testar a viabilidade e outros parâmetros semelhantes, como a maturidade do pólen, germinabilidade, vigor, fertilidade. Quatro metodologias se destacam para avaliar a viabilidade: 1- colorações citoplasmáticas; 2- reações enzimáticas; 3- germinação; 4- fixação de frutos ou sementes. Sobre os métodos de germinação, os mesmos podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. A germinação *in vitro* de grãos de pólen sob condições apropriadas (temperatura, meio de cultura) é rápida, simples e apresenta uma boa correlação com a fixação de frutos e sementes, com resultados mais próximos da realidade (FERRARA, et al., 2007; MAZZEO, et al., 2014).

Estudos realizados recentemente demonstram a ação do clima sobre o desempenho do grão de pólen, sobretudo com relação à temperatura e umidade relativa. Os efeitos das altas temperaturas sobre os grãos de pólen tem sido foco das pesquisas dos últimos anos, resultado da preocupação com as mudanças climáticas nas principais regiões produtoras de oliveira, principalmente no Mediterrâneo (IOVANE, et al. 2021).

Temperaturas superiores a 30°C são prejudiciais para a germinação dos grãos de pólen de oliveira, no entanto esta resposta é variável em relação às diferentes cultivares. Com relação à umidade relativa, valores próximos a 20% aliados a temperaturas acima de 40°C são altamente prejudiciais à germinação dos grãos de pólen. A exposição de grãos de pólen a 36°C e a umidade relativa de 100% reduz a viabilidade dos grãos de pólen, tornando-os completamente inviável após 3 dias de exposição. A umidade relativa tem papel importante no tempo de viabilidade do pólen. De acordo com os estudos realizados por Iovane et al. (2021), grãos de pólen expostos à umidade relativa de 50%, apresentam elevada viabilidade tanto em altas temperaturas, quanto em baixa temperatura (VULENTIN SELAK, et al., 2013; KOUBOURIS, et al., 2009).

2.3.6 Fertilização através da utilização de boro

A oliveira deve receber doses adequadas de nutrientes, desde os estádios iniciais, para que não ocorra desequilíbrio entre o conteúdo mineral e o incremento de matéria seca, estimulando a formação de folhas saudáveis e, futuramente, de inflorescências, já que essas ocorrem nas axilas das folhas (BOURANIS et al., 2001; LIVRAMENTO & OLIVEIRA, 2006).

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

O boro afeta o crescimento do tubo polínico e portanto, a produção de frutos, e é indiretamente responsável pela ativação de enzimas desidrogenases, transporte de assimilados, ácidos nucléicos e regulação metabólica de certos hormônios vegetais (VISHEKAI et al. 2019). Muitos experimentos foram conduzidos em oliveiras os quais demonstram a importância da fertilização com B na produtividade de oliveiras (LARBI, et al., 2011), na qualidade das flores e na fixação dos frutos (PERICA, et al., 2002).

3. Fatores climáticos

As condições climáticas tem papel determinante no cultivo de oliveiras, sobretudo a temperatura, a precipitação e a umidade relativa pois estão diretamente relacionadas à resposta fenológica das plantas (GARRIDO, et al. 2021). A olivicultura apresenta alguns problemas importantes como a alternância de produção, traduzida pela drástica redução da produção seguida de um ano de boas colheitas, elevada produção de flores estaminadas e autoincompatibilidade na polinização. De todas as fases biológicas, a floração é a fase mais crítica (BONFIGLIO, et al. 2008).

O clima afeta praticamente todos os processos fisiológicos relacionados ao ciclo de vida das plantas. O início do processo produtivo é caracterizado pela formação das gemas florais durante o verão, a dormência no outono, a quebra da dormência no inverno e o florescimento do próximo verão. A superação da dormência ocorre somente quando as gemas são expostas a temperaturas frias, durante um período suficientemente longo. Quando o período de acúmulo de frio é incompleto, pode haver um atraso na quebra da dormência das gemas e da primeira floração, o que pode resultar na expansão do período de floração (BARRANCO, et al. 2008; AGUILERA, et al. 2014).

Durante a primavera, as oliveiras encontram condições climáticas adequadas para o processo de floração, polinização e frutificação. Para que haja o estímulo para o início da floração, é necessário que ocorra um aumento gradativo da temperatura a partir dos 16°C (BONFIGLIO, et al. 2008). As temperaturas ideais para esta fase estão no intervalo de 18-21°C e umidade

relativa de 60-80% e a precipitação deve estar no intervalo de 300- 750mm anuais (TAPIA, et al., 2003). De acordo com experiências de plantio nos países do mediterrâneo, a temperatura adequada para que ocorra a frutificação efetiva normal, não deve superar os 35°C e não deve ser inferior aos 25°C. As plantas, contudo, são capazes de suportar altas temperaturas no verão, próximas a 40°C, sem que os ramos e folhas sofram queimaduras. Porém, a atividade fotossintética começa a ser inibida quando a temperatura ultrapassa os 35 °C (COUTINHO, 2007).

A oliveira é mais sensível ao frio que outras espécies frutíferas. Contudo, ocorre um aumento gradual de tolerância, provocada pelas baixas temperaturas outonais, responsáveis pelo estímulo da planta à dormência. Assim, a oliveira chega a resistir a temperaturas pouco inferiores a 0°C. Pequenas lesões em brotos e ramos novos podem ocorrer, se a temperatura baixar, ficando entre 0°C e -5°C. Se a temperatura for inferior, até -10°C, podem ocorrer danos definitivos nos brotos e ramos. Abaixo de -10°C, a planta, como um todo, pode sofrer danos irreversíveis e morrer (NAVARRO; PARRA, 2008).

Na primavera, ocorre o desencadeamento do processo de florescimento, como resultado da saída da dormência. Existem etapas distintas desta fase – a de início, florescimento pleno, polinização, final de floração e frutificação efetiva. Nesta importante fase de desenvolvimento da planta, a temperatura diária deve ficar em torno de 20°C, a fim de que os processos metabólicos ocorram normalmente. A umidade relativa do ar, deve ficar entre 60- 80%. Caso contrário, a receptividade do estigma pode ser comprometida, principalmente se a umidade ficar abaixo de 50%. Nesta situação, o estigma pode durar menos de três dias, tempo insuficiente para formar o tubo polínico se desenvolva e chegue a fertilizar o óvulo. Por outro lado, se a umidade relativa for muito elevada, próxima de 100%, ocorre a hidratação do grão de pólen, que aumenta de peso e não pode ser levado a uma longa distância pelo vento (TAPIA et al., 2003).

O Zoneamento Edafoclimático da oliveira para o estado do Rio Grande do Sul, publicado pela EMBRAPA em 2009, classificou as áreas quanto à aptidão, riscos e limitações ao investimento, indicando as zonas com menores riscos

climáticos para produção de oliveiras no Estado (WREGE et al., 2009; FILLIPINI ALBA et al., 2014). De acordo com Alba et al. (2013), no Rio Grande do Sul as temperaturas durante o verão não ultrapassam os 40°C e no inverno, raramente atingem a temperatura limitante de 0°C e o clima da região é classificado como subtropical úmido Cfa, conforme Köppen. Durante o período de floração, que ocorre entre os meses de setembro a novembro, podem ocorrer volumes expressivos de precipitação que podem afetar negativamente a polinização e dispersão dos grãos de pólen, levando a uma baixa fecundação efetiva (COUTINHO, et al. 2009). Neste mesmo período, as temperaturas costumam estar próximas aos 15°C, porém existe uma ampla variação (ALBA et al. 2013).

Referências bibliográficas

- AGUILERA, F.; RUIZ, L.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B.; GALÁN, C.; OTEROS, J.; DHAB, A. B.; MSALLEM, M.; ORLANDI, F. Heat accumulation period in the Mediterranean region: phenological response of the olive in different climate areas (Spain, Italy and Tunisia). **International Journal of Biometeorology**, v. 58, p: 867-876. 2014.
- ANDREINI, L.; BARTOLINI, S.; GUIVARCH, A.; CHRIQUI, D.; VITAGLIANO C. Histological and immunohistochemical studies on flower induction in the olive tree (*Olea europaea* L.). **Plant Biology** V.10, p. 588-595, 2008.
- ALBA, J. M. F.; FLORES, C. A.; WREGE, M. M. S. Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul. Brasília, DF: **Embrapa**, 2013.
- ALBIN A.; VILLAMIL J. **Aceite de oliva: tradicional sabor mediterrâneo, rejuvenecido en tierras Uruguayas**. Montevideo: Editora de Vecho, 2003. p. 25-28.
- BACELAR, E. et al. Botânica e Morfologia da Oliveira. In: RODRIGUES, M. A.; CORREIA, C. M. (Ed.). **Manual da safra e contra safra do olival**. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2009. p. 9-16.
- BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. El cultivo del Olivo. **Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa**, Sevilla. 8 ed. 2008.
- BENLLOCH-GONZÁLEZ, M., LUCAS-SÁNCHEZ, R., BENLLOCH, M., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Na approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. **Scientia Horticulturae**. V. 240, p. 405-410. 2018.
- BONFIGLIO, T.; ORLANDI, F.; SGROMO, C.; ROMANO, B.; FORNACIARI, M. Influence of temperature and rainfall on timing of olive (*Olea europaea*) flowering in southern Italy. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. Vol. 36, p. 59-69, 2008.
- BORGES, T. H.; PEREIRA, J. A.; CABRERA-VIQUE, C.; LARA, L.; OLIVEIRA, A. F.; SEIQUER, I. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. **Food Chemistry**. V. 215, p. 454 – 462, 2017.

BRITO, C.; DINIS, L. T.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; CORREIA, C. M. Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. **Plants**. V. 87, p. 232. 2019.

CABALLERO, J. M. Variedades de oliveiras mais plantadas nos principais países produtores do mundo. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.). Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte: **EPAMIG**, 2012. Cap. 6. p. 159- 192.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. Economía: cifras aceite de oliva, aceitunas de mesa. Available in: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>> Accessed in: 31 out. 2018.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. Olive world: the olive tree. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-tree/> Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

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

COUTINHO, F. E.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). **EMBRAPA CLIMA TEMPERADO**, Pelotas, 2009.

CUEVAS, J J (1992) Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y fructificación de cultivars de olivo (*Olea europaea* L.). PhD Thesis, University of Córdoba, Spain.

CUEVAS, J.; RALLO, L.; RAPOPORT, H. Initial fruit set at high temperature in olive, *Olea europaea* L. **Journal of Horticultural Science**. V. 69, 1994.

CRUZ, M. C. M.; OLIVEIRA, D. L.; CHALFUN, N. N. L.J. Botânica, anatomia e ecofisiologia. In: OLIVEIRA, A. F.(Org.). Oliveira no Brasil: tecnologia de produção. Belo Horizonte: **EPAMIG**, 2012. Cap. 5. p. 118-157.

EL, S.N.; KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, v.67, n.11, p.632-638, 2009.

FAO, 2019. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso em: 28 de maio de 2021.

FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; URQUIZA, A. O.; PRADO, M.; RAPOPORT, H. F. Nitrogen status influence on olive tree flower quality and ovule longevity. **Environmental and experimental botany**, v.64, 113- 119, 2008.

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

GARRIDO, A.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; VÁZQUEZ-RUIZ, R. A.; RODRÍGUEZ-RAJO, J. F.; AIRA, M. J. Reproductive biology of olive trees (*Arbequina* cultivar) at the Northern limit of their distribution areas. **Forests**, v. 204, 2021.

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and experimental botany**. V. 74, p. 9 – 16, 2011.

HERRERA-CÁCERES, C.; PÉREZ, F. G.; ÁLVAREZ, E. E.; CANDIA, A. V. Optimization of the harvest planning in the olive oil production: A case study in Chile. **Computers and Electronics in Agriculture**, 141, 2017, p.147-159.

IOVANE, M.; CIRILLO, A.; IZZO, L. G.; DI VAIO, C.; ARONNE, G. High temperature and humidity affect pollen viability and longevity in *Olea europaea* L. **Agronomy**. V. 12. 2022.

KIRST, B. B.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro das oliveiras 2019**. Editora Gazeta Santa Cruz, 2019. 56p.

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

KOUBOURIS, G.; LIMPERAKI, I.; DARIOTI, M.; SERGENTANI, C. Effects of various winter chilling regimes on flowering quality indicators of Greek olive cultivars. **Biologia Plantarum**. V. 63, p. 504-510, 2019.

LAVEE, S. Biology and physiology of the olive. In: **Word Olive Encyclopaedia. International Olive Oil Council**, Madrid, Spain, p. 61- 110. 1996.

LOPEZ, JIMENEZ, C., CARPENA, M., LOURENÇO-LOPES, C.; GALLARDO-GOMEZ, M.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. **Foods**, v. 9, p.1040. 2020.

MAZZEO, A.; PALASCIANO, M.; GALLOTTA, A.; CAMPOSEO, S.; PACIFICO, A.; FERRARA, G. Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars as affected by 'on' and 'off' years. **Scientia Horticulturae**. V. 170, p. 89-93, 2014.

MEDINA-ALONSO, M. G.; NAVAS, J. F.; CABEZAS, J. M.; WEILAND, C. M.; RÍOS-MESA, D.; LORITE, I. J.; LEÓN, L.; ROSA, R. Differences on flowering phenology under Mediterranean and Subtropical environments for two representative olive cultivars. **Environmental and experimental botany**. V. 180, 2020.

ORLANDI, F.; FERRANTI, F.; ROMANO, B.; FORNACIARI, M. Olive pollination: Flowers and pollen of cultivars of *Olea europaea*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. V. 31, p. 159-168, 2003.

SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; CUEVAS, J. 'Arbequina' olive is self-incompatible. **Scientia Horticulturae**. V. 230, p. 50-55. 2018.

SEAPDR, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>. Acesso em: 16 de dezembro de 2022.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: https://www.agricultura.sp.gov.br/en/b/evento-de-oliveira-em-campinas-ressalta-producao-paulista-de-azeite?p_l_back_url=%2Fen%2Fbusca%3F_com_liferay_portal_search_web_search_bar_portlet_SearchBarPortlet_INSTANCE_templateSearch_formDate%3D1671550411947%26q%3Dolivicultura%26_com_liferay_portal_search_web_search_bar_portlet_SearchBarPortlet_INSTANCE_templateSearch_emptySearchEnabled%3Dfalse%26_com_liferay_portal_search_web_search_bar_portlet_SearchBarPortlet_INSTANCE_templateSearch_scope%3D. Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

SILVA, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ZAMBON, C. R. Caracterização agrônômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2012. V.42.

TAPIA, F., IBACACHE, A., & ASTORGA, M. Requerimientos de clima y suelo. Capítulo I. **Manual del cultivo del olivo**. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministério da Agricultura, Centro Regional de Investigación Intihuasi. La Serena, Chile. Boletín INIA N° 101, 2003, p.11- 20 e 128p.

TERAMOTO, J.R.S; BERTONCINI, E.I.; PRELA-PANTANO Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. 2010. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm. Acesso em: 20 de dezembro de 2022.

THERIOS, I. N. Olives. **CABI**, Wallingford, UK. Vol. 18. 2009.

TORRES, M.; PIERANTOZZI, P.; SEARLES, P.; ROUSSEAU, M. C.; GARCÍA-INZA, G.; MISERERE, A.; BODOIRA, R.; CONTRERAS, C.; MAESTRI, D. Olive cultivation in the Southern hemisphere: flowering, water requirements and oil quality responses to new Crop environments. **Front. Plant. Sci.** 8, 1830, 2017.

RALLO, L.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. Influence of cultivar and flower thinning within the inflorescence on competition among olive fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. V.110, p. 303-308. 1985.

RALLO, L.; MARTIN, G. C.; LAVEE, S. Relationship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. V. 106, 1981.

