



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Enraizamento ex vitro da oliveira (*Olea europaea* L.) cv.
Galega vulgar**

Tomás Macedo Novo Ribeiro

Orientador(es) | Augusto António Peixe

Évora 2024



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Enraizamento ex vitro da oliveira (*Olea europaea* L.) cv.
Galega vulgar**

Tomás Macedo Novo Ribeiro

Orientador(es) | Augusto António Peixe

Évora 2024



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | António Manuel Cordeiro (INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) (Arguente)
Augusto António Peixe (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer ao Professor Augusto Peixe pela proposta de realização da dissertação apresentada, por toda a orientação, disponibilidade e prestabilidade, com a qual sempre me presenteou, e graças à qual foi possível superar diversos obstáculos.

À equipa que constitui o laboratório de melhoramento e biotecnologia vegetal da Universidade de Évora, nomeadamente à Virgínia Sobral por todas as horas despendidas nos ensaios, ao Augusto Ribeiro pela recolha de dados atempadamente em período de isolamento e, não menos importante, ao João Cruz por toda a recolha de dados e palavras de força para o término desta dissertação enquanto, por ironia do destino, meu colega de trabalho.

Aos meus pais e irmão por tudo o que foram e são para mim.

À Sofia Martins por todo o apoio, motivação e palavras de ordem.

A todos os que integraram este projeto e permitiram assim a partilha e evolução do conhecimento sobre o tema.

Enraizamento ex vitro da oliveira (*Olea europaea* L.) cv. Galega vulgar

Resumo

O olival é uma das culturas com maior expressão crescente no nosso país pelo que, surge a necessidade de fornecer material vegetal para suprimir as necessidades exigidas pelos agricultores.

Pelo facto de existirem cultivares de difícil enraizamento por estacaria semi-lenhosa, tais como a ‘Galega vulgar’, surgiu a necessidade de desenvolvimento de métodos de propagação *in vitro* de modo a garantir plantas sãs aos consumidores.

Sendo a mão de obra especializada uma exigência e, com o intuito de reduzir o custo de produção, pretendemos testar o método apresentado que consiste na indução radicular *in vitro* com enraizamento de explantes já em condições *ex vitro*.

Para tal, testaram-se diferentes tratamentos que nos permitiram concluir que os melhores resultados se obtiveram com o clone 1441 e nos tratamentos aos quais se adicionou AIB diretamente no meio de cultura, com a posterior transferência dos explantes para Jiffy Preforma®.

Ex vitro rooting of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Galega vulgar

Abstract

Olive groves are one of the fastest growing crops in our country, which is why there is a need to provide plant material to meet the needs required by farmers.

Due to the fact there are cultivars that are difficult to root using semi-woody cuttings, such as ‘Galega Vulgar’, there was a need to develop *in vitro* propagation methods in order to guarantee healthy plants to consumers.

Since specialized labor is a requirement and, with the aim of reducing production costs, we intend to test the method presented, which consists of *in vitro* root induction with rooting of explants already in *ex vitro* conditions.

To this end, different treatments were tested, which allowed us to conclude that the best results were obtained with clone 1441 and in treatments to which AIB was added directly to the culture medium, with subsequent transfer of the explants to Jiffy Preforma®.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
1. Introdução e Objetivos	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Origem e características da <i>Olea europaea L.</i>	2
2.2. Descrição da cultivar estudada ('Galega Vulgar')	4
2.3. Formação de raízes adventícias	6
2.4. Técnicas de propagação	9
2.4.1. Técnicas de propagação tradicionais.....	9
2.4.1.1. Propagação através de óvulos	9
2.4.1.2. Propagação através de pôlas.....	10
2.4.1.3. Propagação por mergulhia.....	11
2.4.1.4. Propagação por estacaria lenhosa.....	11
2.4.1.5. Propagação por enxertia	12
2.5. Técnicas modernas de propagação	14
2.5.1. Propagação por estacaria semi-lenhosa	15
2.5.2. Propagação <i>in vitro</i>	17
2.5.2.1. Os meios de cultura	18
2.5.2.2. As plantas mãe	19
2.5.2.3. As fases do processo	20
2.5.2.3.1. Fase de iniciação asséptica	20
2.5.2.4. Fase de Multiplicação e Alongamento	21
2.5.2.5. Fase de indução radicular	22

2.5.2.5.1. Enrizamento <i>in vitro</i>	22
2.5.2.5.2. Enraizamento <i>ex vitro</i> e pré-aclimatização	23
2.5.2.6. Fase de aclimação de explantes enraizados <i>in vitro</i>	24
3. Material e métodos	24
3.1. Local de trabalho	24
3.2. Materiais	25
3.2.1. Material vegetal	25
3.2.2. Meios de cultura e substratos utilizados	25
3.2.2.1. Meios de cultura	25
3.2.2.2. Substratos utilizados.....	27
3.2.2.3. Recipientes de enraizamento e aclimação	29
3.3. Métodos	31
3.3.1. Esterilização de materiais	31
3.3.2. Preparação de material vegetal	32
3.3.3. Preparação do meio de cultura	33
3.3.3.1. Preparação de meio de cultura <i>in vitro</i> para multiplicação vegetal.....	33
3.3.3.2. Preparação de meio de cultura <i>in vitro</i> para enraizamento	34
3.3.3.3. Preparação de solução de AIB para realização de pulse	35
3.3.4. Preparação de substratos <i>ex vitro</i>	35
3.3.5. Condições de cultura utilizadas	36
3.3.6. Delineamento experimental e análise de dados	37
4. Resultados e Discussão	38
4.1. Análise das variáveis em estudo	38
4.2. Análise da interação clone x tratamento	43
4.3. Indução sucessiva de enraizamento no mesmo meio de cultivo	45
5. Conclusões	47
6. Referências Bibliográficas	49

Índice de Figuras

Figura 1 - Registo de produção nacional de azeite.....	3
Figura 2 - Cultivar ‘Galega Vulgar’ durante estado de maturação.....	5
Figura 3 - Folhas e frutos de cultivar de ‘Galega Vulgar’	5
Figura 4 - Diferentes fases de formação de raízes adventícias	8
Figura 5 - Óvulo de uma oliveira e rebento obtido a partir de um óvulo.....	9
Figura 6 - Rebentos de oliveira utilizados para multiplicação por Pôlas.....	10
Figura 7 - Exemplo de indução de enraizamento através de mergulhia.....	11
Figura 8 - Viveiro de estacaria lenhosa.....	12
Figura 9 - Exemplo de enxertia de garfo e cavalo.....	13
Figura 10 - Exemplo de enxerto por placa em oliveira adulta.....	14
Figura 11 - Exemplo de bancada de enraizamento com cama de Perlite.....	16
Figura 12 - Preparação de explante para instalação <i>in vitro</i>	20
Figura 13 - Tabuleiro de Jiffy®Preformas para instalação de explantes.....	27
Figura 14 - Substrato de Jiffy®Growblock.....	28
Figura 15 - Cultura instalada em condições de estufa.....	28
Figura 16 - Frascos de cultura	29
Figura 17 - Caixas plásticas com cultura instalada em Jiffy ® Preformas	30
Figura 18 - Campânulas utilizadas para aclimação.....	31
Figura 19 - Explantes instalados <i>in vitro</i> em meio de enraizamento.....	33
Figura 20 - Comparação entre taxas de enraizamento obtidos nos ensaios 1 e 2.....	39
Figura 21 - Variação do enraizamento nos diversos tratamentos realizados.....	40
Figura 22 - Variação de enraizamento em função do tipo de clone.....	43