RAPOPORT, H. F.; FABBRI A.; SEBASTIANI, L. Olive biology in RUGINI, E.; BALDONI, L.; MULEO, R.; SEBASTIANI, L. The Olive Tree Genome, **Springer International**, Cham, Switzerland (2016), pp. 13-25

REALE, L.; SGROMO, C.; BONOFIGLIO, T.; ORLANDI, F.; FORNACIARI, M.; FERRANTI, F.; ROMANO, B. Reproductive biology of olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars. **Sexual Plant Reproduction**, v. 19, p.151-161. 2006.

REALE, L. SGROMO, C.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S.; ORLANDI, F.; FORNACIARI, M.; FERRANTI, F.; ROMANO, B. Morphological and cytological development and starch accumulation in hermaphrodite and staminate flowers of olive (*Olea europaea* L.). **Sex Plant Reprod.** V.22, p 109-119, 2009.

RIELAA, V.; BORGES, A.; ARIAS-SIBILLOTTE, M.; SPERONI, G.; SPERANZA, P. The effective pollination period of the olive cultivar 'Arbequina' (*Olea europaea* L.) in a non-traditional production region. **South African Journal of Botany**. V. 151, p. 246-254, 2022.

ROSATI, A.; CAPORALI, S.; PAOLETTI, A.; FAMIANI, F. Pistil abortion is related to ovary mass in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v.127, p. 515- 519. 2011.

RYACHI, M. E.; et al. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: hydrophilic phenols a key factor for virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113. p. 678- 691, 2011.

VISHEKAI, Z. R.; SOLEIMANI, A.; FALLAHI, E.; GHASEMNZHAD, M.; HASANI, A. The impact of foliar application of boron nano-chelated fertilizer and boric acid on fruit yield, oil content, and quality attributes in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**. V. 257, 2019.

VULETIN SELAK, G.; PERICA, S.; GORETA BAN, S.; BUCAN, L.; POLJAK, M. Flower sterility and the germination ability of pollen as genetic traits of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars grown in Croatia. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. V. 87, p. 237-242. 2012

VULETIN SELAK, G.; PERICA, S.; BAN, S. G.; POLJAK, M. The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**. V. 156, p. 38- 46, 2013.

QARNIFA, S. E. Effect of maturity and environmental conditions on chemical composition of olive oils of introduced cultivars in Marocco. **Journal of Food Quality**, 2019.

CAPÍTULO 1

Baixas temperaturas durante a primavera afetam negativamente o rendimento de oliveiras

Introdução

Os fatores climáticos atuam diretamente no desenvolvimento das espécies cultivadas, determinando sua fenologia e produtividade. A maior parte da alimentação humana é resultado da reprodução sexual das plantas, ou seja, da fertilização das flores. Os fatores climáticos, principalmente a temperatura, desempenham um papel importante no desenvolvimento das fases fenológicas de muitas espécies, onde uma mudança na temperatura ambiental pode afetar negativamente o desenvolvimento dos botões florais e, conseqüentemente, o período de floração (AGUILERA et al., 2014). A fase reprodutiva é mais sensível ao efeito das altas e baixas temperaturas durante e após a polinização os efeitos sobre as plantas, nesta fase, podem variar com a intensidade do estresse térmico, bem como com o tempo de exposição e com a espécie em estudo (HEDHLY, 2011).

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie tradicionalmente cultivada no Mediterrâneo, cujo clima é uma transição entre os climas temperado e tropical. Este clima é caracterizado por inverno úmido (65% das chuvas ocorrem entre novembro e dezembro) e verões muito secos, com precipitação média anual de 400 a 900 mm. As temperaturas do inverno são amenas, variando de 6° a 13°C no mês mais frio. Nos meses do verão, são observadas altas temperaturas, com médias variando entre 25° e 28°C durante o mês mais quente. Na região do mediterrâneo, o aumento da frequência de eventos climáticos extremos, durante fases específicas do desenvolvimento da planta, como altas temperaturas durante o período de floração, reduzem a frutificação e o rendimento em algumas culturas (MORIONDO et al., 2008; VULETIN SELAK et al., 2013).

O cultivo da oliveira se expandiu para novas regiões com clima semelhante ao mediterrâneo, como África do Sul, Estados Unidos, Austrália, Argentina e Chile, e também para outras regiões com clima muito diferente, como China, Brasil e Uruguai, que apresentam temperaturas e regimes de precipitação distintos (HERRERA-CÁCERES et al., 2017; TORRES et al., 2017). O Uruguai é um país localizado na América do Sul, e o cultivo de oliveiras neste país ocupa uma área de aproximadamente 10.000 hectares (CONDE-INNAMORATO et al., 2019). O clima é caracterizado como temperado-úmido, com chuvas acima de 1.100 mm anuais e temperatura média anual de 17,7 °C. No entanto, os dados históricos mostram uma grande variabilidade entre os anos, com médias máximas e mínimas anuais de 22,6°C e 12,9°C, respectivamente (CASTAÑO et al., 2011).

Estudos anteriores demonstraram a relação entre a temperatura e a germinação dos grãos de pólen da oliveira. A faixa de temperatura adequada para germinação ocorre entre 20 – 30°C; no entanto, essa resposta varia dependendo da cultivar (VULETIN SELAK et al., 2013). Vários trabalhos demonstram como as altas temperaturas, especialmente acima de 40°C, inibem ou afetam negativamente diversos aspectos da polinização e fertilização das flores. No entanto, há pouca informação sobre a germinação do pólen sob condições climáticas diferentes das encontradas no Mediterrâneo, especialmente sob temperaturas mais baixas (KOUBOURIS et al., 2009).

Existem fatores limitantes no momento da frutificação nas condições climáticas do Uruguai, pode levar a problemas como altas taxas de alternância de produção (CONDE-INNAMORATO et al., 2019). Assim, os objetivos desta pesquisa foram: 1) avaliar a fenologia de cinco cultivares de oliveira; 2) estudar o efeito da temperatura na germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico '*in vitro*' das cultivares Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Picual e Manzanilla, e 3) analisar a probabilidade de ocorrência de determinadas faixas de temperatura, a partir de uma série histórica de dados durante o período de 1998 a 2019, registradas no INIA Las Brujas, Uruguai.

Materiais e Métodos

Local e material vegetal:

A pesquisa foi realizada na estação experimental INIA Las Brujas - Uruguai (34°40' S; 56°20' W; altitude 21 m). Foram utilizadas oliveiras das cultivares Arbequina, Manzanilla e Picual com dezessete anos e de Arbosana e Koroneiki com dez anos, plantadas no espaçamento de 6m entre linhas e 4m entre árvores. O solo do local possui horizonte A com textura fina máxima de 50 cm. Possui 2,5% de matéria orgânica e pH de 6,5; correspondente ao solo Udifluent na classificação do USDA (DURÁN et al., 2006). As plantas eram mantidas sob fertirrigação.

Germinação do pólen

As inflorescências foram coletadas no estágio fenológico 59 BBCH, caracterizado por uma mudança de cor da corola de verde para branco (SANZ CORTÉS et al., 2002). A escolha desse estágio fenológico foi feita para garantir que os grãos de pólen avaliados fossem da cultivar em estudo; sabendo que nas condições climáticas do Uruguai, o pólen de 'Arbequina', 'Picual' e 'Coratina' é viável quando a corola apresenta coloração verde, antes da antese (SPERONI et al., 2021). Aproximadamente 20 inflorescências de cada cultivar foram coletadas da porção final de ramos produtivos, localizadas no terço médio da copa, no período da manhã (9:00 – 10:00h). Foram transportadas em placas de Petri para o laboratório, onde foram colocadas em placa de Petri sobre um papel de filtro umedecido com 1000 µL de água destilada e armazenadas por 48 horas, a temperatura ambiente, para permitir a abertura das flores e liberação dos grãos de pólen. Após, as placas contendo as inflorescências abertas foram cuidadosamente agitadas para liberar os grãos de pólen das anteras.

O meio de cultura utilizado foi o mesmo descrito por Viti et al. (1990), com adição de 100 ppm de ácido bórico meio base. Após o preparo, o meio de cultura foi autoclavado sob pressão de 1,5 atm, por 30 minutos. Em seguida, foi transferido para placas de Petri esterilizadas (aproximadamente 10 ml de meio de cultura por placa). Posteriormente, foram adicionados 1000 µL de água destilada à placa de Petri contendo os grãos de pólen e, com o auxílio de uma micropipeta,

foram retirados 50 μ L e colocados em meio de cultura. Em seguida, as placas de Petri foram fechadas com filme plástico para evitar trocas gasosas do meio externo.

Para verificar o efeito da temperatura, placas contendo grãos de pólen foram submetidas às temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 40°C. As amostras para o tratamento à temperatura de 40°C, foram armazenadas em estufa de circulação forçada de ar, por 24 horas enquanto as placas dos demais tratamentos foram armazenadas em câmara incubadora, pelo mesmo tempo.

A avaliação do número de grãos de pólen germinados e do comprimento do tubo polínico foi realizada em microscópio modelo Olympus® BH2, com aumento de 20 x 0,40. Foram contados cinquenta grãos de pólen por repetição, totalizando 150 grãos de pólen por tratamento, sendo considerados germinados aqueles que apresentaram comprimento do tubo polínico igual ou superior ao seu diâmetro. Para avaliação do comprimento do tubo polínico foi utilizado o software DinoCapture®, no qual foram selecionados três grãos de pólen, por repetição, e verificados seus comprimentos.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi um fatorial, inteiramente casualizado, dois fatores (cultivar e temperatura) e três repetições. Os tratamentos consistiram em cinco cultivares de oliveira (Koroneiki, Arbosana, Arbequina, Manzanilla e Picual) e seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 40°C).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software R (2019). Os dados expressos em porcentagem foram transformados por arcsin [raiz quadrada ($n + 1$)] e, em seguida, submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Caso essa interação entre os fatores (temperatura e cultivar) não fosse significativa, considerou-se o efeito dos fatores principais. O efeito da temperatura foi analisado por regressão polinomial e as médias dos cultivares foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Clima e fases fenológicas

A fenologia das cultivares 'Koroneiki' e 'Arbosana' foi avaliada a partir de um banco de dados contendo registros de nove anos. A escala fenológica

utilizada foi a de Sanz-Cortés et al. (2002), onde foram avaliados os estádios BBCH 61, BBCH 65 e BBCH 68, para caracterizar o início da floração (10% de flores abertas), plena floração (pelo menos 50% de flores abertas) e o final da floração (maioria das pétalas caídas), respectivamente (Figura 4). As avaliações foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Conde-Innamorato et al. (2019). Para a fenologia das cultivares 'Arbequina', 'Manzanilla' e 'Picual', foram utilizados os resultados da pesquisa, que realizou a avaliação por um período de dez anos. As datas foram consideradas utilizando o calendário juliano, a partir de 1º de janeiro e apresentadas nos gráficos, como dia do ano (DOI).



Figura 1. Estádios fenológicos BBCH 61, BBCH 65, BBCH 68. Fonte: INIA Uruguai, 2015.

Para calcular a probabilidade de ocorrência de temperaturas entre 0 e 40°C, foi utilizado um conjunto de dados de temperatura média horária, de 26 de setembro de 1998 a 15 de novembro de 1998 – 2019. A temperatura horária registrada foi classificada em intervalos: 0-5°C, 5-10°C, 10-15°C, 15-20°C, 20-25°C, 25-30°C, 30-35°C e 35-40°C. O número de vezes que a temperatura permaneceu dentro da faixa observada, para cada hora e dia, foi relacionado ao número de anos (22 anos). Assim, foi calculada a probabilidade horária de ocorrência da faixa de temperatura observada. Os dados foram plotados em um gráfico de caixa para representar a probabilidade para cada intervalo de temperatura.

Resultados:

1. Estádios fenológicos

Os registros fenológicos de Koroneiki e Arbosana por 9 anos permitiram o estimar o período de floração. A diferença entre a data de início da floração e a data do de queda das pétalas foi de 35 para a cultivar Koroneiki e 34 dias para Arbosana. Houve variações nas datas de início do início da floração (BBCH 61), plena floração (BBCH 65) e queda das pétalas (BBCH 68)(Figura 1). Verificou-se que Manzanilla iniciou o florescimento e floração antes das demais cultivares e sua data mais tardia foi no dia 268 do ano (DOY), oito dias antes da cultivar 'Arbequina'. No entanto, a fase de plena floração total e queda das pétalas é semelhante às demais cultivares. Arbequina possui uma janela de floração que pode ocorrer do dia 276 (DOY) ao dia 315 (DOY), e o estágio de plena floração é menor em relação às outras cultivares, totalizando 21 dias. As pétalas caem a partir do dia 307 (DOY), seis dias antes de Manzanilla e Koroneiki.

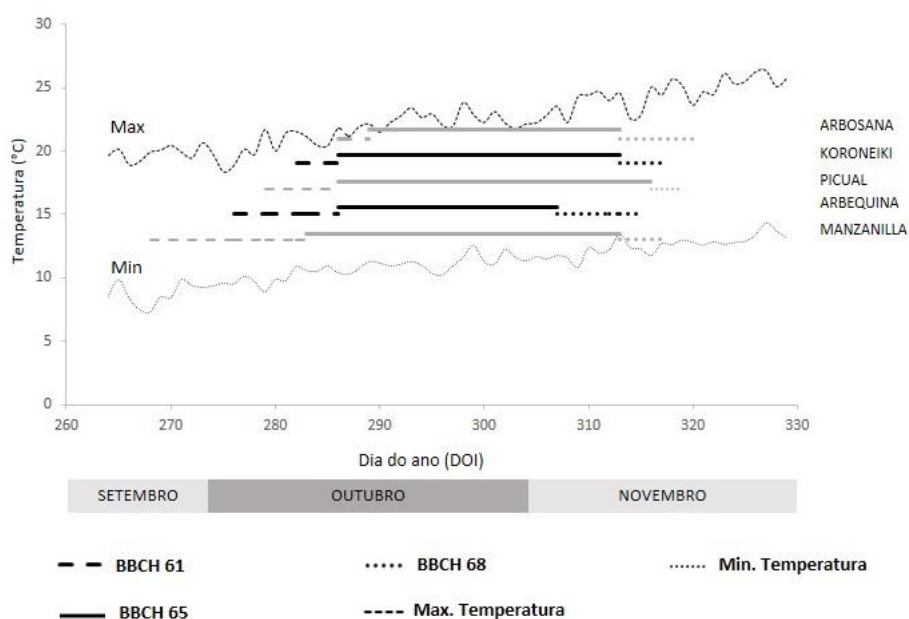


Figura 2. Média das temperaturas máximas e mínimas (°C) das séries históricas 1998 - 2019 em Las Brujas- Uruguai e duração das fases BBCH 61, BBCH 65 e BBCH 68 correspondentes ao início da floração, plena floração e queda das pétalas, respectivamente, para cada cultivar. Pelotas, RS, 2022.

O início da plena floração em Picual ocorreu concomitantemente com as cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki; no entanto, esse período pode se

estender do dia 283 (DOI) ao dia 316 (DOI). A cultivar Picual é a última a ultrapassar o período de plena floração, e sua janela de ocorrência para este período é de 30 dias, mesma quantidade de dias encontrada em Manzanilla, para o mesmo período. Arbosana é a última a iniciar o período de floração, apenas no dia 286 (DOI), enquanto Arbequina e Manzanilla podem iniciar nos dias 276 (DOI) e 268 (DOI), respectivamente. Seu período de plena floração coincide com o das demais cultivares, mas o período de queda das pétalas é mais longo e pode ocorrer do dia 313 (DOI) ao dia 320 (DOI). A Koroneiki é a penúltima cultivar a iniciar a floração, a partir do dia 282 (DOI). Entretanto, o período de plena floração ocorre concomitantemente com as demais cultivares, podendo ocorrer do dia 286 (DOI) ao dia 313 (DOI).