Figura 23 - Variação do enraizamento em função do tipo de clone x tratamento efetuado.....	44
Figura 24 - Percentagem de enraizamento em função da repetição realizada.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação taxonómica <i>Olea europaea</i> L.....	2
Tabela 2 - Composição de meio de cultura OM.....	26
Tabela 3 - Tratamentos efetuados.....	37
Tabela 4 - Análise de variância relativa aos tratamentos efetuados	38
Tabela 5 - Análise de variância para enraizamento consecutivo no mesmo meio de cultura.....	45

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% - Percentagem

°C - Graus celsius

® - Marca registada

a.c.- Antes de cristo

AIB- Ácido Indol-3-butírico

ANA- Ácido naftalenoacético

BAP- 6-benzilaminopurina

Cm - Centímetros

g- Gramas

g/L– Gramas por litro

ha- hectare

L- Litros

ml - Mililitros

PPM TM - Plant Preservative Mixture

1. Introdução e Objetivos

A Oliveira (*Olea europaea L.*), é uma espécie com grande importância económica e social no nosso país, sendo a cultivar (cv.) ‘Galega vulgar’, uma das mais utilizadas em método de produção tradicional associada a olivais de largos compassos e reduzidas produções por hectare (Garcia, 2005).

Sendo a ‘Galega vulgar’ uma cultivar de grande interesse, derivado das características organolépticas do azeite produzido, surge a possibilidade de utilizar esta cultivar em novos métodos de produção oleica, como o olival intensivo regado, e obter rendimentos que há algumas décadas eram impensáveis.

Para que a cv. ‘Galega vulgar’ possa ser utilizada nestes novos olivais, é fundamental a existência de plantas no mercado, mas, a mesma, apresenta reduzidas taxas de enraizamento por estacaria semilenhosa, atualmente a técnica mais utilizada para propagação da espécie.

Esta dificuldade de propagação da cv. ‘Galega vulgar’ por técnicas de estacaria convencional, levou à tentativa de propagação *in vitro* da mesma, e, os resultados obtidos por Peixe *et al.* (2007), mostram que o processo pode ser aplicado com elevadas taxas de sucesso.

Ainda assim e apesar de todos os benefícios associados à propagação *in vitro* da oliveira, este método possui aspetos menos positivos, de onde se destacam, a necessidade de extremos cuidados de assepsia e a necessidade de pessoal especializado ao longo do processo, encarecendo o mesmo. A mão de obra, representa cerca de 70% do custo total da planta micro propagada (Peixe, A., comunicação pessoal).

Tendo por base o protocolo de multiplicação *in vitro* por rebentamento axilar, desenvolvido para a cultivar ‘Galega Vulgar’ por Peixe *et al.* (2007), pretendeu-se com a realização deste trabalho, simplificar a fase de enraizamento *in vitro*.

A ser conseguido, isso, não só reduzirá significativamente os custos associados à mão de obra, como também melhorará a qualidade do sistema radicular das plantas, uma vez que, o enraizamento e a respetiva aclimatização, passam a ser efetuados em simultâneo,

com as raízes a desenvolverem-se já em condições *ex-vitro* e sendo por isso totalmente funcionais.

Deste modo, procurou-se com este trabalho testar a exequibilidade de diferentes métodos de enraizamento de explantes de oliveira produzidos *in vitro*, com vista a simplificar o processo convencional de enraizamento utilizado no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora. Maiores taxas de enraizamento, redução de mão de obra e da quantidade de meios de cultura utilizados, durante a fase de enraizamento, são os objetivos a atingir.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Origem e características da *Olea europaea* L.

A. pertence à família botânica Oleaceae (Rapoport, 1997), sendo que o género *Olea* tem trinta e cinco espécies. (Garcia, 2005).

Dentro do género *Olea*, podemos incluir todas as oliveiras que se cultivam, a par dos zambujeiros, havendo distinção entre estes dois relativamente à sua subespécie, sendo os zambujeiros classificados como subespécie *sylvestris* e as oliveiras como subespécie *sativa*. (Rapoport, 1997). A tabela 1 apresenta a classificação taxonómica da *Olea europaea* L, desde a sua subdivisão.

Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	<i>Magnoliophytina (Angiospermae)</i>
Classe	<i>Magnoliopsida (Dicotyledoneae)</i>
Subclasse	<i>Lamiidae</i>
Ordem	<i>Oleales</i>
Família	<i>Oleaceae</i>
Subfamília	<i>Oleoidae</i>
Tribo	<i>Oleae</i>
Género	<i>Olea</i>
Espécie	<i>Olea europaea</i> L.

Tabela 1 - Classificação taxonómica *Olea europaea* L. (Adaptado de Rodrigues, 2009).

O cultivo da oliveira teve origem na Síria e Irão tendo-se posteriormente difundido para Ocidente, sendo uma das culturas mais antigas visto datar-se de uma cultura iniciada entre 4 000- 3 000 anos a.C. (Garcia, 2005).

O início da produção de azeite na Península Ibérica deu-se após a terceira Guerra Púnica e consecutiva invasão romana no século II a.C. ao longo da costa mediterrânea (Jorge Bohm, 2013). No final do século XIV, a cultura da oliveira assumiu maior importância, tendo aumentado o património nacional de 200 000 ha para 750 000 ha entre o final do século XIX e o início do século XX (Gouveia *et al.*, 2002). O mesmo aconteceu nos restantes países da zona mediterrânica, onde, ainda nos dias de hoje, se encontra cerca de 95% do olival cultivado (Garcia, 2005).

Podemos observar na figura 1 o aumento exponencial de produção ao longo dos últimos vinte anos, sendo também clara a alternância na produção característica da espécie, quando se observam dois anos consecutivos.

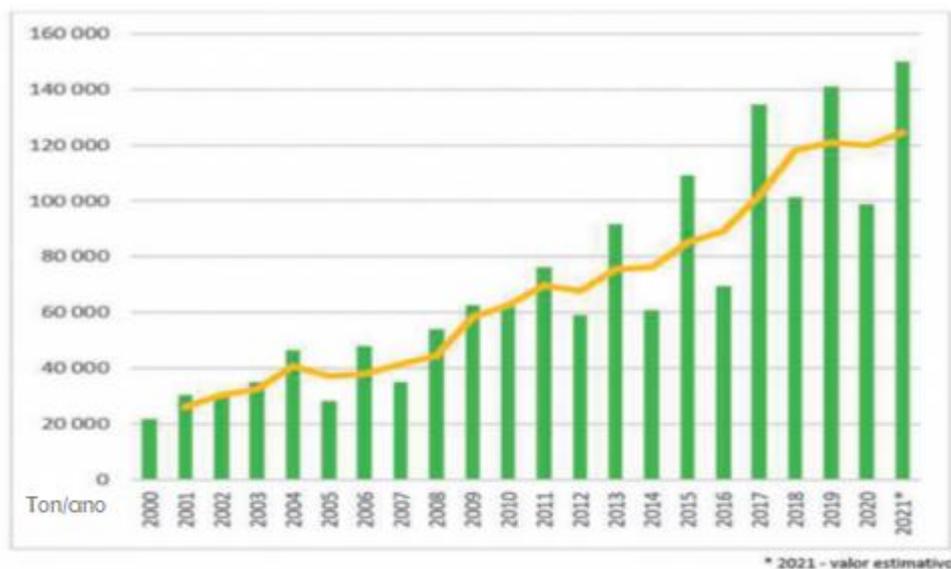


Figura 1 - Registo de produção nacional de azeite (Adaptado de Matos, 2021).