A partir dos dados de temperatura mínima e máxima, durante todo o período de floração, observou-se que houve variação entre 7° - 15°C para a temperatura mínima e 18° - 25°C para a temperatura máxima. Durante a fase inicial da abertura floral e período de plena floração, as temperaturas mínimas foram de aproximadamente 10°C. A temperatura máxima verificada no estágio de plena floração foi próxima a 20°C, não chegando a 25°C para todas as cultivares em estudo (Fig. 1).

2. Germinação do pólen e crescimento do tubo

Não houve interação significativa entre os fatores cultivar e temperatura, por isso se avaliou o efeito simples dos fatores. A porcentagem de germinação dos grãos de pólen e o comprimento do tubo polínico variaram entre as cultivares analisadas (Tabela I). Constatou-se que Picual apresentou porcentagem 9% menor de germinação do grão de pólen (20,56%) diferindo estatisticamente das cultivares Koroneiki (29,56%) e Arbequina (29,22%), e 8% menor em relação à Arbosana (28,44%). Para a variável comprimento do tubo polínico, as cultivares Koroneiki, Arbosana, Arbequina e Manzanilla não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com valores de 116,93; 117,59; 98,26 e 101,62 µm, respectivamente. Houve diferença estatística para a 'Picual', que diferiu da 'Arbosana' (83,86 e 117,59 µm respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Germinação do grão de pólen (%) e comprimento do tubo polínico (µm) de cinco cultivares de oliveira observadas no INIA Las Brujas - Uruguai, 2019.

Cultivar	Germinação pólen (%)	Comprimento do tubo polínico (µm)
Koroneiki	29.56 a*	116.93 ab
Arbosana	28.44 ab	117.59 a
Arbequina	29.22 ab	98.26 ab
Manzanilla	22.79 bc	101.62 ab
Picual	20.56 c	83.86 b
p value	< 0.001	0.031

* As médias separadas por letras diferentes dentro das colunas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A temperatura interferiu na germinação e crescimento do tubo polínico, correspondendo a um ajuste quadrático de R^2 de 0,8973 e 0,9846, respectivamente. O ponto máximo de germinação, calculado por meio da equação da curva, foi obtido na temperatura de 26,66°C, onde a germinação atingiu 43,38%. Para o tratamento na temperatura de 40°C, a porcentagem de germinação foi de apenas 15% e para a temperatura de 10°C, não houve germinação (Fig. 2A).

O crescimento máximo do tubo polínico ocorreu na temperatura de 28,22 °C atingindo um comprimento de 133,44 µm. O comprimento do tubo polínico foi significativamente maior a 25 °C e 30 °C quando comparado com as temperaturas de 15 °C e 40 °C. A 20°C, os valores foram intermediários, não sendo verificada diferença estatística. Na temperatura de 10 °C não foi possível estimar o crescimento do tubo polínico, pois não houve germinação (Fig. 2B).

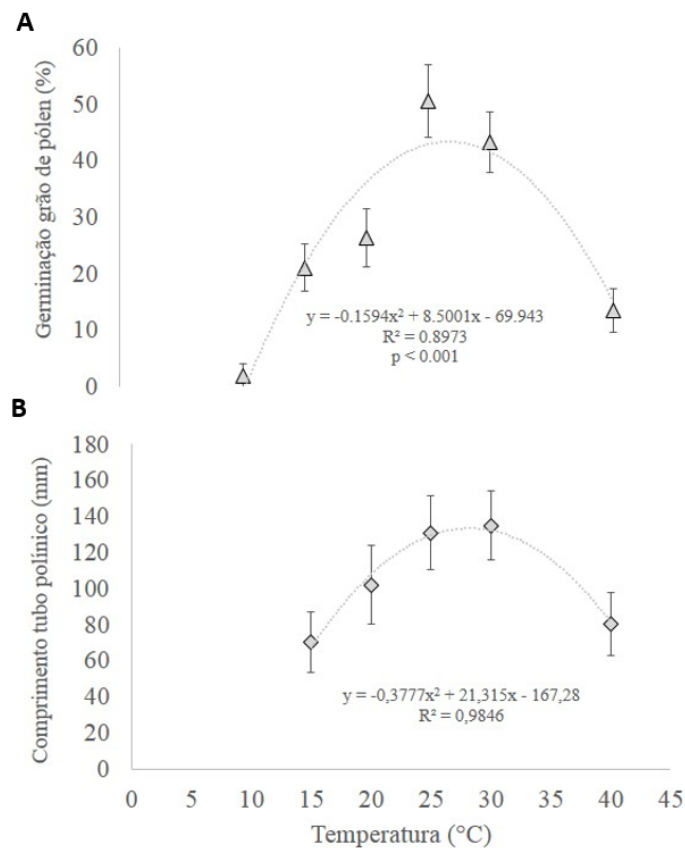


Figura 3: Germinação do grão de pólen em porcentagem (A) e comprimento do tubo polínico em μm (B), em resposta ao aumento da temperatura. Barras verticais indicam erro padrão ($n = 4$).

3. Probabilidade de temperaturas na floração

Ao analisar a probabilidade de ocorrência de temperatura durante o período de floração no Uruguai e, considerando faixas de 5 °C variando de 0 a 40°C (Figura 3), é possível verificar que há maior probabilidade de ocorrência de temperaturas entre 10 – 15°C e 15 - 20°C (aproximadamente 30 e 35%, respectivamente). No entanto, temperaturas extremas abaixo de 5°C e acima de 30°C são raras nas condições ambientais estudadas. A faixa de 5 - 10°C pode ser verificada com uma probabilidade de cerca de 10%, e o mesmo vale para a faixa de temperatura ótima para germinação de 25 - 30°C.

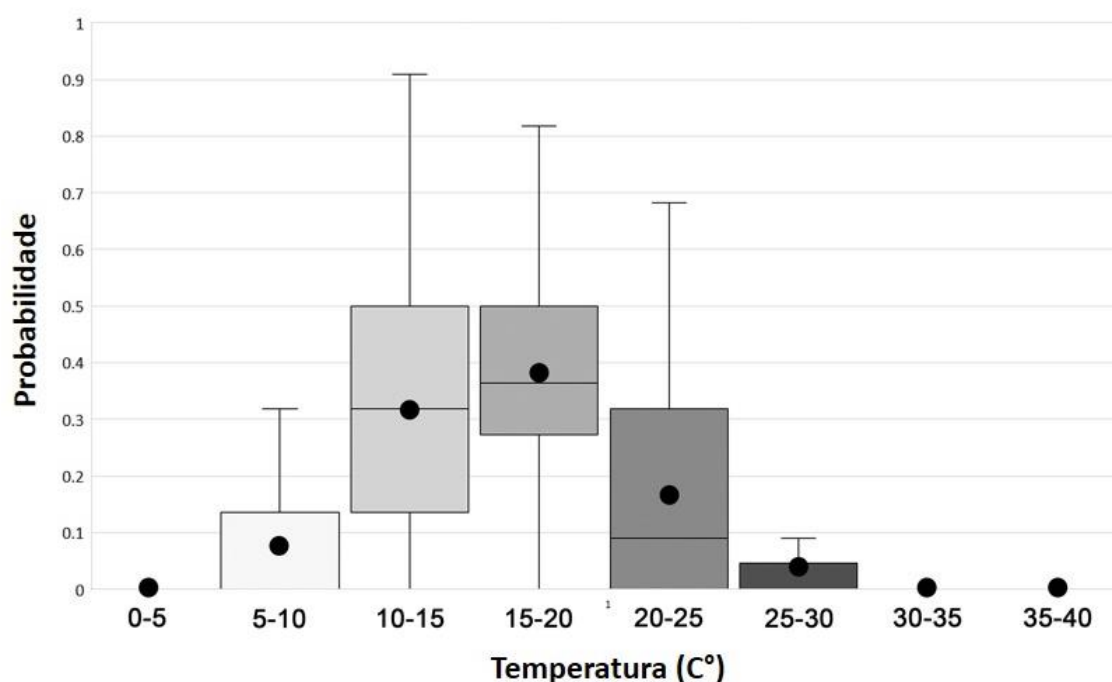


Figura 4: Probabilidade de ocorrência de temperaturas entre 0 - 40 ° C, obtidas no INIA- Las Brujas, Uruguai, com base na temperatura média horária para o período de 1998 - 2019, do dia 270 ao dia 320 correspondente à janela de floração da oliveira. As caixas representam o conjunto de dados para cada faixa de temperatura, e o ponto representa a média dos dados e a barra dentro da caixa mostram a mediana. As linhas acima e abaixo representam os valores máximos e mínimos para cada faixa de temperatura. Os pontos acima representam outliers.

Discussão

A expansão da cultura da oliveira para novas regiões climáticas como o Uruguai, cujo clima é classificado como temperado úmido, criou novos desafios para o avanço da cultura e conhecimento dos processos fisiológicos. Faz-se necessários estudos sobre a respostas genéticas e fisiológicas de forma a obter uma resposta mais clara sobre a adaptação das oliveiras a esta nova condição.

A polinização cruzada é o principal método de polinização em oliveiras, e um planejamento cuidadoso do pomar é necessário para uma polinização e frutificação eficiente entre cultivares de oliveira (MOOKERJEE et al., 2005; SELAK et al., 2021). A avaliação da fenologia da floração das cinco cultivares

mostrou uma janela de floração que permitiu estratégias avançadas de combinações de plantio usando cultivares que apresentam sincronização fenológica no estágio de plena floração. Ao avaliar as datas de entrada mais precoces durante o período de floração da cultivar Manzanilla, observou-se que não havia uma cultivar polinizadora durante esse período (268 a 276). Datas anteriores e posteriores de entrada na floração podem estar relacionadas ao acúmulo de frio durante o inverno e também determinaram os eventos fenológicos (GORDO & SANZ, 2010). Para a cultivar Picual, que apresenta o maior período de plena floração, identificou-se que, ao final desse período, não houve sincronização com as demais cultivares.

Para as cultivares Manzanilla, Arbosana e Picual, que apresentaram datas extremas no período de floração, a pressão dos grãos de pólen de outras cultivares na atmosfera pode não ser suficiente para completar a fertilização floral. Além disso, uma grande distância entre plantações, plantações pequenas e com poucas cultivares, são fatores que contribuem para uma baixa frutificação. Selak et al. (2021) concluíram que a polinização cruzada é observada com maior frequência preferencialmente na cultivar Oblica, e nem sempre a fertilização das flores ocorre pela cultivar em maior número ou mais próxima. De acordo com o estudo, grandes relações de sobreposição de florações e compatibilidade entre cultivares garantem uma fertilização bem sucedida.

A janela de floração das cultivares de oliveira estudadas compreende um período de 52 dias. Isso significa que durante os anos deste estudo, o período de floração ocorreu em alguns desses dias (268 – 320 DOY). As variações na data de floração e na duração deste período devem-se à variação ano a ano das temperaturas e precipitação que ocorrem no Uruguai. Segundo Benlloch-González et al. (2018), um aumento de 4°C na temperatura durante o inverno é suficiente para retardar a floração e prolongar esse período.

A porcentagem de germinação dos grãos de pólen das cultivares variou de 20,56% a 29,56%, para Picual e Koroneiki, respectivamente. Os valores encontrados não se aproximaram aos observados por Reale et al. (2006) em cinco cultivares de oliveira, onde a porcentagem de germinação foi de aproximadamente 40%. E foram maiores que os relatados por Garrido et al.

(2021) que observaram 12% de germinação. Os resultados de Wu et al. (2002) demonstraram uma grande variação na germinação do pólen em oliveiras, de 1,6% a 35,5% para as cultivares Pendolino e Frantoio, respectivamente. A pesquisa realizada por Viti et al. (1990), utilizando o mesmo meio de cultura deste estudo, demonstrou que a germinação ficou entre 17 e 26%. Estudos realizados por Lavee e Datt (1978) indicaram que há um aumento na germinação do grão de pólen de cultivares de oliveira quando o tecido do estigma da cultivar 'Manzanilla' foi adicionado ao meio de cultura. Variações na germinação dos grãos de pólen podem ocorrer devido às condições de cultivo, cultivares em estudo e meio de cultura utilizado para germinação *in vitro* (FERRI et al., 2008; GIORDANI et al., 2014; MAZZEO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Estudos têm mostrado que a temperatura de 40°C é letal para os grãos de pólen por induzir choque térmico (KOUBOURIS et al., 2009), mas não há resultados de pesquisas sobre o efeito de baixas temperaturas na polinização das oliveiras. Este estudo mostrou que a germinação do grão de pólen é maior na temperatura entre 25 e 30 °C, atingindo valores superiores a 40%. A porcentagem de germinação diminui a 15 °C, e a 10 °C ou menos, não ocorre ou é drasticamente menor, assim como na temperatura de 45 °C. Ao pesquisar a germinação *in vitro* de grãos de pólen e exposição de flores a altas temperaturas nas cultivares Leccino e Levantinka Vuletin Selak et al. (2014) concluem que altas temperaturas reduzem o crescimento do tubo polínico no estilete e a porcentagem de fertilização da flor. Assim, aumenta o tempo necessário para o tubo polínico atingir a base do estilete ou os ovários nas cultivares estudadas. A temperatura de 20°C é suficiente para reduzir a germinação e o crescimento do tubo polínico nas flores da cultivar Manzanilla, impactando negativamente na frutificação (CUEVAS et al., 1994).

Baixas temperaturas durante o período de floração foram relatadas como prejudiciais em outras culturas frutíferas, como longan (PHAM et al., 2015), avelã (ÇETINBAS-GENÇ et al., 2019) e pêssego (HEDHLY et al., 2005), influenciando germinação e crescimento do tubo polínico. Em citros, Distefano et al. (2012) verificaram que na temperatura de 10°C não houve germinação de grãos de pólen para os genótipos em estudo, e a 15°C apenas 10% germinaram.

Os resultados de Koubouris et al. (2009) mostraram que a germinação do grão de pólen aumenta a uma temperatura de 25 °C para Koroneiki (+6%), Mastoidis (52%) Kalamata (+ 10%) e Amigdalolia (+ 10%) cultivares. Na temperatura de 30 °C, as porcentagens de germinação de Mastoidis, Kalamata e Amigdalolia foram 8, 6 e 14% maiores, respectivamente, quando comparadas à temperatura controle de 20 °C. Segundo os autores, as reações diferenciadas observadas nos genótipos em resposta ao estresse em altas e baixas temperaturas, podem ser utilizadas para o melhoramento das plantas, resultando assim em cultivares mais adaptadas.

Com relação à análise dos dados climáticos da série histórica do Uruguai sobre temperaturas máximas e mínimas, a temperatura diária durante o período de floração não ultrapassa 25°C, conforme mostrado na Figura 1. As temperaturas mínimas diárias ficaram entre 10 e 15°C. Uma probabilidade de aproximadamente 0,3 e 0,35 foi observada para as faixas de temperatura de 10 – 15°C e 15 – 20°C, respectivamente. Essa probabilidade indica que as temperaturas durante o período de floração estão concentradas nessas duas faixas. Uma probabilidade menor, cerca de 0,10, ocorre para temperaturas de 20 a 25°C. Temperaturas acima de 25°C não ocorrem dentro da referida janela de floração da oliveira no Uruguai.

A ocorrência de temperaturas amenas na primavera também foi observada na região olivícola de Tenerife (Ilhas Canárias), onde o clima é caracterizado como subtropical (MEDINA-ALONSO et al., 2020). Embora haja maior probabilidade de temperaturas menos eficientes para germinação no Uruguai, é possível produzir oliveiras e obter rendimentos anuais de 8 ton/ha (CONDE-INNAMORATO et al., 2019). A variação ano a ano das condições climáticas neste país, principalmente devido a mudanças no volume de precipitação e na temperatura média anual (VAUGHAN et al., 2017), pode ser um fator determinante para a fixação dos frutos, pois a temperatura determina a germinação e o crescimento dos grãos de pólen.