Relativamente à sua morfologia, a oliveira é uma árvore de crescimento lento e com grande longevidade, de folhagem persistente e de raízes fasciculadas, que dependendo

do tipo de solo, ocupam maioritariamente os 80 cm iniciais (Rodrigues & Correia, 2009).

Com um ciclo anual que se inicia em março, com o aparecimento dos primeiros rebentos terminais e eclosão de gomos axilares, inicia floração em final de abril princípio de maio, prolongando-se esta até ao início de junho, dependendo da região e das cultivares. O vingamento do fruto ocorre entre junho e julho e consecutivamente dá-se o endurecimento do caroço, sendo este o momento em que os frutos começam a ganhar calibre. Em outubro inicia-se o amadurecimento da drupa, que continua até esta atingir o estágio ótimo de colheita, definida pelo teor oleico (Garcia,2005).

É uma espécie perfeitamente adaptada ao clima mediterrâneo, caracterizado por invernos suaves e verões quentes, longos e maioritariamente secos. Sendo uma planta bianual, irá dar origem a novos lançamentos foliares que posteriormente darão fruto no ano seguinte. Inicia o seu repouso vegetativo no fim do Outono com o decréscimo da temperatura e suporta os valores baixos atingidos por esta no inverno, sendo que a temperaturas inferiores a 10°C podem causar a morte a ramos e inclusive à parte aérea da oliveira (Navarro & Parra, 2004).

2.2. Descrição da cultivar estudada ('Galega Vulgar')

A cultivar 'Galega Vulgar', representada na figura 2, foi em tempos das mais cultivadas no país, desde a Beira Interior até ao Algarve, nos olivais extensivos que, com o passar dos anos, deram lugar à produção intensiva de outras cultivares, principalmente pela suscetibilidade da mesma a pragas e doenças tais como a Gafa, a Mosca, e a Tuberculose. (Cordeiro *et al.*, 2010).



Figura 2 - Cultivar 'Galega Vulgar' durante estado de maturação (Adaptado de Rodrigues & Correia, 2009).

É também característica desta cultivar uma entrada em produção precoce, uma grande produtividade em anos de safra, mas uma grande alternância produtiva (Cordeiro *et al*, 2010).

A nível de enraizamento por estacaria, a obtenção de raízes adventícias nesta cultivar é muito reduzida na estacaria semilenhosa, sendo que apenas esporadicamente se conseguem ultrapassar os 10% de estacas enraizadas (Peixe *et al.*, 2007).



Figura 3 - Folhas e frutos da cultivar de 'Galega Vulgar' (Adaptado de Cordeiro *et al*, 2010).

A cultivar apresenta características morfológicas de vigor elevado e porte ereto, com entrenós de tamanho médio (1-3 cm) e inflorescências de comprimento médio, com uma

relação número de flores/inflorescência médio (18 a 25 flores). As folhas apresentam uma forma elíptico-lanceolada, de largura e comprimento médio e curvatura do limbo plana. O fruto tem como característica uma forma ovoide assimétrica, de ápice pontiagudo e base truncada, de mamilo ausente e lentículas abundantes e pequenas, sendo que no final da fase de maturação se encontra completamente negro. Todos estes aspetos podem ser observados na figura 3. Os rendimentos em azeite desta cultivar são considerados baixos (<18%), mas permitem obter azeite de qualidade regular e levada estabilidade. O endocarpo apresenta forma elíptica, ligeiramente assimétrico na posição A e simétrico na posição B, de diâmetro transversal máximo ao centro, com ápice pontiagudo e base arredondada, de superfície lisa e com (7 a 10) sulcos de distribuição uniforme (Cordeiro *et al*, 2010).

2.3. Formação de raízes adventícias

À exceção da enxertia, a formação de raízes adventícias é a base dos métodos de propagação que se apresentarão no capítulo seguinte.

Segundo Berthon *et al.* (1990), Heloir *et al.* (1996) e Pacurar *et al.* (2014), o processo de formação de raízes adventícias passa por 3 distintas fases, sendo a primeira a indução radicular, que corresponde ao período no qual ocorrem alterações a nível molecular e bioquímico. Posteriormente, segue-se a iniciação, ocorrendo logo após a indução radicular, como um evento primordial de organização radicular e, por fim, a expressão, que constitui o desenvolvimento de estruturas e conseqüente emergência de primórdios radiculares.

No entanto, apesar de o processo de formação atravessar as fases anteriormente referidas, existem diferentes tecidos, a partir dos quais se inicia a indução radicular. Assim, o processo pode iniciar-se por organogénese direta, como acontece no caso da cultivar ‘Cobrançosa’, podendo ter origem no câmbio vascular, córtex, periciclo ou feixes vasculares, através de um processo de diferenciação celular, que se verifica maioritariamente em cultivares de fácil enraizamento.

Segundo Porfirio (2016), cultivares de difícil enraizamento tais como a ‘Galega Vulgar’ iniciam a indução de formação de raízes adventícias com origem nas células

parênquimosas do recém-formado calo de cicatrização, após danos mecânicos induzidos no processo de preparação do próprio explante.

Alguns autores defendem que a diferença de capacidade de enraizamento justifica-se devido às características anatómicas da própria cultivar, tais como a espessura e continuidade do anel de esclerênquima. Este anel fibroso, levaria à inibição da formação de raízes ou conexão destas aos sistemas vasculares do explante, sendo uma barreira mecânica à emergência das mesmas (Ciampi & Gellini, 1963; Qrunfleh *et al*, 1994). Posteriormente, verificou-se que este mesmo anel de 3 a 6 camadas de células, não restringe o enraizamento pelo facto de se desagregar durante o processo de enraizamento, mesmo em cultivares onde ocorre apenas a formação de calo e não a formação radicular (Ayoub & Qrunflesh 2006, 2008).

Podemos assim afirmar que a capacidade de enraizamento da oliveira, a par de outras espécies, mesmo que auxiliado por reguladores de crescimento, depende do genótipo com que trabalhamos. Exemplo disso, é a comparação entre as oliveiras das cultivares ‘Cobrançosa’ e ‘Galega Vulgar’, em que, a primeira, apresenta taxas de formação de raízes adventícias de 70%, enquanto na segunda, como já referido anteriormente, dificilmente se conseguem taxas superiores a 10%, isto, quando propagadas nas mesmas condições por estacaria semilenhosa (Peixe, 2007).

A formação de raízes adventícias é recorrentemente auxiliada por indutores de enraizamento, sendo as auxinas as fitohormonas mais utilizadas e com melhores resultados na formação das mesmas.

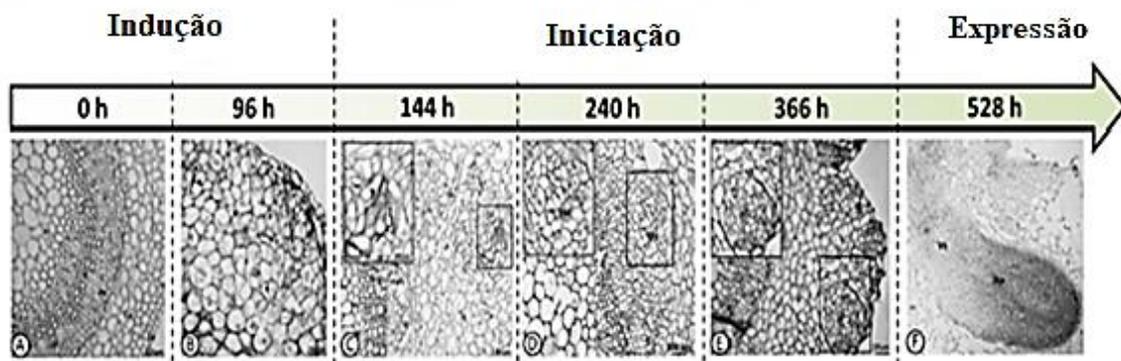


Figura 4 - Eventos histológicos que ocorrem durante a formação de raízes adventícias em estacas de oliveira após tratamento indutivo de raízes com 14.7 mMde AIB. (A) Estrutura anatômica do caule antes do tratamento com AIB, mostra o feixe vascular (Pi,medula; Co, córtex; Ep,epiderme; Ph, floema; X, xilema); (B) células no córtex readquirem características meristemáticas, com citoplasma denso, núcleos grandes e nucléolos visíveis (setas) (Ep, epiderme; Co, córtex); (C) primeiras divisões celulares (Cd) levam à formação do calo; (D) o corte do caule mostra duas estruturas meristemóides (Me) no floema superior; (E) zonas radiculares morfogênicas (Rf) desenvolvendo-se a partir de células subepidérmicas; (F) primórdio radicular (Rp), coifa (rc) e sistema vascular diferenciado (Vs). As ampliações das áreas circuladas são mostradas nas inserções de figuras (Adaptado de Macedo *et al*, 2013).

A figura 4 apresenta um estudo realizado por Macedo *et al* (2013), no qual observou que, explantes de ‘Galega Vulgar’ instalados *in vitro*, iniciam eventos correspondentes à fase de indução radicular, nas primeiras 96 h após efetuado o tratamento com recurso a auxinas, quando as células obtêm características meristemáticas. De 96 h até às 336 h após tratamento, os primórdios meristemáticos foram observados, correspondendo à fase de iniciação. Posteriormente, observou altas taxas de atividade mitótica, levando à fase de expressão, que se terão iniciado 528 h após o tratamento de indução radicular.

Segundo Del Rio *et al.*, (1986), em oliveiras, a concentração endógena de auxinas é um fator limitante ao enraizamento, sendo normalmente necessária a sua aplicação exógena. O Ácido-Indol-3-Butirico, uma auxina sintetizada quimicamente, é recorrentemente utilizado para este fim.

2.4. Técnicas de propagação

2.4.1. Técnicas de propagação tradicionais

2.4.1.1. Propagação através de óvulos

Os óvulos ou *zuecas*, como são conhecidas em Espanha, são protuberâncias onde a circulação de seiva desacelera, normalmente em pontos de união das raízes com o tronco (Garcia, 2005).



Figura 5 - Óvulo de uma oliveira e rebento obtido a partir de um óvulo (Adaptado de Fabbri, 2004).

Este método de propagação, tal como apresentado na figura 5, consiste em retirar estas protuberâncias da árvore através do corte com um instrumento afiado e dividir estas em pequenos pedaços de 15 a 20 cm. Devido ao facto de este material vegetal ser rico em substâncias de reserva e possuir um elevado número de gomos adventícios (Peixe *et al*, 2010), após transplantado para viveiro e colocado num solo arenoso para evitar dessecação do mesmo na altura de transplantação, esta estrutura lenhosa origina um elevado número de rebentos adventícios que depois de escolhidos consoante o vigor pretendido, se podem transferir para local definitivo (Garcia, 2005). O principal inconveniente deste método é a possibilidade de retirar apenas material vegetal em

árvores em fim de vida com o intuito de não condenar as mesmas à morte pela poda vigorosa numa zona crítica à circulação de seiva.

2.4.1.2. Propagação através de pôlas

Esta técnica é idêntica à de propagação através de óvulos, diferindo, no entanto, no material vegetal utilizado.



Figura 6 - Rebentos de oliveira utilizados para multiplicação por Pôlas
(Adaptado de Blog Terramanhada, 2013).

Neste caso, estimulava-se a indução radicular dos rebentos adventícios formados na base da árvore, conhecidos também por pés-de-burro ou burricos, através da cobertura da base dos mesmos com uma camada de terra ou estrangulando o tronco destes com um descasque anelar.

Estes rebentos poderiam posteriormente ser transferidos para viveiro ou até mesmo para local definitivo visto estarem aptos para tal com a presença de sistema radicular. No entanto, as plantas obtidas através desta técnica apresentam um crescimento lento e de

frutificação demorada (Garcia, 2005). A figura 6 retrata o exemplo do que seria uma oliveira preparada para o destaque dos rebentos adventícios.

2.4.1.3. Propagação por mergulhia

Este antigo método de propagação, tal como apresenta a figura 7, consiste em curvar os rebentos adventícios que se encontram no colo da árvore e enterrar parte destes novamente no solo. Esta técnica permite a formação de raízes, e após estas formadas, pode separar-se do pé mãe e colocar as mesmas em local definitivo. É, no entanto, uma técnica morosa e que condiciona a época de colheita pela necessidade de manutenção destes lançamentos no solo ao redor da árvore.

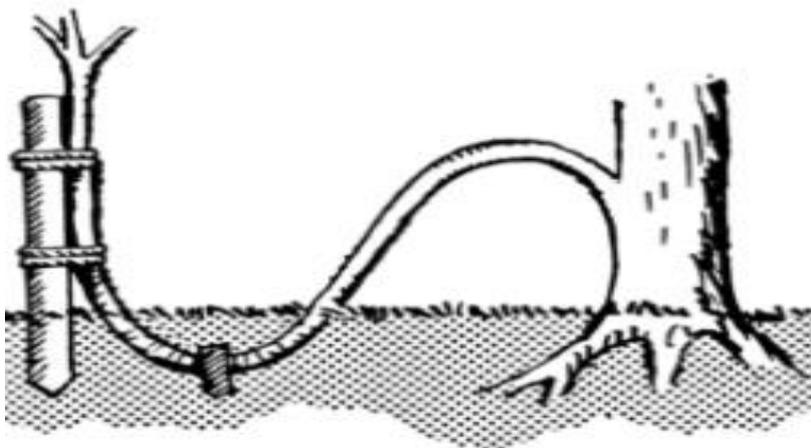


Figura 7 - Exemplo de indução de enraizamento através de mergulhia.