Conclusões

1. Entre a primeira data de floração da cultivar mais precoce e a última data de floração, da cultivar mais tardia no período de estudo, observou-se uma janela de 52 dias, sendo o primeiro dia o dia 268 (25 de setembro).
2. A temperatura ótima para germinação e crescimento do tubo polínico nas cultivares de oliveira avaliadas está entre 25 e 30°C.
3. Com base na série de dados históricos de 22 anos, durante o período de floração 75% dos dias tiveram temperaturas abaixo de 20 ° C.
4. As baixas temperaturas podem limitar a fixação de frutos da oliveira no Uruguai, portanto. Novos estudos serão necessárias para elucidar estes fatores na polinização “*in vivo*”.

Referências bibliográficas

- AGUILERA, F.; RUIZ, L.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B.; GALÁN, C.; OTEROS, J. BEN DHIAB, A.; MSALLEM, M.; ORLANDI, F. (2014) Heat accumulation period in the Mediterranean region: Phenological response of the olive in different climate areas (Spain, Italy and Tunisia) **International Journal of Biometeorology**. 58: 867-876.
- BENLLOCH-GONZÁLEZ, M.; SÁNCHEZ-LUCAS, R.; BENLLOCH, M.; RICARDO, F. E (2018) An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. **Scientia Horticulturae**. 240: 405– 410.
- CASTAÑO, J. P.; GIMÉNEZ, A.; CERONI, M.; FUREST, J.; AUNCHAYNA, R. (2011) Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. **Serie técnica INIA 193**.
- ÇETINBAS-GENÇ, A.; CAI, G.; VARDAR, F.; ÜNAL, M. (2019) Differential effects of low and high temperature stress on pollen germination and tube length of hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**. 255: 61–69.
- CONDE-INNAMORATO, P.; ARIAS-SIBILLOTTE, M.; VILLAMIL, J.J.; BRUZZONE, J.; BERNASCHINA, Y.; FERRARI, V.; ZOPPOLO, R.; VILLAMIL, J.; LEONI, C. (2019) It Is Feasible to Produce Olive Oil in Temperate Humid Climate Regions. **Frontiers in Plant Science** 10: 1544.
- CUEVAS, J.; RALLO, L.; RAPOPORT, H. F. (1994) Initial fruit set at high temperature in olive, *Olea europaea* L. **Journal of Horticultural Science**. 69: 665-672.

DISTEFANO, G.; HEDHLY, A.; LAS CSASAS, G.; LA MAFALDA, S.; HERRERO, M.; GENTILE, A. (2012) Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in Citrus. **Scientia Horticulturae**. 140: 1-7.

DURÁN, A. CALIFRA, A.; MOLFINO, J. H.; LYNN, W. (2006) Keys to soil taxonomy for Uruguay. **Natural Resources Conservation Service**, Washington.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; GOMEZ-VALLEDOR, G.; RALLO, L. (1983) Influence of pistil extract and temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of olive cultivars. **Journal of Horticultural Science**. 58: 219- 227.

FERRI, A.; GIORDANI, E.; PADULA, G.; BELLINI, E. (2008) Viability and in vitro germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. **Advances in Horticultural Science**. V. 22: 116-122.

GARRIDO, A.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; VÁZQUEZ-RUIZ, R. A.; RODRÍGUEZ-RAJO, J. F.; AIRA, M. J. (2021) Reproductive biology of olive trees (Arbequina cultivar) at the northern limit of their distribution areas. **Forests**. 12: 204.

GIORDANI, E.; FERRI, A.; TRENTACOSTE, E.; RADICE, S. (2014) Viability and *in vitro* germinability of pollen grains of olive cultivars grown in different environments. Paper presented at the **VII international symposium on olive growing**, INTA, San Juan, 2012.

GORDO, O.; SANZ, J. J. (2010) Impact of climate change on plant phenology in Mediterranean ecosystems. **Global Change Biology**. V. 16: 1082-1106.

HEDHLY, A. (2011) Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**. V. 74:9-16.

HEDDHY, A.; HORMAZA, J. O.; HERRERO, M. (2005) The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. **Plant Biology**. V 7 : 476-483.

HERRERA-CÁCERES, C.; PÉREZ-GALARCE, F.; ÁLVAREZ-MIRANDA, E.; CANDIA—ÉJAR, A. (2017) Optimization of the harvest planning in the olive oil production: A case study in Chile. **Computers and Electronics in Agriculture**. 141: 147-159.

KOUBOURIS, G. C.; METZIDAKIS, I. T.; VESILAKAKIS, M. D. (2009) Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype **Environmental and Experimental Botany**. V. 67: 209-214.

LAVEE, S.; DATT, A. C. (1978) The Necessity of Cross-Pollination for Fruit Set of Manzanillo Olives. **Journal of Horticultural Science**. 53: 261-266.

MAZZEO, A.; PALASCIANO, M.; GALLORRA, A.; CAMPOSEO, S.; PACIFICO, A.; FERRERA, G. (2014) Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars as affected by 'on' and 'off' years. **Scientia Horticulturae**. 170: 89-93.

MEDINA-ALONSO, M. G.; NAVAS, M. G.; CABEZAS, J. M.; WEILAND, C. M.; RÍOS-MESA, D.; LEÓN, L.; LA ROSA, R. (2020) Differences on flowering phenology under Mediterranean and Subtropical environments for two representative olive cultivars. **Environmental and Experimental Botany**. 180: 104239.

MOOKERJEE, S.; GUERIN, J.; COLLINS, G.; FORD, C.; DESGLEY, M. (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. **Theoretical and Applied Genetics**. 111: 1174-1182.

MORIONDO, M.; STEFANINI, F. M.; BINDI, M. (2008) Reproduction of olive tree habitat suitability for global change impact assessment. **Ecological Modelling**. V. 218 : 95-109.

PHAM, V. T.; HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. (2015) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). **Scientia Horticulturae**. V. 197:470-475.

R TEAM, C (2019) R: A language and environment for statistical computing, R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. Disponible in: <http://www.R-project.org/>, page R Foundation for Statistical Computing.

REALE, L.; SGROMO, C.; BONOFIGLIO, T.; ORLANDI, F.; FORNACIARI, M.; FERRANTI, F.; ROMANO, B. (2006) Reproductive biology of Olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars. **Sexual Plant Reproduction**. V. 19: 151-161.

SANZ-CORTÉS, F.; MARTINEZ-CALVO, J.; BADENES, M. L.; BLEIHORDER, H.; HACK, H.; LLACER, G.; MEIER, U. (2002) Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). **Annals of Applied Biology**. V. 140: 151-157.

SELAK, G. V.; ARBEITER, A. B.; CUEVAS, J.; PERICA, S.; PUJIC, P.; BOZIKOVIC, M. R.; BANDELK, D. (2021) Seed paternity analysis using ssr markers to assess successful pollen donors in mixed olive orchards. **Plants** 10: 38-46.

SILVA, L. F. O.; ZAMBOM, C. R.; PIO, R.; OLIVEIRA, A. F.; GONÇALVES, E. D (2016) Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**. 75: 26-32.

SPERONI, G.; TRUKILLO, C.; SOUZA-PÉREZ, M.; BERBERIAN, N.; BORGES, A.; SEVERINO, V.; ARIAS-SIBILLOTTE, M. (2021) Floral biology and pollen grain presentation in "Arbequina" olive (*Olea europaea* L.) cultivar under non-traditional crop climatic conditions. **Botany Letters**. V. 168: 594 - 604.

TORRES, M.; PIERANTOZZI, P.; SEARLES, P.; ROUSSEAU, C. M.; CARCÍA-INZA, G.; MISERERE, A.; BODOIRA, R.; CONTRERAS, C.; MAESTRI, D. (2017) Olive cultivation in the southern hemisphere: Flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. **Frontiers in Plant Science**. V. 8: 1830.

VAUGHAN, C.; DESSAI, S.; HEWIT, C.; BAERTHGEN, W.; TERRA, R.; BAETERRETCHE, M. (2017) Creating an enabling environment for investment in climate services: The case of Uruguay's National Agricultural Information System. **Climate Services**. V. 8: 62 - 71.

VITI, R.; BARTOLINI, S.; VITAGLIANO, C. (1990) Growth regulators on pollen germination in olive. **Internacional symposium on olive growing 286**. Cordoba, 230: 227 - 230.

VULETIN SELAK, G.; CUEVAS, J.; GORETA BAN, S.; PINILLOS, V.; DUMINIC, G.; PERICA, S. (2014) The effect of temperature on the duration of the effective pollination period in 'Oblica' olive (*Olea europaea*) cultivar. **Annals of Applied Biology**. V. 164: 85-94.

VULETIN SELAK, G.; PERICA, S.; GORETA BAN, S.; POLJAK, M. (2013) The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**. V. 156: 38-46.

WU, S. B.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. (2002) Sexual compatibility within and between olive cultivars. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. V. 77: 665-673.

CAPÍTULO 2

Identificação de cultivares de oliveira sensíveis e tolerantes a baixa temperatura e efeito da aplicação de boro na floração.

Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.), pertencente à família Oleaceae, é o cultivo mais emblemático da região da bacia do Mediterrâneo, com grande impacto econômico, social e cultural. Esta espécie encontra-se amplamente difundida e bem adaptada às condições rústicas da região Mediterrânica (BENLLOCH-GONZÁLEZ et al., 2018). A produção mundial de azeitonas concentra-se em países sob este clima, destacando-se como principais produtores mundiais a Espanha (8.137.810 ton), Itália (2.207.150 ton), Marrocos (1.409.266 ton), Tunísia (2.000.000 ton) e Turquia (1.316.626 ton). Somados, estes países representam aproximadamente 72% da produção mundial de azeitonas (FAO, 2020). Na última década, a crescente demanda do mercado internacional por azeite de oliva e azeitonas de mesa introduziu novas áreas de cultivo em países como África do Sul, EUA, Austrália, Argentina e Chile, as quais possuem condições climáticas semelhantes às observadas na bacia do Mediterrâneo. No entanto, ao redor do mundo, existem olivais sendo cultivados sob diferentes condições climáticas (HERRERA-CACERES et al., 2017).

No Brasil, o cultivo de oliveiras está em expansão e concentra-se em dois locais de cultivo. Um deles na Serra da Mantiqueira localizada entre os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, apresenta um clima favorável ao cultivo de oliveiras e compreende uma área de aproximadamente 3.000 hectares cultivados (GARCIA, et al. 2018; EPAMIG, 2022). O segundo local é o estado do Rio Grande do Sul, localizado ao Sul do Brasil, que se destaca como maior produtor de azeitonas do país com uma área aproximada de 6.500 hectares cultivados (SEAPDR, 2021) que produziram cerca de 202 mil litros de azeite na safra de 2020/2021. No entanto estima-se que apenas 35% da área cultivada tenha atingido a idade produtiva.

De acordo com Alba et al. (2013), o Rio Grande do Sul possui condições climáticas que permitem o cultivo de oliveiras. As temperaturas durante o verão não ultrapassam os 40°C e no inverno, raramente atingem a temperatura limitante de 0°C. Conforme a classificação de Köppen, o clima da região é classificado como subtropical úmido Cfa (ALBA et al., 2013). Durante o período de floração, entre os meses de setembro e novembro, podem ocorrer volumes expressivos de precipitação que afetam negativamente a polinização e dispersão dos grãos de pólen, levando a uma baixa fecundação efetiva. Neste mesmo período, as temperaturas costumam estar próximas aos 15°C, porém existe uma ampla variabilidade inter-anual (COUTINHO et al., 2009; ALBA et al., 2013).

A temperatura é uma importante variável climática, já que interfere em vários processos fisiológicos da planta, incluindo crescimento e desenvolvimento (PÉREZ- LÓPEZ et al., 2015) noadamente na fase reprodutiva (HEDHLY, 2011). Esta última, é considerada a fase mais sensível à temperatura, pois logo após serem liberados pelas anteras, os grãos de pólen são expostos à ação do meio ambiente (VULENTIN-SELAKE et al., 2019). Um estudo realizado por Cuevas et al. (1994), utilizando a cultivar Manzanilla, demonstrou que a temperatura de 30°C inibe a germinação de grãos de pólen e a de 20°C ocasiona um lento crescimento do tubo polínico, resultando em baixa fecundação efetiva. Contudo, a resposta das cultivares à temperatura é variável, demonstrando que existe uma relação entre estes fatores (KOUBOURIS et al., 2009).

Vários estudos são realizados sobre a interferência da temperatura sobre a polinização em oliveiras (SELAKE et al., 2013; CUEVAS et al., 1994), especialmente sobre a ação de altas temperaturas (30 – 40°C) as quais causam preocupação em virtude das mudanças climáticas, já que a região do Mediterrâneo pode ser drasticamente afetada (BENLLOCH-GONZÁLEZ et al., 2018).

O boro é um nutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas e sua deficiência está entre os distúrbios de micronutrientes mais frequentes em oliveiras (LIAKOPOULOS & KARABOURNIOTIS, 2005). Aplicações foliares de boro imediatamente antes da abertura das flores ou

durante a iniciação floral, aumentam significativamente a fixação de frutos e a produtividade (PERICA et al., 2000). O boro desempenha um importante papel na germinação e no crescimento do tubo polínico, no entanto, a fertilização em oliveiras é influenciada tanto por fatores biológicos como ambientais, incluindo cultivar, localização do pomar, precipitação e temperatura do ar (SOYERGIN, 2010). No ambiente *in vitro*, o boro adicionado na forma de ácido bórico é essencial para a germinação e formação do tubo polínico e a sua deficiência resulta em baixa germinação e redução do crescimento do tubo polínico. Estes resultados sugerem que a fertilização de oliveiras com boro, torna o pólen mais efetivo na polinização e fecundação das flores, convertendo-se em maior produção (HECHMI et al., 2015).

Nas condições climáticas do Rio Grande do Sul, é provável que ocorram baixas temperaturas, nos meses em que ocorre a floração das oliveiras, as quais podem afetar a polinização e a fixação de frutos. Portanto, objetivou-se com o presente trabalho: 1- Investigar o efeito das baixas temperaturas e da temperatura alternada sobre a viabilidade dos grãos de pólen. 2- Determinar o índice de tolerância a baixas temperatura de cinco cultivares de oliveira. 3- Estudar o efeito de concentrações de ácido bórico no meio de cultura *in vitro*, sobre os parâmetros de viabilidade dos grãos de pólen de duas cultivares de oliveira submetidas à temperatura de 15°C.

Materiais e Métodos

Local e material vegetal

Os ramos florais de oliveiras das cultivares Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel foram coletados de plantas com seis anos de idade cultivadas em espaçamento 6 x 6m, do pomar pertencente a Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental da Cascata, latitude 31°37'9" S, longitude 52°31'33" O e altitude de 170 m, localizada na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul -Brasil.

Meio de cultura para a germinação in vitro de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, pertencente à Universidade Federal de Pelotas, no mês de novembro de 2020. Aproximadamente 20 inflorescências de cada cultivar foram coletadas da porção final de ramos produtivos, localizadas no terço médio da copa, no período da manhã (9:00 – 10:00h). Os ráceros florais coletados, foram armazenados em sacos de papel e transportados ao laboratório, onde foram armazenados em placas de Petri. Procedeu-se a agitação das placas para que houvesse a liberação dos grãos de pólen das anteras.

O meio de cultura foi preparado de acordo com Viti et al. (1990), adicionando 100 ppm de ácido bórico, no primeiro experimento e no segundo experimento, foram utilizadas as concentrações de: 0, 100, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico. O meio de cultura foi autoclavado a 120°C, sob pressão de 1,5 atm, durante 30 min. Após, foi adicionado 20 mL de meio de cultura em placas Petri esterilizadas. Os grãos de pólen foram dispersos sobre o meio de cultura com a utilização de um pincel, pulverizando os grãos de pólen uniformemente sobre o meio. As placas foram fechadas com plástico filme para evitar a troca de ar com o ambiente externo.

Para verificar o efeito da temperatura, as placas contendo os grãos de pólen foram armazenadas em câmaras de incubação (BOD) nas temperaturas constantes de 10°C, 15°C, 10-20°C (12 h em cada temperatura) e 20 °C. No segundo experimento, as placas contendo os grãos de pólen e as diferentes concentrações de ácido bórico foram armazenadas sob temperatura de 15 °C.

As avaliações de germinação de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico foram realizadas em microscópio estereoscópico, equipado com o sistema AxioVision®. Foi considerado germinado, o grão de pólen que apresentava comprimento de tubo polínico superior ao diâmetro do grão de pólen.

Índice de Resposta ao Estresse Acumulativo (CSRI)

O índice de resposta ao estresse acumulativo indica uma resposta global da planta às condições ambientais desfavoráveis e demonstra a sensibilidade

relativa de diferentes genótipos a um estresse específico. O CSRI foi calculado para cada cultivar de oliveira, para avaliar a resposta reprodutiva global em relação à temperatura aplicada. Utilizou-se a equação proposta por Dai et al. (1994) a seguir descrita:

$$CSRI = \left(\frac{PG_t - PG_c}{PG_c} + \frac{PTL_t - PTL_c}{PTL_c} \right) \times 100$$

onde CSRI= índice de resposta ao estresse acumulativo, PG= porcentagem de germinação de grãos de pólen, PTL= comprimento do tubo polínico, t= tratamento, e c= controle.

A temperatura de 20 °C foi considerada como controle, pois é a que proporciona uma maior germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico para as cultivares.

Desenho experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo dois fatores de tratamento composto por cinco cultivares (Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel) e quatro temperaturas (10, 15, 10-20 alternada e 20°C), havendo três repetições para cada tratamento. Foram contabilizados 100 grãos de pólen por repetição, em cada tratamento. As contagens foram realizadas em diferentes campos de visão e as medições com auxílio do microscópio estereoscópico, equipado com o sistema AxioVision®.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto à variância (ANOVA), pelo teste F ($p \leq 0.05$). No caso de interação entre os fatores (temperatura e cultivares; cultivares e concentrações de ácido bórico) não ser significativa, considerou-se o efeito dos fatores principais. O efeito das concentrações de ácido bórico foi analisado por regressão polinomial e o efeito das cultivares, comparado pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados e Discussão

O efeito de quatro regimes de temperatura (10, 15, 10-20 e 20 °C) na germinação in vitro de grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico de cinco cultivares de oliveira (Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel) foi avaliado. Houve interação significativa entre as temperaturas e as cultivares (Tabela 1). Na cultivar Arbequina, a temperatura baixa (10 °C) reduziu a germinação dos grãos de pólen, no entanto não houve diferenças estatísticas entre as quatro temperaturas. Ao observar o comprimento do tubo polínico desta cultivar (Figura 1B), observou-se que na temperatura de 10 °C o comprimento do tubo polínico atingiu apenas 107,78 mm, diferindo da temperatura de 15 °C e da alternada de 10 – 20 °C, que apresentaram valores de 197,59 mm e 206,85 mm, respectivamente. Aos 20 °C foi obtido o maior comprimento de tubo polínico para Arbequina (311,65mm).

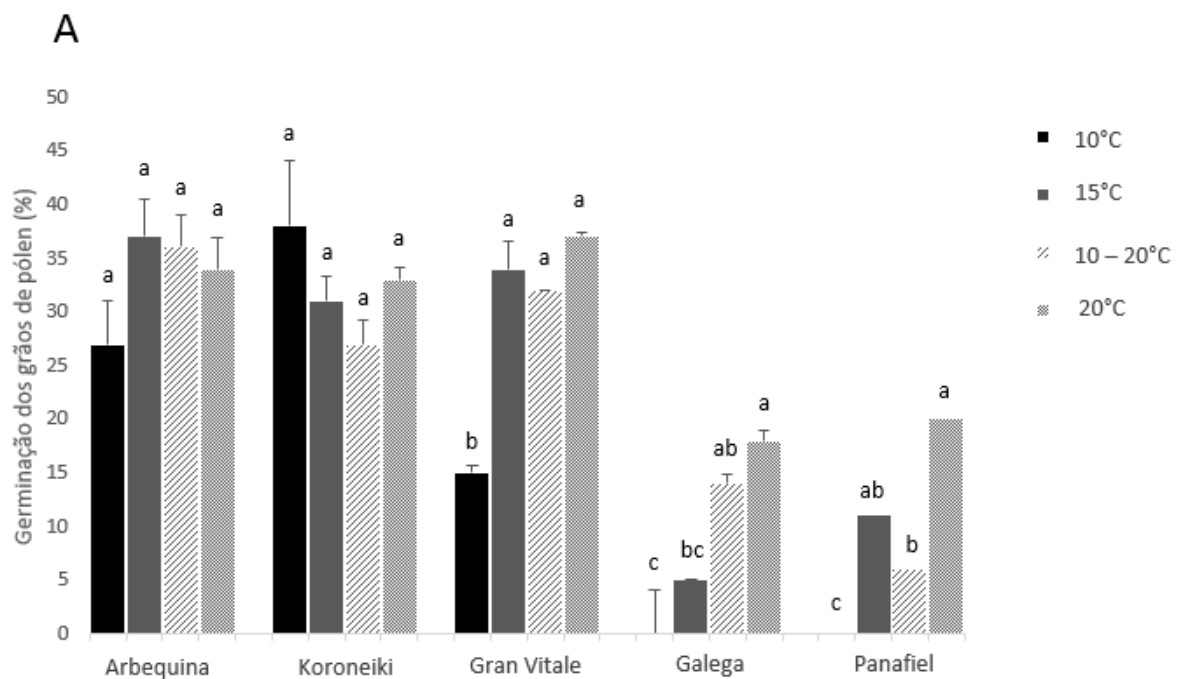
Tabela 1. Germinação de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico de cinco cultivares de oliveira sob incubação em diferentes temperaturas. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2020.

Cultivares	Germinação (%)				Comprimento de tubo polínico (mm)			
	10°C	15°C	10-20°C	20°C	10°C	15°C	10-20°C	20°C
Arbequina	27A*	37A	36A	33A	107.78A	197.59AB	206.85A	311.65A
Koroneiki	37A	31A	27A	32A	124.09A	213.52A	196.70AB	245.15B
Gran vitale	15B	33A	32A	37A	70.88A	169.07AB	190.70AB	269.21AB
Galega	0C	5B	14B	18B	0B	156.03B	183.65AB	246.2B
Panafiel	0C	11B	6B	20B	0B	161.81AB	143.34B	218.69B

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$)

Na cultivar Koroneiki, para a germinação dos grãos de pólen, não foram verificadas diferenças estatísticas entre as temperaturas estudadas. Para o comprimento do tubo polínico, verificou-se que o menor valor foi obtido na temperatura de 10°C (124,09 mm), diferindo das demais temperaturas. Na cultivar Gran Vitale, a temperatura de 10 °C proporcionou a menor germinação dos grãos de pólen (15%) e o menor comprimento do tubo polínico (70,88 mm). Nesta cultivar, as temperaturas de 15 °C e de 10 - 20 °C também não foram eficazes para o crescimento do tubo polínico que atingiu 169,07 mm e 190,70 mm,

respectivamente e o máximo comprimento foi obtido na temperatura de 20 °C (269,21 mm). A cultivar Galega obteve o maior valor para germinação aos 20 °C (18%), diferindo estatisticamente das demais temperaturas. Na temperatura de 10 °C, não houve germinação e aos 15 °C, a germinação foi de apenas 5%. Com relação ao comprimento do tubo polínico, as temperaturas de 15 °C e de 10 - 20 °C não diferiram entre si e o maior comprimento foi verificado aos 20 °C (269,21 mm). Comportamento semelhante foi observado para a cultivar Panafiel, onde na temperatura de 10 °C não houve germinação dos grãos de pólen e baixa germinação dos mesmos nas temperaturas de 15 °C e de 10 – 20 °C. Verificou-se que as temperaturas de 10 – 20 °C atingiram apenas 143,34 mm de comprimento, no entanto não diferiram da temperatura de 15 °C.



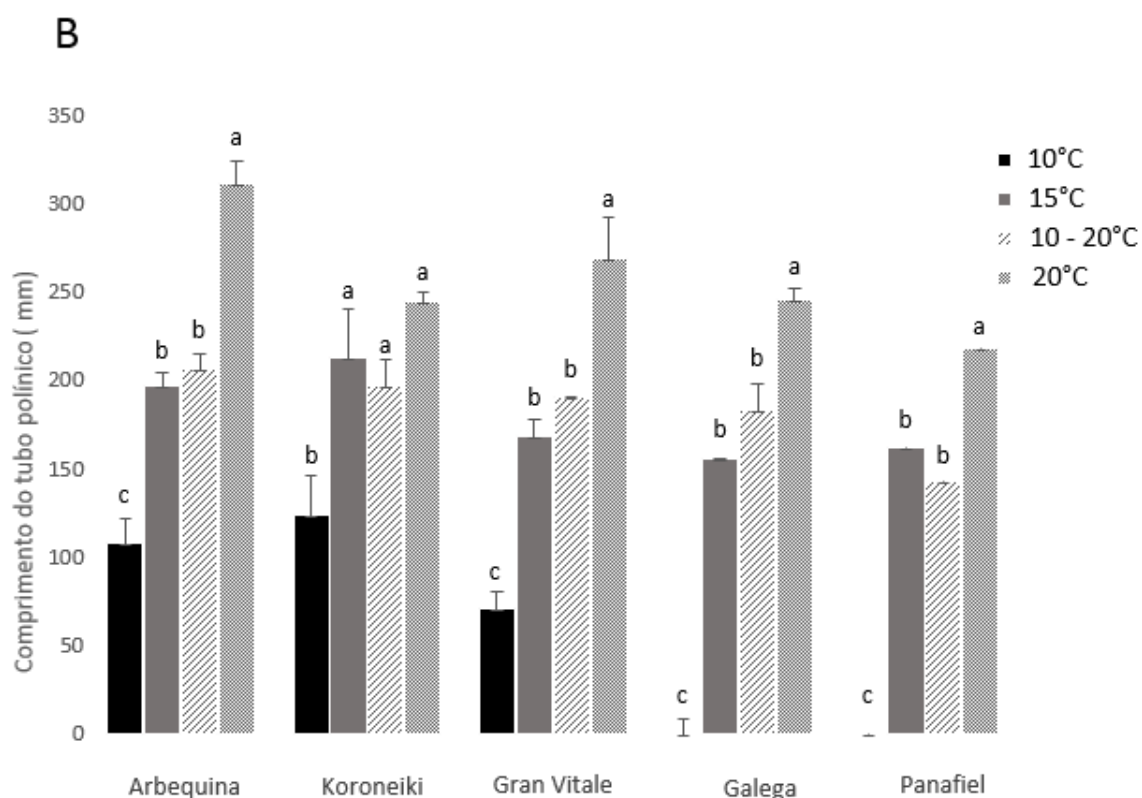


Figura 1: Germinação in vitro de grãos de pólen (A) e comprimento do tubo polínico (B) de cinco cultivares de oliveira (Arbequina, Koroneiki, Gran Vitale, Galega e Panafiel) sob quatro regimes de temperaturas (10, 15, 10-20 e 20 °C) em novembro de 2020. Pelotas, Rio Grande do Sul - Brasil. Letras distintas, representam diferença estatística para temperatura em cada cultivar, pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Diferenças na germinação dos grãos de pólen entre cultivares de uma mesma espécie também foram observadas em Manga (PÉREZ et al., 2019), Pistacia spp. (ACAR ad KALANI, 2010), Abacate (*Persea americana* Mill.) e Pera (KUORI et al., 2017). Polito et al. (1988) ao estudarem as baixas temperaturas em Pistache, observaram que os melhores resultados para a germinação e o comprimento do tubo polínico ocorriam em cultivares que apresentavam datas de floração mais precoces, ou seja, quando as temperaturas ainda eram baixas, sugerindo que há uma adaptação destas cultivares às baixas temperaturas. Um outro estudo realizado por Montalt et al. (2019), ao observarem distintas respostas

à germinação e ao comprimento de tubo polínico de genótipos de citros, concluíram que o comportamento dos genótipos reflete a adaptação de sua geração esporofítica a baixas temperaturas. Estes resultados, baseados na performance dos grãos de pólen, poderiam ser uma estratégia na seleção de genótipos de citros adaptados às condições ambientais.

A temperatura de 10°C impediu a germinação e o crescimento do tubo polínico das cultivares Galega e Panafiel. 'Gran Vitale' apresentou apenas 15% de germinação dos grãos de pólen, contrastando com os resultados obtidos para as cultivares Arbequina e Koroneiki que apresentaram melhor desempenho nesta temperatura, obtendo valores de 27% e de 37%, respectivamente. A temperatura de 15 °C e de 10 – 20 °C foi efetiva para as cultivares Arbequina, Koroneki e Gran Vitale, no entanto, uma baixa porcentagem de germinação foi verificada para as cultivares Galega e Panafiel, 5 e 10% aos 15 °C e na temperatura de 10 – 20 °C, 14 e 6%, respectivamente. O crescimento do tubo polínico foi menor aos 15 °C para a cultivar Galega, diferindo da Koroneiki. Na temperatura de 10 – 20 °C, o maior valor foi para a cultivar Arbequina que apresentou 206,85 mm e o menor valor foi verificado em Panafiel (143,34 mm). Aos 20 °C, a cultivar Arbequina obteve um melhor desempenho em relação a Koroneki, Galega e Panafiel.

Estudos realizados em avelã (*Corylus avellana* L.) revelaram que o estresse causado pelas baixas temperaturas é maior, do que o ocasionado pelas altas devido à inibição do crescimento do tubo polínico (ÇETINGAS-GENÇ et al., 2019). Em amêndoa (*Prunus dulcis* L.), a baixa temperatura pode ser desejável para a dispersão dos grãos de pólen para evitar sua desidratação. Por outro lado, a baixa temperatura desempenha papel negativo durante a germinação dos grãos de pólen podendo desacelerar o crescimento do tubo polínico através do estilete da flor (SORKHEH et al., 2018).

Os resultados para as concentrações de ácido bórico e cultivares (Figura 2) mostraram interação significativa. A adição de ácido bórico ao meio de cultura aumentou a porcentagem de germinação dos grãos de pólen para ambas cultivares, no entanto foi observado que doses elevadas reduzem esta variável. Para a cultivar Arbequina, foi observado um aumento na porcentagem de

germinação na concentração de 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico. Para a cultivar Koroneiki, foram verificados valores de germinação menores em relação à Arbequina. A análise por regressão polinomial ajustou-se a uma curva quadrática em que o ponto máximo da germinação dos grãos de pólen ocorre na dose de 212 mg. L⁻¹ e germinação de 22.34%. Diferenças entre as cultivares foram observadas na dose de 0 mg.L⁻¹, onde a cultivar Arbequina apresentou maior porcentagem de germinação (16%), enquanto que Koroneiki apenas 3% (Figura 1). Na dose de 100 mg. L⁻¹, Arbequina também obteve maior valor de germinação apresentando 71% e Koroneiki 20%. Nas demais doses, não houve diferenças significativas entre as cultivares.