Fonte: <https://www.cultivando.com.br/o-que-e-mergulhia/>.

2.4.1.4. Propagação por estacaria lenhosa

A propagação por estacaria lenhosa é o método mais antigo de propagar a oliveira e, para se obterem os melhores resultados, devem utilizar-se estruturas vegetativas com 2 a 3 anos de idade. Estas estruturas retiram-se de árvores normalmente após a realização de podas vigorosas, sendo então transportadas para uma zona de plantação onde se procede

ao corte em pequenos troços de 25 a 40 cm. Em certos casos, colocam-se as estruturas diretamente em local definitivo, onde após a abertura de uma cova, se colocam três a quatro segmentos de estruturas vegetativas em forma de tripé e com alguma inclinação, de modo a obter rebentos que posteriormente serão conduzidos consoante a requerida quantidade e características físicas tais como o vigor dos mesmos (Garcia, 2005). Podem também ser plantadas as estruturas, após retirado o material vegetal da árvore mãe, num viveiro de grandes dimensões, nas quais estes troços de árvore se dispersem entre 30 a 40 cm de distância, por uma cova com características de solo próprias, sendo o ideal um solo fresco, fértil e húmido (figura 8).



Figura 8 - Viveiro de estacaria lenhosa (Adaptado de Peixe *et al*, 2010).

Após serem retiradas do solo, estas são divididas consoante o número de plantas obtido de cada troço e colocadas em novo viveiro com características de solo idênticas ao destino final, de modo a adaptar as plantas às condições para as quais se destinam em local definitivo.

2.4.1.5. Propagação por enxertia

A propagação através de enxerto é um método bastante antigo que permite difundir cultivares com características de interesse e aproveitar características particulares de

certos porta-enxertos (Peixe *et al*, 2013). Esta técnica pode ser realizada através da enxertia de garfo sobre um porta enxerto obtido seminalmente ou em enxertia de placa já em plantas com 3 a 5 anos de idade, no caso de necessidade de substituição de uma cultivar já instalada no campo, ou em viveiro se pretendido o uso do porta-enxerto devido a características de interesse que o mesmo possua.

No caso da enxertia por garfo, inicia-se com a sementeira da cultivar desejada para servir de porta-enxerto, sendo fulcral utilizar cultivares cuja taxa de germinação da semente seja de percentagem elevada, visto ser um processo moroso até à formação do porta enxerto. Os fatores que limitam a germinação da semente são a dureza do endocarpo e a dormência fisiológica do embrião (Peixe *et al*, 2013).

Posteriormente, após o crescimento das plantas vingadas, é incrustado um troço de material vegetal no porta enxerto, em forma de cunha, e atada a zona de contacto para promover a união de ambos (figura 9).



Figura 9 - Exemplo de enxertia de garfo e cavalo (Adaptado de <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/Section-c.htm>).

A possibilidade de obter porta enxertos com características interessantes tais como a resistência ao *Verticillium dahliae* e de características ananizantes para olivais intensivos, são fatores a ter em conta para justificar o desenvolvimento desta técnica (Peixe *et al*, 2013).

Outro método utilizado é a enxertia de placa (ou borbulha), na qual as taxas de sucesso são bastantes elevadas. Esta técnica, como apresentado na figura 10, consiste na remoção de uma placa, que contenha um gomo de um porta-enxerto e consequente substituição deste espaço por uma nova placa. Esta placa deve retirar-se de um ramo de uma planta com 1 a 2 anos, com as características fenotípicas que queiramos que esta expresse.



Figura 10 - Exemplo de enxerto por placa em oliveira adulta (Adaptado de Lopes & Pinto, 2010).

Posteriormente a zona onde ocorreu esta operação é isolada com manga plástica e aguarda-se o desenvolvimento do novo gomo. Se o enxerto se desenvolver com sucesso, este novo rebento irá expressar as características pretendidas, mantendo as características de interesse referentes ao genótipo do porta enxerto. Este método é recorrentemente utilizado com o intuito de substituir o regenerar árvores afetadas no campo por ação de maquinaria ou acidentes climáticos (Peixe *et al*, 2013).

2.5. Técnicas modernas de propagação

A exigência de maior número de plantas por parte dos agricultores, está diretamente associada ao maior consumo de azeite a nível mundial e, conseqüentemente, ao aumento

de densidades de plantas por hectare comparativamente aos compassos de cultivo utilizados no passado.

Como tal, desenvolveram-se métodos de propagação para suprimir as necessidades exigidas aos viveiristas.

2.5.1. Propagação por estacaria semi-lenhosa

O processo inicia-se com colheita de varas que, segundo Natividade (1943), apresentam maior taxa de enraizamento caso obtidas entre a altura da colheita de azeitona e o início do abrolhamento primaveril, sendo os ramos estiolados os que melhor resultados apresentaram, no que toca a material vegetal. Como tal, o material vegetal deve ser recolhido de lançamentos anuais de campos de plantas mãe, cujo único objetivo é o de fornecer estacas para propagação. Após a colheita de estacas, os restantes ramos provenientes dos pés-mãe são cortados e esperam-se novos lançamentos para repetir o processo.

Estas estacas, providas de folhas, são colocadas em estufas de enraizamento de modo a iniciar a emissão de raízes na base das estacas, fase esta que é denominada por fase de enraizamento. Nestas câmaras, encontram-se condições de humidade na ordem dos 100%, garantida por aspersores de nebulização centrados nas mesas, e temperatura entre 20 e 25°C garantida por condutas de água conduzidas no fundo da bancada de enraizamento, fomentando um diferencial positivo entre a temperatura basal e a temperatura ambiente. De modo a fomentar o enraizamento, são utilizados diversos tipos de substratos, sendo os mais comuns à base de Perlite, Vermiculite, gravilha e areia, sendo normal o período de enraizamento decorrer durante 60 dias (Peixe *et al*, 2013). A figura 11 retrata uma cama de perlite em uso, com as respetivas estacas a enraizar.

A técnica baseia-se na compensação de humidade que pequenas estacas de lançamentos do ano perdem, através da transpiração das folhas, devido à ausência de sistema radicular. A nebulização permite um aumento da tensão de vapor, mantendo as folhas das estacas com uma fina película de água e diminuindo consecutivamente a temperatura dos tecidos das folhas. Este efeito permite reduzir ao mínimo a transpiração

por parte das folhas e manter as mesmas na estaca durante o processo de formação radicular (Garcia, 2005).



Figura 11- Exemplo de bancada de enraizamento com cama de Perlite (Adaptado de https://olivopampa.com.br/?page_id=6978).

Um dos principais fatores que influencia a rizogênese, é o tratamento da base das estacas com reguladores de crescimento, mais propriamente à base de auxinas, tais como o ácido-indolbutírico (AIB). Ensaios realizados no Centro de Melhoria e Demonstrações Técnicas de Córdoba, em diversas variedades, tipos de estaca e concentrações de AIB, apresentaram resultados que indicam uma concentração em AIB ideal na ordem dos 3 000ppm (Garcia, 2005).

Por fim, quando enraizadas, as estacas são ensacadas ou envasadas e transferidas por norma para um estufim onde realizam o processo de aclimatação e é reduzido o processo de nebulização gradualmente (Garcia, 2005). Posteriormente, depois de aclimatadas, as plantas estão prontas a ser transferidas para local definitivo.