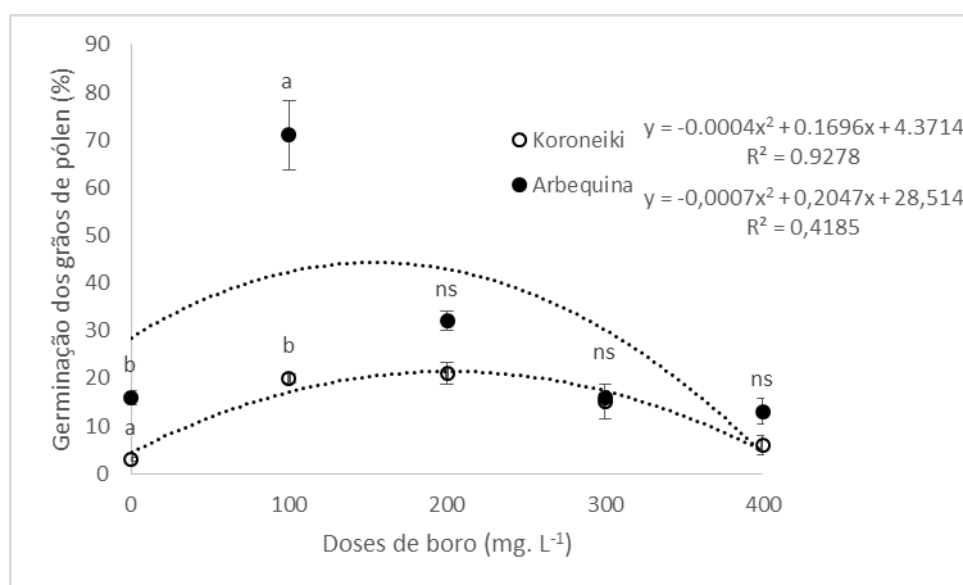


Figura 2. Germinação de grãos de pólen in vitro de duas cultivares de oliveira submetidas a diferentes sob temperatura de 15 °C. Pelotas, novembro de 2020. Rio Grande do Sul- Brasil. Letras minúsculas distintas, indicam diferenças estatísticas entre cultivares na mesma dose pelo teste de Tukey (p<0.05).

Para o comprimento do tubo polínico, houve interação significativa entre doses e cultivares. As doses foram analisadas por regressão e se ajustaram a uma curva quadrática para a cultivar Koroneiki, onde o máximo comprimento de tubo polínico foi observado na dose de 86ppm.L. Para a cultivar Arbequina, houve um ajuste linear, onde o acréscimo de doses acima da concentração de 100 mg. L⁻¹ foi prejudicial ao comprimento do tubo polínico. As cultivares

estudadas apresentaram diferentes respostas na concentração de 0 mg.L⁻¹ e na concentração de 100 mg.L⁻¹(Figura 2), onde Arbequina obteve 103.82 mm e 117.56 mm, respectivamente e Koroneiki, 51.91 mm e 88.17 mm para as mesmas concentrações. Nas demais concentrações não houveram diferenças estatísticas.

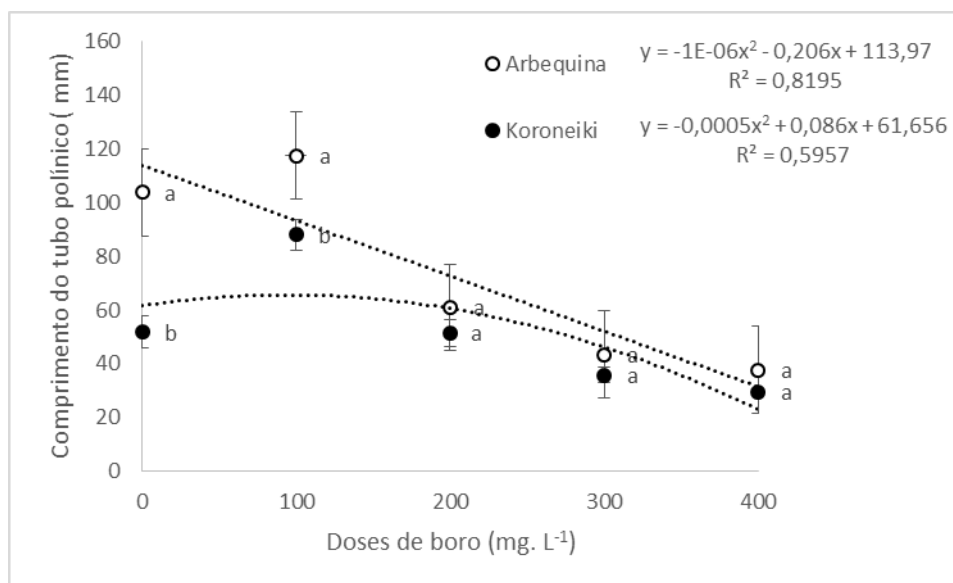


Figura 3. Comprimento do tubo polínico in vitro de duas cultivares de oliveira, sob temperatura de 15°C, submetidas a diferentes doses de ácido bórico no meio.. Pelotas, novembro de 2020. Rio Grande do Sul- Brasil. Letras minúsculas distintas, indicam diferenças estatísticas entre cultivares na mesma dose pelo teste de Tukey (p<0.05).

Vuletin-Selak et al. (2015) ao estudarem o efeito do meio de cultura na germinação de grãos de pólen de cultivares de oliveira, observaram que os melhores resultados para germinação das cultivares ocorreram no meio de cultura com a adição de 10 mg.L⁻¹, no entanto os valores para germinação variaram de 0 a 24%. Estes valores estão próximos ao encontrado para a concentração se 0 mg.L⁻¹ neste experimento. O trabalho realizado por Hechmi et al. (2015) demonstrou que a adição de 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico ao meio de cultura possibilitou acréscimos na germinação dos grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico de quatro cultivares de oliveira, dentre elas Koroneiki que apresentou germinação de 59,31%. Neste trabalho, a porcentagem de germinação obtida para a mesma cultivar foi de apenas 20% e isso se justifica

pela baixa temperatura aplicada ao período de incubação dos grãos de pólen. Os resultados demonstraram que mesmo sob influência da baixa temperatura, o boro aumenta a porcentagem de germinação dos grãos de pólen e também o comprimento do tubo polínico, constituindo-se em uma estratégia para regiões onde são recorrentes baixas temperaturas na primavera.

Para detectar genótipos tolerantes, intermediários e sensíveis às baixas temperaturas, foi calculado o índice CSRI (Tabela 1). Com base neste índice, as cultivares Gran Vitale, Galega e Panafiel, foram classificadas como sensíveis à temperatura de 10 °C. A cultivar Koroneiki, demonstrou ser tolerante e Arbequina foi intermediária. Na temperatura de 15 °C, foi observado que apenas a cultivar Galega foi sensível, Gran Vitale e Panafiel apresentam comportamento intermediário, enquanto que Arbequina e Koroneiki foram tolerantes. A temperatura alternada de 10 – 20 °C, mostrou que a cultivar Panafiel é sensível, enquanto que Galega foi intermediária e as demais cultivares foram tolerantes.

Tabela 2: Índice de estresse acumulativo (CSRI), em diferentes temperaturas (10, 15 e 10 - 20°C) em comparação com o controle (20 °C) observado para germinação e comprimento do tubo polínico de cinco cultivares de oliveira. Pelotas - RS, Brasil 2020.

Valores de CSRI					
Temperatura	Arbequina	Koroneiki	Gran Vitale	Galega	Panafiel
10°C	-86.001	-34.2325	-133.127	-200	-200
Tolerante < -55 < Intermediária < -127.6902 < Sensível					
15°C	-27.7752	-18.9664	-45.3206	-108.847	-71.0094
Tolerante < -72.4904 < Intermediária < -36.133 < Sensível					
10-20°C	-27.7451	-37.9485	-42.6766	-47.6283	-104.451
Tolerante < -44.0948 < Intermediária < -74.2727 < Sensível					

A temperatura de 20°C foi considerada como controle pois é mais indicada para a germinação dos grãos de pólen e o comprimento do tubo polínico.

As cultivares Arbequina e Koroneiki podem ser indicadas para as regiões onde o clima apresenta temperaturas baixas durante o período de floração. Para as demais cultivares, a floração e a fixação do fruto podem ser drasticamente reduzidos pela ocorrência de temperaturas amenas. A cultivar Panafiel apresentou-se sensível à temperatura de 10°C, intermediária para a de 15°C e sensível na temperatura alternada de 10 – 20°C, demonstrando que poucas horas de baixas temperaturas são suficientes para diminuir a porcentagem de germinação dos grãos de pólen e comprimento do tubo polínico. O pólen é sensível a pequenas flutuações nas variáveis atmosféricas, especialmente a temperatura e pode ser utilizado como uma amostra eficaz para estudar a tolerância ao estresse de toda a planta (HEBBAR et al., 2018). Os resultados deste experimento corroboram com os obtidos por Koubouris et al. (2009) com genótipos de oliveira, em que demonstraram diferentes níveis de tolerância para as temperaturas e classificaram a cultivar Koroneiki e Amigdalolia como tolerantes à temperatura de 10 °C.

Conclusão

- 1- A baixa temperatura afeta negativamente a germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos de oliveiras.
- 2- A temperatura de 10°C inibe a germinação dos grãos de pólen das cultivares Galega e Panafiel, e reduz a germinação de Gran Vitale.
- 3- A temperatura alternada de 10 – 20°C demonstra que poucas horas sob exposição à baixa temperatura são suficientes para reduzir a germinação dos grãos de pólen e o comprimento dos tubos polínicos das cultivares sensíveis.
- 4- O boro auxilia no processo de germinação dos grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico das cultivares Arbequina e Koroneiki, no entanto, doses elevadas são prejudiciais.

5- As cultivares Arbequina e Koroneiki são tolerantes à baixa temperatura, enquanto que Gran Vitale, Galega e Panafiel são sensíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, I.; KALANI, V. G. The effects of temperature on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia* spp. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 569 - 572, 2010.

ALBA, J. M. F.; FLORES, A. C.; WREGE, M. S. "Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul." Brasília: **Embrapa**, 2013.

BENLLOCH-GONZÁLEZ, M., SÁNCHEZ, R. L.; BENLLOCH, M.; FERNANÁNDEZ-ESCOBAR, R. An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 405– 410, 2018.

ÇETINBAS-GENÇ, A.; CAI, G.; VARDAR, F.; ÜNAL, M. Differential effects of low and high temperature stress on pollen germination and tube length of hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 255, n. 20, p. 61- 69, 2019.

COUTINHO, E. F.; WREGE, M. S.; JUNIOR, C. R.; ALMEIDA, I. R.; STEINMETZ, S. Clima, in: COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado- Sistema de Produção**, 2009. 125p.

CUEVAS, J., RALLO, L.; RAPOPORT, H. Initial fruit set at high temperature in olive, *Olea europaea* L. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n. 4, p. 665- 672, 1994.

DAI, Q., SHAOBING, P., CHAVEZ, A.Q., VERGARA, B.S. Intraspecific responses of 188 rice cultivars to enhanced UVB radiation. **Environmental Experimental Botany** 34 (4), 433–442, 1994.

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Safra de azeitonas na Mantiqueira deve ser maior que no último ano. Disponível em: <https://epamig.wordpress.com/2020/01/24/safra-de-azeitonas-na-mantiqueira-deve-ser-maior-que-no-ultimo-ano/>. Acesso: 10 de março de 2022.

FAO, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Acesso em: 09 de março de 2021.

GARCIA, S. R.; SANTOS, D. F.; MARTINS, F. B.; RODRIGUES, T. R. Aspectos climatológicos associados ao cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.) em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 22, p. 188- 209, 2018.

GONZÁLEZ, M. B.; LUCAS, R. S.; BENLLOCH, M.; ESCOBAR-FERNÁNDEZ, R. An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 405- 410, 2018.

HEBBAR, K. B.; HELAN, M. R.; ANUSREE, R. N.; KANNAN, S.; NIRAL, V.; ARIVALAGAN, M.; GUPTA, A.; SAMSUDEEN, K.; CHANDRAN, K. P.; CHOWDAPPA, P.; VARA, P. P. V. Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars in response to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**. v. 153, p. 35- 44. 2018.

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**. v. 74, p. 9-16, 2011.

HECHMI, M.; KHALED, M.; ECHARARI, F. In vitro pollen germination of four olive cultivars (*Olea europaea* L.): effect of boric acid and storage. **American Journal of Plant Physiology**, v. 10, p.55-67, 2015.

HERRERA-CÁCERES, C.; PÉREZ, F. G.; ÁLVAREZ, E. E.; CANDIA, A. V. Optimization of the harvest planning in the olive oil production: A case study in Chile. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 141, p.147-159, 2017.

KOUBOURIS, G. C.; IOANNIS, T. M.; MILTIADIS, D. V. "Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype." **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 209-214, 2009.

KUROKI, K.; TAKEMURA, Y.; MINGFENG, J.; MARUMORI, H.; TERATANI, N.; MATSUMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; TAMURA, F. Pear pollen selection using higher germination properties at low temperatures and the effect on the fruit set and quality of Japanese pear cultivars. **Scientia Horticulturae**. v. 216, p. 200 – 204, 2017.

LIAKOPOULOS, G.; KARABOURNIOTIS, G. Boron deficiency an concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a combined growth chamber and field study. **Tree Physiology**, v. 25, p. 307-315, 2005.

MONTALT, R.; CUENCA, J.; VIVES, M. C.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P.; ALEZA, P. Influence of temperature on the progamic phase in Citrus. **Environmental and Experimental Botany**. v. 166, p.103806. 2019.

PÉREZ-LÓPEZ, D.; RIBAS, F.; MORIANA, A.; RAPOPORT, H. F.; DE JUAN, A. Influence of temperature on the growth and development of olive (*Olea europaea* L.) trees. **The journal of Horticultural Science and Biotechnology**. v. 83, p. 171-176. 2015.

POLITO, V. S., LUZA, J. G.; WEINBAUM S. A. Differential low-temperature germination responses by pollen of *Pistacia vera* clones with different bloom dates. **Scientia Horticulturae**. v. 35, p. 269-274, 1988.

VITI, R.; BARTOLINI, S.; VITAGLIANO, C. "Growth regulators on pollen germination in olive." In **International Symposium on Olive Growing**, v. 286, pp. 227-230. 1989.

SELAK, G. V.; PERICA, S.; BAN, S. G.; BUCAN, L.; POLJAK, M. Flower sterility and the germination ability of pollen as genetic traits of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars grown in Croatia. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 237–242, 2012.

SILVA, L.F.O., ZAMBON, C. R.; PIO, R.; OLIVEIRA, A.F.; GONÇALVES, E. D. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 26-32, 2016.

SOYERGIN, S. Effects of soil and leaf treatments to eliminate boron deficiency in olives. **Communications in soil science and plant analysis**. v. 41, p. 2004-2010, 2010.

SORKHEH, K.; AZIMKHANI, R.; MEHRI, N.; CHALESHTORI, M. H.; HALÁSZ, J.; ERCISLI, S.; KOUBOURIS, G. C. Interactive effects of temperature and genotype on almond (*Prunus dulcis* L.) pollen germination and tube length. **Scientia Horticulturae**. v. 227. p. 162- 168. 2018.

SPERONI, G.; TRUJILLO, C.; PÉREZ-SOUZA, M.; BERBERIAN, N.; BORGES, A.; SEVERINO, V.; SIBILLOTTE-ARIAS, M. Floral biology and pollen grain presentation in "Arbequina" olive (*Olea europaea* L.) cultivar under non-traditional crop climatic conditions. **Botany Letters**, v. 168, p. 594-604. 2021.

VITI, R.; BARTOLINI, S.; VITAGLIANO, C. (1990) Growth regulators on pollen germination in olive. **Internacional symposium on olive growing 286**. Cordoba, 230: 227 - 230.

VULETIN-SELAK, G.; PERCIA, S.; GORETA BAN, S.; BUCAN, L.; POLJAK, M. Flower sterility and the germination ability of pollen as genetic traits of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars grown in Croatia. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. V. 83, P. 237- 242. 2015.

VULETIN-SELAK, G.; BAN-GORETA, S.; PERICA, S. The effect of temperature on olive pollen germination. **Acta Horticulturae**. v. 1231, p. 49-54. 2019.

Considerações finais

A produção de oliveiras fora da região tradicional de cultivo, sob condições climáticas distintas é possível. No entanto, existem poucas pesquisas acerca da morfologia e da fisiologia de oliveiras cultivadas nesta nova região de cultivo. Logo, trabalhos realizados com este tema auxiliariam no esclarecimento de problemas evidenciados pelos produtores a campo, sobretudo sobre a fecundação efetiva.

Os dados obtidos no estudo do capítulo 1 permitiram identificar o ambiente climático em que as oliveiras estão sendo cultivadas e a interferência das temperaturas sob a dinâmica da polinização, através da determinação do período de floração das principais cultivares, quais as temperaturas que mais ocorrem no período de floração e qual a interferência das mesmas na germinação dos grãos de pólen e no comprimento do tubo polínico. Os resultados sugerem uma interferência do ambiente que pode interferir na fecundação das flores, sendo um ponto de partida para novos estudos.

Os dados do capítulo 2 permitiram reconhecer que as cultivares apresentam respostas distintas a ação das temperaturas. Através do índice CSRI, foi possível identificar as cultivares mais sensíveis e tolerantes a baixa temperatura e se constitui em uma informação valiosa para a indicação de cultivares mais adaptadas as condições de cultivo do Rio Grande do Sul e para o desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento genético.

Pode-se concluir com este trabalho, que as condições climáticas do Uruguai, permitem o cultivo de oliveiras, no entanto, durante o período de floração que ocorre de 25 de setembro a 16 de novembro, ao menos 65% das temperaturas horárias estão abaixo da temperatura de 25 a 30°, recomendadas para a germinação dos grãos de pólen e para o crescimento do tubo polínico. As cultivares Arbequina e Koroneiki demonstraram ser mais resistentes ao estresse ocasionado pelas baixas temperaturas no período de fecundação das flores e por tanto, podem ser recomendadas para locais onde a primavera apresenta baixas temperaturas, como o Uruguai e o Rio Grande do Sul. As cultivares Galega,

Panafiel e Gran Vitale, devem ser evitadas nestes locais. Para melhorar o desempenho da fecundação das flores sobre influência de baixas temperaturas, a aplicação de ácido bórico no meio de cultura proporcionou ganhos sobre estas variáveis. Por fim, os estudos realizados com a espécie *Olea europaea* se constituíram em informações de grande importância para o setor olivícola que está em plena expansão no estado do Rio Grande do Sul e contribuirá com a comunidade científica no direcionamento de novas pesquisas como a recomendação de cultivares mais adaptadas a estes locais, a combinação de cultivares dentro do olival, estudos sobre a biologia floral e calibração de doses de adubação com boro a campo.

ANEXOS

Artigo publicado

Low spring temperature may negatively influence olive yield

Camila Schwartz Dias¹, Mercedes Arias-Sibillotte², Guadalupe Tiscornia³, Vivian Severino², Mateus Pasa¹, Flávio Gilberto Herter¹, Paulo Mello-Farias¹, Paula Conde-Innamorato⁴

¹Federal University of Pelotas, Department of Plant Science, Uruguay

²Universidad de la República, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Unidad de Ecofisiología de Frutales. Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Unidad GRAS, Estación Experimental INIA Las Brujas, Uruguay

⁴Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Programa Nacional de Investigación en Producción Frutícola, Estación Experimental INIA Las Brujas, Uruguay

Abstract

The olive tree (*Olea europaea* L.), a species adapted to the Mediterranean climate, has expanded into new climatic regions. Uruguay has a humid temperate climate and highly irregular climatic conditions among years. Environmental factors can be an obstacle to full production, as they affect pollination and fruit set. In this research, the phenology of five olive cultivars (Arbequina, Arbosana, Manzanilla, Picual and Koroneiki) widely cultivated in Uruguay was studied, using the BBCH phenological scale. The pollen grains of five cultivars were submitted to in vitro germination and incubated at temperatures of 0°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° and 40°C for 24 hours, and pollen grains germination and pollen tube length were evaluated. These temperatures were analyzed for the occurrence probability. They were based on the historical series analysis of hourly average temperature data, from September 26 to November 15 (flowering period), for the years of 1998 to 2019. Phenology results show that flowering can occur from day 268 to day 320 of the year, with cultivar 'Manzanilla' being the earliest and 'Arbosana' the latest. It was observed that the temperature of 10°C has no effect on pollen grain germination and on pollen tube growth. Moreover, the temperatures of 15 to 20°C are not very effective and the optimal temperature occurs between 25 and 30°C. In Uruguay, during flowering, temperatures between 10 and 20°C are more likely to occur. These results indicate possible causes that affect fruit set and productivity of olive trees in the field.

Keywords: Arbequina, fruit set, *Olea europaea* L., polinization, pollen germination.

Introduction

Climatic factors act directly on cultivated species development, determining their phenology and production. Most of human diet comes from plants' sexual reproduction, for example flower fertilization. Climate factors, especially temperature, plays an important role in phenological phases development of many species, where a change in environment temperature can negatively affect flower bud development and, consequently, flowering period (Aguilera et al., 2014). The effect of high and low temperatures is more sensitive in the reproductive phase, in female and male flower organs, during and after pollination. Plants' responses at this stage may vary with temperature stress intensity, as well as exposure time and species under study (Hedhly 2011).

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a species traditionally cultivated in the Mediterranean, whose climate is a transition between temperate and tropical. This climate is characterized by a wet winter (65% of rains occur between November and December) and very dry summers, with an annual rainfall average of 400 to 900mm. Winter temperatures are mild, ranging from 6° to 13°C in the coldest month. In summer months, high temperatures are seen with ranging averages between 25° and 28°C. In the Mediterranean region, the increase in extreme climatic

events frequency during specific stages of plant development, such as high temperatures during flowering period, reduces fruiting and yields in some crops (Moriondo et al., 2008; Vuletin Selak et al., 2013).

Olive tree cultivation has expanded to new regions with similar Mediterranean climate, such as South Africa, the USA, Australia, Argentina and Chile, and also to other regions with very different climate, such as China, Brazil and Uruguay, which have different temperature and precipitation regimes (Herrera-Cáceres et al., 2017; Torres et al., 2017). Uruguay is a country located in South America, and olive trees cultivation in this country occupies an area of approximately 10.000 hectares (Conde-Innamorato et al., 2019). The climate is characterized as temperate-humid, with rainfall above 1,100 mm per year and an average annual temperature of 17.7 °C. However, historical data shows a wide variability among years, with annual maximum and minimum averages of 22.6°C and 12.9°C, respectively (Castaño et al., 2011).

Previous studies have demonstrated the relationship between temperature and of olive pollen grains germination. The appropriate temperature range for germination occurs between 20 – 30°C. However, this response varies depending on the cultivar (Vuletin Selak et al., 2013). Many studies demonstrate how high

temperatures, especially above 40°C, inhibit or negatively affect many aspects of flower pollination and fertilization. Besides that, there is little information on pollen germination response under climatic conditions different from those found in the Mediterranean, especially under lower temperatures (Koubouris et al., 2009).

There are limiting factors at the time of fruit set in our conditions leading to problems such as high rates of alternate bearing (Conde-Innamorato et al., 2019). Therefore, the objectives of this research were: 1) to evaluate the phenology of five olive cultivars; 2) to study the effect of temperature on pollen grain germination and pollen tube growth 'in vitro' of Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Picual and Manzanilla cultivars, and; 3) to analyze the probability of temperature ranges from a historical data series during the period 1998 to 2019 registered at INIA Las Brujas, Uruguay.

Results

Phenological stages

The phenological records of Koroneiki and Arbosana for 9 years permitted recognizing a flowering period. The difference between the earliest date of flowering onset and the latest date of the petal drop stage was 35 of 35 for Koroneiki and 34 days for Arbosana. There were variations on the dates of flowering onset (BBCH 61), full flowering (BBCH 65) and petal drop (BBCH 68), as shown in Figure 1. It was verified that Manzanilla started flowering before the other cultivars, and its earliest date was on the 268th day of the year (DOY) eight days before the Arbequina cultivar. However, the phase of full flowering and petal drop is similar to other cultivars. Arbequina has a flowering window that can occur from day 276 (DOY) today 315 (DOY), and the full flowering stage is smaller compared to other cultivars, totaling 21 days. Petals drop from day 307 (DOY), six days before Manzanilla and Koroneiki.

The beginning of the full flowering period in Picual occurred concomitantly with the Arbequina, Arbosana and Koroneiki cultivars; however, this period can extend from day 283(DOY) today 316 (DOY). Cultivar Picual is the last to exceed the period of full flowering, and its occurrence window for this period is 30 days, the same number of days found in Manzanilla, for the same period. Arbosana is the last to start the flowering period, only on day 286 (DOY), while Arbequina and Manzanilla can start on days 276 (DOY) and 268 (DOY), respectively. Its full flowering period coincides with that of other cultivars, but the petal drop period is longer and can occur from day 313(DOY) today 320 (DOY). The Koroneiki is the second last cultivar to enter flowering, starting from day 282 (DOY). However, the period of full flowering occurs concomitantly with the other cultivars, being able to occur from day 286 (DOY) today 313 (DOY).

From the minimum and maximum temperature data, during the whole flowering period, it was observed that there was a variation between 7 - 15°C for the minimum temperature and 18 - 25°C for the maximum temperature. During the initial phase of the flower opening and full flowering period, the minimum temperatures were approximately 10°C. The maximum temperature verified at the full flowering stage was close to 20°C, not reaching 25°C for all cultivars under study (Fig 1).

Pollen germination and tube growth

The germination percentage and pollen grain length varied among the analyzed cultivars (Table I). It was found that Picual had a 9% lower percentage of pollen grain germination (20.56%) differing statistically from Koroneiki (29.56%) and Arbequina (29.22%) cultivars, and 8% lower compared to Arbosana (28.44%). For the pollen tube length variable, Koroneiki, Arbosana, Arbequina and Manzanilla cultivars did not present statistically significant differences, with values of 116.93; 117.59; 98.26 and 101.62 µm, respectively. There was a statistical difference for Picual, which differed from Arbosana (83.86 and 117.59 µm respectively) (Table 1).

The temperature interfered in germination and pollen tube growth, corresponding to a quadratic fit of R^2 of 0.8973 and 0.9846, respectively. The maximum point of germination, calculated through the curve equation, was obtained at the temperature of 26.66°C, where germination reached 43.38%. In treatments corresponding to the temperatures of 15°C and 20 °C, 21.69% and 36.29% germination was obtained, respectively. For the treatment at a temperature of 40°C, the germination percentage was only 15% and for a temperature of 10°C, there was no germination (Fig 2A).

The maximum pollen tube growth occurred at the temperature of 28.22 °C reaching 133.44 µm. The pollen tube length was significantly longer at 25 °C and 30 °C when compared to temperatures of 15 °C and 40 °C, which did not exceed 80 µm. At 20 °C, the values were intermediate, and no statistical difference was verified. At the temperature of 10 °C, it was not possible to estimate the pollen tube growth, hence there was no germination (Fig 2B).

Probability of temperatures at flowering

When analyzing temperature occurrence probability during flowering period in Uruguay and considering bands of 5 °C ranging from 0 to 40 °C (Fig. 2), there is a greater occurrence probability of temperatures between 10 - 15 °C and 15 - 20° C (approximately 30 and 35%, respectively). However, extreme temperatures below 5 °C and above 30 °C are rare in the studied environmental conditions. The range of 5 - 10°C can be verified with a probability of about 10%, and the same is true for the optimal temperature range for germination of 25 - 30°C.

Discussion

Olive growth expansion to new climatic regions such as Uruguay, where climate is classified as humid temperate, creates new challenges for the culture advancement and physiological processes knowledge. Further studies in genetic and physiological responses are required in order to obtain a clearer answer on the adaptation of olive trees to this new condition.

Cross-pollination is the main method of pollination in olive trees, and a careful orchard design plan is necessary for an efficient pollination and a fruit set among olive cultivars (Mookerjee et al., 2005; Selak et al., 2021). A flowering phenology evaluation of the five cultivars showed a blossoming window which permitted advanced strategies for planting combinations using cultivars that have phenological synchronization at the full flowering stage. When evaluating the earliest entry dates during flowering period of Manzanilla cultivar, it showed that there was not a pollinator cultivar during this period (268 at 276). Earlier and later dates of flowering entry may be related to chilling accumulation during winter, and they also determined the

Table 1. Pollen grain germination (%) and pollen tube length (μm) of five olive cultivars observed at INIA. Las Brujas- Uruguay, 2019.

Cultivar	Pollen germination (%)	Pollen tube length (μm)
Koroneiki	29.56 a*	116.93 ab
Arbosana	28.44 ab	117.59 a
Arbequina	29.22 ab	98.26 ab
Manzanilla	22.79 bc	101.62 ab
Picual	20.56 c	83.86 b
p value	< 0.001	0.031

* Means separated by different letters within columns are significantly different by Tukey's Test ($p < 0.05$).

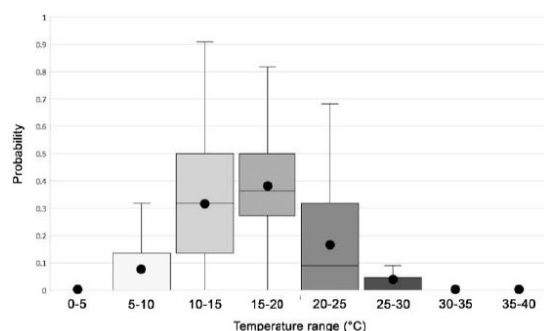


Fig 1. Average of maximum and minimum temperatures ($^{\circ}\text{C}$) from 1998 - 2019 historical series in Las Brujas- Uruguay and duration of BBCH 61, BBCH 65 and BBCH 68 stages corresponding to the beginning of flowering, full flowering and petal drop, respectively, for each cultivar.

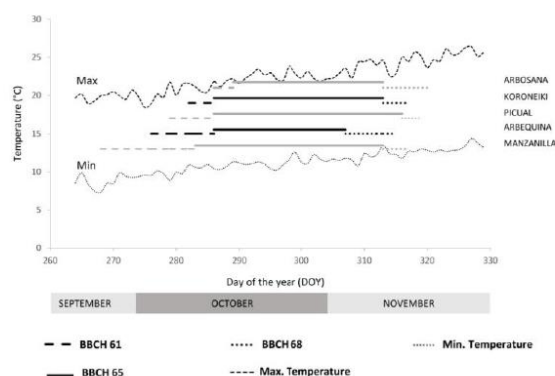


Fig 2. Pollen grain germination in percentage (A) and pollen tube length in μm (B), in response to the increase of temperature. Vertical bars indicate standard error ($n = 4$).

phenological events (Gordo and Sanz, 2010). For Picual cultivar, which presents the longest period of full flowering, it was identified that, at the end of this period, there was no synchronization with the other cultivars. For Manzanilla, Arbosana and Picual cultivars, which showed extreme dates in the flowering period, the pollen grains pressure from other cultivars in the atmosphere may not be sufficient to complete flower fertilization. Besides that, a large distance between plant, a small orchard with few cultivars, are factors that contribute to a low fruit set. Studies carried out by Lavee and Datt (1978) indicated that there is an increase in pollen grain germination of olive cultivars when tissue from the stigma of Manzanilla cultivar was added to the culture medium. Selak et al. (2021) concluded that cross-pollination is more often observed

preferential in Oblica cultivar, and flower fertilization does not always occur by the cultivar in greater number or the closer one. According to the research, flower large overlap relationship and cross-compatibility represent successful fertilization.

The flowering window of the studied olive cultivars comprises a period of 52 days. This means that during the years of this study, the flowering period occurred on some of these days (268 – 320 DOY). The changes in the flowering date and length of this period is due to the year-to-year variation of temperatures and precipitation that occurs in Uruguay. According to Benlloch-González et al. (2018), a 4°C increase in temperature during the winter is enough to delay the flowering date and extend this period.