Segundo ensaios realizados na província de Córdoba pelo Departamento de Olivicultura do Centro de Investigação e Desenvolvimento Agrário (CIDA), em colaboração com a

Direção de Produção Vegetal da Delegação de Agricultura de Córdoba, compararam-se diversos métodos de propagação vegetal com esta técnica. Comparativamente aos métodos mais antigos de propagação vegetal, verificaram-se melhores resultados através da propagação por estacaria semilenhosa, na qual se observou crescimento vegetativo consideravelmente superior e a redução de um ano de período improdutivo após plantação, compensando deste modo custos acrescidos associados à elaboração da técnica e facilidade de condução da planta através da poda de formação realizada no período de aclimação, ainda em viveiro (Garcia, 2005).

2.5.2. Propagação *in vitro*

De acordo com Boustany *et al.* (2019), a propagação *in vitro*, tem como objetivo promover a proliferação de diferentes partes de plantas, sob ambiente intensamente controlado num contexto de produção em larga escala.

O recurso a esta técnica de propagação permite-nos, a partir de pequenos segmentos de tecidos provenientes de plantas mãe, obter uma vasta quantidade de plantas com características idênticas entre si.

Segundo Thorpe (2007), as plantas produzidas *in vitro* por se desenvolverem em ambiente totalmente isento de contaminantes, possuem características superiores comparativamente a plantas produzidas por propagação através de métodos convencionais tais como a estacaria.

No entanto, os principais fatores de interesse para a realização da técnica, consistem na standardização de um processo de rápida propagação de cultivares de difícil enraizamento por métodos tradicionais, aliada com a produção de plantas livres de vírus, quando a cultura de meristemas é utilizada e ainda a possibilidade de conservação de germoplasma (Lambardi & Rugini, 2003).

2.5.2.1. Os meios de cultura

Autores como Rkhis *et al.*, (2011), ou Zuccherelli & Zuccherelli (2002) reconheceram que o meio de cultura Olive Medium (OM), desenvolvido por Rugini em 1984, contém os elementos macro e micro essenciais para a proliferação de cultura *in vitro* para oliveira. A presença de manitol como fonte de carbono e zeatina como regulador de crescimento para os explantes permitiu o desenvolvimento dos mesmos com elevadas taxas de multiplicação nos ensaios realizados.

Rugini (1984) documentou que dentro das citocininas, a zeatina é o melhor regulador de crescimento para a rápida proliferação de explantes em oliveira. Porém, o uso de zeatina como regulador de crescimento torna o método caro, pelo que Peixe *et al.*,(2007) conduziu um estudo no qual testou o uso de BAP e água de coco como alternativa à zeatina, conseguindo com estes o enraizamento de ‘Galega Vulgar’, não tendo todavia resultado com outras cultivares.

No que diz respeito aos constituintes do meio de cultura, a água é o componente mais abundante, visto ser utilizado como base de elaboração do mesmo. De modo a assegurar a sua esterilidade, esta é purificada antes do seu uso, devido à possibilidade de contaminações associada à mesma, podendo colocar em risco todo o processo de multiplicação. Recorrentemente, a água é destilada de modo a eliminar compostos orgânicos ou, se possível, filtrada através de um processo de osmose inversa. Para assegurar que a sua composição mineral não altera a composição do meio de cultura, antes de esterilizada a água deve ser desmineralizada.

Além de água, o uso de agentes gelificantes tais como o agar-agar ou a gelrite, permitem fornecer a consistência necessária ao meio de cultura, assegurando o suporte dos explantes e permitindo posteriormente fomentar o crescimento radicular dos mesmos.

No que diz respeito aos sais minerais utilizados, estes dividem-se em macronutrientes e micronutrientes, e são utilizados respetivamente em quantidades milimolares e micromolares.

Aliados a estes, os hidratos de carbono atuam como fonte de energia para os tecidos vegetais, visto a capacidade fotossintética dos explantes ser nula. Segundo Peixe

(comunicação pessoal), permitem também regular o potencial osmótico no próprio meio de cultura, sendo a sacarose recorrentemente utilizada em vários protocolos de micropropagação. Não sendo a sacarose o ideal para meios de propagação de oliveira, Leva (2011), propôs a sua substituição por manitol, sendo este nos dias de hoje, bastante utilizado em protocolos de propagação de oliveira (Peixe, 2013).

2.5.2.2. As plantas mãe

O trabalho de micropropagação *in vitro* inicia-se com a recolha de material vegetal necessário para a instalação da cultura. O material vegetal que dará origem ao explante inicial da cultura *in vitro*, é obtido a partir de estacas uninodais pertencentes ao crescimento do ano, com o objetivo de fomentar o rebentamento axilar proveniente das células meristemáticas presentes no mesmo.

Relativamente à idade do explante inicial, verifica-se melhor resposta quando utilizados explantes próximos da condição juvenil provenientes de crescimentos do ano de 15 a 20 cm de comprimento, segmentados em troços com um nó comprimento de 1 a 2 cm, como representado na figura 12. Após a remoção de folhas dos mesmos, estes são colocados em meio de cultura OM dando início à instalação da cultura (Ribeiro, 2016).



Figura 12 - Preparação de explante para instalar a cultura *in vitro*.

De acordo com Peixe (2020), o crescimento, a morfogénese e as taxas de enraizamento obtidas estão diretamente associadas à recolha do explante, sendo fulcral para obter sucesso no procedimento, a desinfeção do mesmo e a realização de testes com o intuito de despistar problemas fitossanitários tais como viroses.

2.5.2.3. As fases do processo

2.5.2.3.1. Fase de iniciação asséptica

A iniciação asséptica, tem como objetivo garantir a desinfeção de todo o material vegetal, removendo os agentes patogénicos que podem colocar em causa toda a taxa de sucesso do método, através de problemas tais como oxidações e desenvolvimento de fungos, ou bactérias no meio de cultura.

Martino *et al* (1999) obteve sucesso no processo de esterilização e conseqüentemente elevadas taxas de sobrevivência de explantes de ‘Moraiolo’ após imersão dos mesmos durante 5 minutos em 0.05-0.1% de HgCl₂, posteriormente enxaguados em água esterilizada e tratada com 15% de hipoclorito de sódio, e seguido de novo enxaguamento por três vezes em água estéril.

O procedimento de lavagem em água corrente durante 30 minutos seguida de imersão em solução agitada de 12% de hipoclorito de sódio por 8 minutos, terminando com a lavagem por 3 vezes em água destilada esterilizada, verifica-se eficaz, de acordo com Ribeiro (2016).

2.5.2.4. Fase de Multiplicação e Alongamento

Posteriormente à obtenção de explantes isentos de contaminações durante a fase de iniciação asséptica, dá-se início à fase de multiplicação. Esta fase tem como objetivo garantir taxas de sucesso elevadas, que permitam a propagação de material vegetal em larga escala, sendo que há repetição consecutiva deste processo ao longo do ciclo de multiplicação, pela necessidade de obter clones doadores de material vegetal de modo a criar uma alta taxa de multiplicação.

Geralmente, nesta fase é importante o balanço de reguladores de crescimento adicionados ao meio, assim como o fornecimento adequado de nutrientes orgânicos e inorgânicos de modo a favorecer o rápido crescimento dos propágulos. De acordo com Cançado Braga, Souza, Nunes, Ribeiro e Soares (2012), o recurso a iluminação e humidade relativa controlada fomentam um crescimento mais rápido dos explantes.

Porém, a proliferação de lançamentos é uma dificuldade no processo dependendo do genótipo utilizado, e da concentração de citocininas presentes no meio de cultura (Radmann *et al.*,2011).

Os explantes, aos quais podemos chamar “Propágulos”, têm esta denominação pelo facto de poderem ser propagados ou multiplicados em sucessivas subculturas para obtenção de novo material de propagação em quantidades superiores.

Estes explantes, obtidos de rebentos axilares de material propagado inicialmente, são posteriormente fragmentados em pequenos lançamentos uninodais e colocados em meio de cultura, no qual se promove o seu alongamento.

Posteriormente, transferem-se para meio com teor auxínico elevado, de modo a induzir o seu enraizamento.

2.5.2.5. Fase de indução radicular

2.5.2.5.1. Enrizamento *in vitro*

A rizogénese é considerada uma fase de grande importância no processo de propagação *in vitro* visto influenciar diretamente a seguinte fase de aclimatização de explantes em ambiente externo (*ex vitro*), (Rocha *et al*, 2008).

A necessidade de indução radicular, está associada à capacidade de a planta equilibrar o processo evapotranspiratório realizado pela sua parte superior. A indução radicular é regularmente realizada através de aplicação de auxinas no meio de cultura, sendo que as mesmas promovem o alongamento celular e conseqüentemente, o desenvolvimento de raízes adventícias. No entanto, auxinas em excesso podem inibir a rizogénese e promover a calogénese (Cançado *et al*, 2012).

Outro fator a ter em conta no enraizamento de explantes, tem sido o recurso a carvão ativado em meio de cultura. Este permite a absorção de compostos fenólicos prejudiciais para a planta, que podem levar à inibição de desenvolvimento radicular ou até morte do explante, tais como oxidações. Além dos benefícios descritos, o uso desta substância permite o escurecimento do meio de cultura, aumentando a percentagem de enraizamento *in vitro*, quando os valores associados a uma dada cultivar são reduzidos, comparativamente ao mesmo meio em presença de luz (Mencuccini, 2003).

Também Mencuccini (1995) documentou que a proliferação de raízes poderia ser alcançada mantendo a cultura em ambiente escuro. Este fenómeno foi observado também por Rugini *et al.*, (1993) ao pintar a base dos frascos de cultura.

Porém, mesmo obtendo um correto enraizamento na fase anteriormente descrita, a fase de aclimação é uma barreira, pelo facto das plantas se transferirem com raiz nua, e a maioria das raízes adventícias com as quais as plantas são transferidas, não se encontrarem funcionais.

2.5.2.5.2. Enraizamento *ex vitro* e pré-aclimatização

Com o intuito de reduzir os custos de produção e mão de obra inerente ao método de propagação *in vitro*, Viriato (2016) utilizou clones de cultivar 1441 e 2022 do Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora que, após imersão em solução auxínica de ANA e AIB (540 ppm e 3000ppm), colocou em substrato de Jiffy Preformas®, pastilhas de coco prensadas ou meio OM, consoante o tratamento. Concluiu com os ensaios realizados que o clone que melhor resultados obteve foi o 1441, e que a auxina que mais favoreceu a expressão radicular foi o AIB devido à sua estabilidade entre o eficiente e a possível toxicidade para os explantes. Porém, devido a um número elevado de contaminações nos meios de cultura utilizados, não foi possível tirar conclusões entre o enraizamento *ex vitro* * *in vitro*.

Também Leva (2011), testou a exequibilidade de um tratamento idêntico, ao utilizar explantes de cultivar ‘Coratina’, ‘Murino’, ‘Correggiolo’, ‘Frantoio’, ‘Maremmano’, ‘Picholine’ e ‘S.Francesco’ no qual promoveu a fase de iniciação e enraizamento em substrato de fibra de coco, após imersão rápida em solução de ANA a 500ppm. Estas cultivares tiveram proveniência de diferentes subculturas (5, 6 e 7 especificamente) e após transferência para *ex vitro*, mantiveram-se em condições controladas de 25°C, humidade relativa de 80-85%, uma radiação 40 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, variando o fotoperíodo aos quais os explantes foram expostos, entre fotoperíodo contínuo e fotoperíodo de 16h de ausência de luz.

Leva (2011) observou a formação de raízes adventícias em todas as cultivares testadas, sendo que, os melhores resultados obtiveram-se nas cultivares com maior número de subculturas antes da transferência para *ex vitro*, aliada à presença de luz contínua sendo esta um pré-requisito para o sucesso do método. Os explantes expostos ao fotoperíodo

de 16h apresentaram enraizamento insignificante e não sobreviveram ao processo de aclimação.

Obtiveram-se também diferenças no enraizamento entre as cultivares utilizadas, sendo a ‘S.Francesco’ a cultivar que melhores taxas de enraizamento obteve com 76%, comparativamente às cultivares ‘Correggiolo’ e ‘Frantoio’ que obtiveram 28% e 40 % respetivamente.

2.5.2.6. Fase de aclimação de explantes enraizados *in vitro*

A fase de aclimação, visa fornecer aos explantes, condições propícias para o seu posterior desenvolvimento, visto estes serem suscetíveis a stresses no processo de transplante de meio de cultura. Como tal, deve-se permitir a adaptação da planta ao meio ao fornecer condições autotróficas, diminuindo a humidade relativa dos recipientes de cultura (Peixe, A., comunicação pessoal).

Um fator de grande importância no processo de aclimação, é a necessidade de fomentar a síntese de cutina das folhas. Esta necessidade deve-se ao facto de a cutina estar diretamente ligada à abertura estomática, e sendo a humidade relativa elevada, a planta reduz a síntese de cutina e o processo de abertura e fecho dos estomas é insuficiente, podendo levar à desidratação da planta. O aumento da síntese pode ser fomentado com a substituição da tampa dos frascos de cultura por filme plástico, sendo que este é furado gradualmente, de modo a equilibrar o gradiente de humidades existente dentro e fora dos frascos (Cançado *et al*,2012).

3. Material e métodos

3.1. Local de trabalho

Todos os ensaios realizados e conseqüente obtenção de resultados, tomaram lugar no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora.

3.2. Materiais

3.2.1. Material vegetal

Foram utilizados explantes uninodais de três distintos clones de cultivar de ‘Galega vulgar’ já instalados em cultura *in vitro*, no Laboratório de Melhoramento da Universidade de Évora.

Estes clones, tiveram origem num programa de seleção clonal iniciado pelo Professor Antero Martins e pelo Engenheiro Luis Santos, pertencentes ao Instituto Superior de Agronomia e Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, respetivamente. A seleção clonal realizada, foi avaliada posteriormente no âmbito do projeto Agro 683, que consistia no desenvolvimento integrado de estratégias para reabilitação da cultivar ‘Galega vulgar’, como cultivar de charneira no património oleícola Nacional, com o intuito de apurar a capacidade de enraizamento, presença de vírus, capacidade produtiva e teores de gordura na matéria seca.