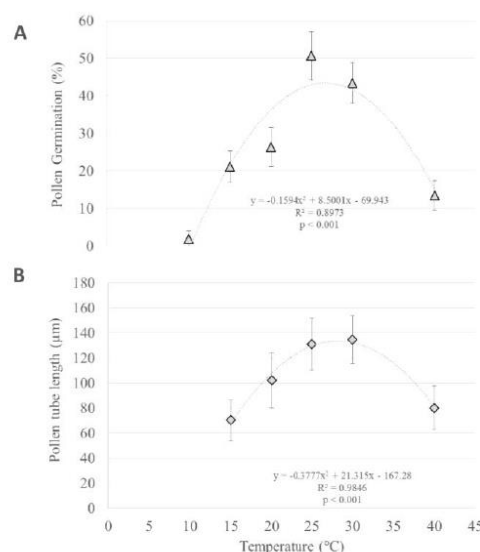


Fig 3: Probability of temperatures occurrence between 0 - 40°C, obtained at INIA- Las Brujas, Uruguay, based on the hourly average temperature for the period of 1998 - 2019, from day 270 to day 320 corresponding to the olive tree's flowering window. The boxes represent the data set for each temperature range, and the mean data point and the bar inside the box show the average. The sprays above and below represent the maximum and minimum values for each temperature range. The points above represent outliers.

The percentage of pollen grain germination of the cultivars ranged from 20.56% to 29.56%, for Picual and Koroneiki, respectively. These values were not close related to those observed by Reale et al. (2006) in five olive cultivars, where germination percentage was approximately 40%. And they were high related when compared to those reported by Garrido et al. (2021) who observed germination of 12%. The

results of Wu et al. (2002) demonstrated a wide variation in pollen germination of olive trees, from 1.6% to 35.5% for the cultivars Pendolino and Frantoio, respectively. The research carried out by Viti et al. (1990), using the same culture medium as this study, showed that germination remained between 17 and 26%. Variations in pollen grain germination may occur due to growing conditions, the cultivars under study and the culture medium used for in vitro germination (Ferri et al., 2008; Giordani et al., 2014; Mazzeo et al., 2014; Silva et al., 2016).

High temperatures affect pollination and pollen grains survival. Studies have shown that the temperature of 40°C is lethal to pollen grains by inducing heat shock (Koubouris et al., 2009) but there are no research results on the effect of low temperatures on olive trees pollination. This study showed that pollen grain germination is higher at a temperature between 25 and 30 °C, reaching values higher than 40%. The germination percentage decreases at 15 °C, and at 10 °C or less, it does not occur or is drastically lower, as well as at a temperature of 45 °C. When researching in vitro pollen grains germination and high temperature flowers exposure on Leccino and Levantina cultivars, Vuletin Selak et al. (2014) conclude that high temperatures reduce pollen tube growth in the stylet and the percentage of flower fertilization. As a result, it increases the time needed for the pollen tube to reach the stylet base or the

ovaries in the studied cultivars. The temperature of 20 °C is enough to reduce germination and pollen tube growth in Manzanilla cultivar flowers, negatively impacting fruit set (Cuevas et al., 1994).

Low temperatures during the flowering period have been reported as harmful in other fruit crops such as longan (Pham et al., 2015), hazel (Çetinbaş-Genç et al., 2019) and peach (Hedhly et al., 2005), influencing pollen tube germination and growth. In citrus, Distefano et al. (2012) found that at a temperature of 10°C there was no pollen grains germination for the genotypes under study, and at 15°C only 10% germinated.

The results of Koubouris et al. (2009) showed that pollen grain germination increases at a temperature of 25 °C for Koroneiki (+6%), Mastoidis (52%) Kalamata (+ 10%) and Amigdalolia (+ 10%) cultivars. At the temperature of 30 °C, the germination percentages of Mastoidis, Kalamata and Amigdalolia were 8, 6 and 14% higher, respectively, when compared to the control temperature of 20 °C. According to the authors, the strong and different reactions by the genotype in response to stress at high and low temperatures can be developed for plant improvement, thus resulting in more adapted cultivars. Mild temperatures occurrence in spring was also observed in the olive-growing region of Tenerife (Canary Islands), where the climate is characterized as subtropical (Medina-Alonso et al., 2020). Although there is a greater probability of less efficient temperatures for germination in Uruguay, it is possible to produce olive trees and obtain annual yields of 8 ton/ha (Conde-Innamorato et al., 2019). The year-to-year climatic conditions variation in this country, especially due to changes in precipitation volume and annual average temperature (Vaughan et al., 2017), may be a determining factor for fruit set, as

temperature determines germination and pollen grains growth.

Material and Methods

Local and plant material:

The research was performed at the experimental station INIA Las Brujas - Uruguay (34°40' S; 56°20' W; altitude 21 m). Seventeen-year-old olive trees of the cultivars Arbequina, Manzanilla and Picual, and ten-year-old Arbosana and Koroneiki, planted in spacing of 6m between rows and 4m between trees, were used. The local soil has an A horizon with a maximum fine texture of 50 cm. It has 2.5 % organic matter and a pH of 6.5; corresponding to Udifluent soil in the USDA classification (Durán et al., 2006). The olive trees orchard was fert-irrigated.

Pollen germination

The inflorescences were collected in 59 BBCH phenological stage, characterized by a corolla color change from green to white (Sanz-Cortés et al., 2002). The choice of this phenological stage was made to ensure that evaluated pollen grains were from the cultivar under study; knowing that in our conditions pollen of Arbequina, Picual y Coratina were viable between green corolla and anthesis (Speroni et al., 2021). The inflorescences were transported in Petri dishes to the laboratory, where they were placed above a filter paper moistened with 1000 µL of distilled water and stored in Petri dishes for 48 hours, at room temperature, to allow the flowers' opening and pollen grains' release. Afterwards, the dishes containing the opened inflorescences were carefully shook to release pollen grains from anthers. The culture medium described by Viti et al. (1990) was used, with the addition of 100 ppm of boric acid, as base medium. After preparation, the culture medium was autoclaved under a pressure of 1.5 atm, for 30 minutes. Then, it was transferred to sterilized Petri dishes (approximately 10 ml of culture medium). Later on, 1000 µL was added to the Petri dish containing pollen grains and, with the aid of a micropipette, 50 µL were removed and placed on culture medium. Next, the Petri dishes were closed with plastic film to prevent gas exchange from the external environment. To verify the temperature effect, plates containing pollen grains were subjected to the temperatures of 10, 15, 20, 25, 30 and 40°C. Samples for treatments at temperatures of 10 - 30°C were stored in an incubator chamber, and for the temperature of 40°, they were stored in a forced air circulation oven for 24 hours. The evaluation of the number of germinated pollen grains and pollen tube length were performed using a microscope model Olympus® BH2, with 20 x 0.40 magnification. Fifty pollen grains per repetition were counted, totaling 150 pollen grains per treatment, and they were considered germinated when presented a pollen tube length equals to or greater than their diameter. To assess the pollen tube length, DinoCapture® software was used, in which three pollen grains were selected, by repetition, and their lengths were verified.

Experimental design

The experimental design was completely randomized, containing two treatment factors and three replications. The treatment factors consisted of five olive cultivars (Koroneiki, Arbosana, Arbequina, Manzanilla and Picual) and six temperatures (10, 15, 20, 25, 30 and 40°C).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the R software (2019). The data expressed in percentage were transformed by arcsin [square root (n + 1)] and, then, it was submitted to analysis of variance (ANOVA) by the F test ($p \leq 0.05$). In case that interaction between factors (temperature and cultivar) was not significant, the main factors' effect was considered. The temperature effect was analyzed by polynomial regression, and the cultivar means were compared by the Tukey test ($p < 0.05$).

Climate and phenological stages

The phenology of cultivars Koroneiki and Arbosana was evaluated from a database containing nine-year records. The phenological scale was proposed based on the BBCH 61, BBCH 65 and BBCH 68 stages. The beginning of flowering (10% of open flowers), full flowering (at least 50% of open flowers) and the end of flowering (most petals fallen) were characterized according to the methodology used by Conde-Innamorato et al. (2019). For the phenology of Arbequina, Manzanilla and Picual cultivars, the research results were used, which carried out the evaluation over a period of ten years.

To calculate the probability of temperatures occurrence between 0 and 40°C, a dataset of hourly average temperature data, from September 26 1998 to November 15, 2019 was used. From every hour recorded temperature, it was observed the occurrence of the following values: 0-5°C, 5-10°C, 10-15°C, 15-20°C, 20-25°C, 25-30°C, 30-35°C and 35-40°C. The number of times the temperature remained within the observed range, for each hour and day, was related to the number of years (22 years). Thus, the hourly probability of occurrence of the observed range temperature was calculated. The data were plotted on a box-plot to represent the probability for each temperature range.

Regarding the climatic data analysis from Uruguay's historical series on maximum and minimum temperatures, daily temperature during the flowering period does not exceed 25°C, as shown in Figure 1. Daily minimum temperatures were between 10 and 15°C. A probability of approximately 0.3 and 0.35 was observed for the temperature ranges of 10 - 15°C and 15 - 20°C, respectively. This probability indicates that temperatures during the flowering period are concentrated in these two ranges. A lower probability, about 0.10, occurs for temperatures of 20 - 25°C. Temperatures above 25°C do not occur within the aforementioned olive tree flowering window in Uruguay.

Conclusions

Between the first and last flowering date in the study period, a window of 52 days was observed, the first day being day 268 (25th of September). The optimum temperature for pollen tube germination and growth in the evaluated olive cultivars ranges between 25 and 30°C. Based on the 22-year historical data series, during the flowering period 75% of the days had temperatures below 20 °C. Low temperatures may limit olive fruit set in Uruguay, so further investigations will be needed to study these factors on "in vivo" pollination.

Acknowledgements

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

Brazil and the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), unidad Las Brujas-Uruguay.

References

- Aguilera F, Ruiz L, Fornaciari M, Romano B, Galán C, Oteros J, Ben Dhiab A, Msallem M, Orlandi F (2014) Heat accumulation period in the Mediterranean region: Phenological response of the olive in different climate areas (Spain, Italy and Tunisia) *Int J Biometeorol*. 58: 867-876.
- Benlloch-González M, Sánchez-Lucas R, Benlloch M, Ricardo FE (2018) An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. *Sci Hortic*. 240: 405–410.
- Castaño JP, Giménez A, Ceroni M, Furest J, Aunchayna R (2011) Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. Serie Técnica INIA 193.
- Çetinbaş-Genç A, Cai G, Vardar F, Ünal M (2019) Differential effects of low and high temperature stress on pollen germination and tube length of hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes. *Sci Hortic*. 255: 61–69.
- Conde-Innamorato P, Arias-Sibillotte M, Villamil JJ, Bruzzzone J, Bernaschina Y, Ferrari V, Zoppolo R, Villamil J, Leoni C (2019) It Is Feasible to Produce Olive Oil in Temperate Humid Climate Regions. *Front Plant Sci*. 10: 1544.
- Cuevas J, Rallo L, Rapoport HF (1994) Initial fruit set at high temperature in olive, *Olea europaea* L. *Int J Hortic Sci*. 69: 665-672.
- Distefano G, Hedhly A, Las Casas G, La Malfa S, Herrero M, Gentile A (2012) Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in Citrus. *Sci Hortic*. 140: 1-7.
- Durán A, Califa A, Molino JH, Lynn W (2006) Keys to oil taxonomy for Uruguay. Natural Resources Conservation Service, Washington.
- Ferri A, Giordani E, Padula G, Bellini E (2008) Viability and in vitro germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. *Adv Hort Sci*. 22: 116-122.
- Garrido A, Fernández-González M, Vázquez-Ruiz RA, Javier Rodríguez-Rajo F, Aira MJ (2021) Reproductive biology of olive trees (Arbequina cultivar) at the northern limit of their distribution areas. *Forests*. 12: 204.
- Giordani E, Ferri A, Trentacoste E, Radice S (2014) Viability and in vitro germinability of pollen grains of olive cultivars grown in different environments. Paper presented at the VII international symposium on olive growing, INTA, San Juan, 25 - 29 September 2012.
- Gordo O, Sanz JJ (2010) Impact of climate change on plant phenology in Mediterranean ecosystems. *Glob. Change Biol. Bioenergy*. 16: 1082-1106.
- Hedhly A (2011) Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environ Exp Bot*. 74:9-16.
- Hedhly A, Hormaza JJ, Herrero M (2005) The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. *Plant Biol*. 7: 476-483.
- Herrera-Cáceres C, Pérez-Galarce F, Álvarez-Miranda E, Candia-Véjar A (2017) Optimization of the harvest planning in the olive oil production: A case study in Chile. *Comput Electron Agric*. 141: 147-159.
- Koubouris GC, Metzikakis IT, Vasilakakis MD (2009) Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environ Exp Bot*. 67: 209-214.
- Lavee S, Datt AC (1978) The Necessity of Cross-Pollination for Fruit Set of Manzanillo Olives. *Int J Hortic Sci*. 53: 261-266.
- Mazzeo A, Palasciano M, Gallotta A, Camposeo S, Pacifico A, Ferrara G (2014) Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars as affected by 'on' and 'off' years. *Sci Hortic*. 170: 89-93.
- Medina-Alonso MG, Navas JF, Cabezas JM, Weiland CM, Ríos-Mesa D, Lorite IJ, León L, la Rosa R de (2020) Differences on flowering phenology under Mediterranean and Subtropical environments for two representative olive cultivars. *Environ Exp Bot*. 180: 104239.
- Mookerjee S, Guerin J, Collins G, Ford C, Sedgley M (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Theor Appl Genet*. 111: 1174-1182.
- Moriendo M, Stefanini FM, Bindi M (2008) Reproduction of olive tree habitat suitability for global change impact assessment. *Ecol Model*. 218: 95-109.
- Pham VT, Herrero M, Hormaza JJ (2015) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *Sci Hortic*. 197:470-475.
- R Team C (2019) R: A language and environment for statistical computing, R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. Disponible in: <http://www.R-project.org/>, page R Foundation for Statistical Computing.
- Reale L, Sgromo C, Bonofiglio T, Orlandi F, Fornaciari M, Ferranti F, Romano B (2006) Reproductive biology of Olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars. *Sex Plant Reprod*. 19: 151-161.
- Sanz-Cortés F, Martínez-Calvo J, Badenes ML, Bleiholder H, Hack H, Llacer G, Meier U (2002) Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Ann Appl Biol*. 140: 151-157.
- Selak GV, Arbeiter AB, Cuevas J, Perica S, Pujic P, Božiković MR, Bandelj D (2021) Seed paternity analysis using SSR markers to assess successful pollen donors in mixed olive orchards. *Plants*. 10: 38-46.
- Silva, L F O, Zambon, C R, Pio, R, Oliveira, AF, Gonçalves, ED (2016) Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. *Bragantia*. 75: 26-32.
- Speroni G, Trujillo C, Souza-Pérez M, Berberian N, Borges A, Severino V, Arias-Sibillotte M (2021) Floral biology and pollen grain presentation in "Arbequina" olive (*Olea europaea* L.) cultivar under non-traditional crop climatic conditions. *Bot Lett*. 168: 594 - 604.
- Torres M, Pierantozzi P, Searles P, Cecilia Rousseaux M, García-Inza G, Miserere A, Bodoira R, Contreras C, Maestri D (2017) Olive cultivation in the southern hemisphere: Flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. *Front Plant Sci*. 8: 1830.
- Vaughan C, Dessai S, Hewitt C, Baethgen W, Terra R, Berterretche M (2017) Creating an enabling environment for investment in climate services: The case of Uruguay's National Agricultural Information System. *Clim Serv*. 8: 62 - 71.
- Viti R, Bartolini S, Vitagliano C (1990) Growth regulators on pollen germination in olive. *Internacional symposium on olive growing* 286. December 1, 1990. Cordoba, 230: 227 - 230.
- Vuletin Selak G, Cuevas J, Goreta Ban S, Pinillos V, Dumić G, Perica S (2014) The effect of temperature on the duration of the effective pollination period in 'Oblica' olive (*Olea europaea*) cultivar. *Ann Appl Biol*. 164: 85-94.

Vuletin Selak G, Perica S, Goreta Ban S, Poljak M (2013) The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Sci Hortic.* 156: 38-46.

Wu SB, Collins G, Sedgley M. (2002) Sexual compatibility within and between olive cultivars. *J Hortic Sci Biotechnol.* 77: 665-673.