Dos clones avaliados, foram instalados em cultura *in vitro* os identificados com as referências cl2022; cl1053 e cl1441, que foram utilizados nos ensaios.

3.2.2. Meios de cultura e substratos utilizados

3.2.2.1. Meios de cultura

O meio de cultura base utilizado em ambas as fases de multiplicação e de expressão do enraizamento, foi o meio OM (Olive Medium) proposto por Rugini (1984).

Este meio foi especialmente desenvolvido para a estimular a formação de gomos axilares e crescimento de rebentos nas estacas multiplicadas. Uma das principais características deste, é o uso de azoto orgânico e uma concentração superior de Ca, S, P, B, Cu, Zn e Mg relativamente ao meio MS, também muito utilizado em cultura *in vitro* (Peixe, 2013).

A tabela 2 apresenta os constituintes do meio de cultura OM que foi utilizado durante todas as fases do ciclo de cultura *in vitro*.

Para além da composição mineral, vitaminas e aminoácidos que compõem o meio de cultura, também se utilizaram reguladores de crescimento em função do objetivo pretendido em cada fase de desenvolvimento da cultura.

Macronutrientes	mg L⁻¹
CaCl ₂	333,2
KNO ₃	1100
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	600
KCl	500
MgSO ₄ 7H ₂ O	1500
KH ₂ PO ₄	340
NH ₄ NO ₃	412
Micronutrientes	mg L⁻¹
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3
H ₃ BO ₃	12,4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	14,3
NaMoO ₄ H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
KI	0,83
Fe-EDTA	mg L⁻¹
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	41,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,85
Vitaminas	mg L⁻¹
Tiamina HCL	0,5
Ácido nicotínico	5
Piridoxina HCL	0,5
Ácido Fólico	0,5
Biotina	0,05
Glicina	2
Mio-inositol	100
Aminoácidos	mg L⁻¹
L-Glutamina	2194

Tabela 2 - Composição de meio de cultura OM (Adaptado de Rugini, 1984).

3.2.2.2. Substratos utilizados

Com o intuito de permitir a expressão radical após a iniciação realizada em meio de cultura ou, no caso de um dos tratamentos efetuados em que se colocaram os explantes diretamente após imersão rápida em solução concentrada de AIB (ver cap. 3.3.6), utilizaram-se pequenos cubos de substrato, constituídos por uma mistura de turfa e fibra de coco, num rácio de (30-70%) de seu nome Jiffy®Preformas. Estes pequenos alvéolos de substrato contém um teor de humidade elevado e possuem um pH entre 4.7 e 5.3.

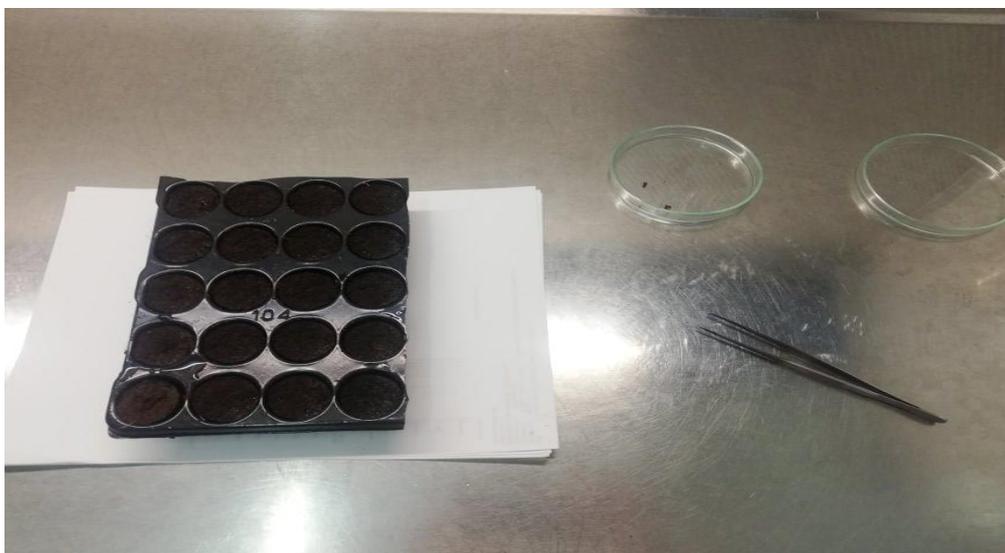


Figura 13 - Jiffy®Preformas já seccionado e pronto a receber os explantes.

O seu fornecimento é realizado em placas plásticas de 104 alvéolos, que possibilitam o seu corte ao tamanho desejado para inserção em caixas plásticas utilizadas na fase de expressão radical, tal como demonstra a figura 13.

De modo a possibilitar o correto alongamento radical durante a fase de aclimação, utilizaram-se Jiffy®Growblock's, representados na figura 14, que consistem em cubos de fibra de coco desidratada, e que, após a sua hidratação, acolhem o alvéolo de Jiffy®Preformas, permitindo receber plantas com raiz protegida com total facilidade.



Figura 14 - Jiffy® Growblocks previamente à da sua hidratação.



Figura 15 - Cultura instalada em tabuleiros plásticos em condições de estufa.

Os Jiffy®Growblock's, após hidratação em água, utilizaram-se com recurso a tabuleiros de plástico de 40 alvéolos, como se pode observar na figura 15, o que permitiu manter as plantas bastante próximas umas das outras, auxiliando a manipulação dos mesmos.

3.2.2.3. Recipientes de enraizamento e aclimação

Utilizaram-se frascos de vidro no processo de multiplicação de explantes e na indução de enraizamento para os tratamentos que se conduziram em cultura *in vitro*, previamente à colocação destes em substrato. Estes frascos, de 480ml de volume, foram fechados com duas tiras de plástico parafilm cruzado (figura 16) de modo a reduzir as trocas de humidade do meio com o exterior, permitindo as mesmas em caso de humidade excessiva, sem comprometer a esterilidade do seu interior.



Figura 16 - Frascos de cultura fechados com parafilm.

No momento de colocação dos explantes em substrato, recorreu-se ao uso de caixas plásticas, representadas na figura 17, que albergam as Jiffy®Preformas nos seus respetivos tabuleiros, cortados á medida destas. Cada caixa possui a capacidade de acolher 20 explantes, a mesma quantidade de explantes presentes em cada frasco de vidro na fase de enraizamento. A principal particularidade destas caixas, é a capacidade de permuta de trocas gasosas com o exterior, sem que ocorra perda da elevada humidade que esta contem, derivado de uma película porosa colocada na tampa das mesmas.



Figura 17 - Caixas plásticas após instalação de cultura em Jiffy® Preformas.

A figura 18 apresenta as campânulas utilizadas durante a fase de aclimação, sendo estas campânulas de plástico com cobertura de acrílico, utilizadas para colocar os tabuleiros de Jiffy®Growblocks, permitindo manter a humidade relativa superior à existente no meio envolvente.



Figura 18 - Campânulas utilizadas durante a fase de aclimação.

Além destes, foram utilizados diversos materiais de corte e suporte, tais como pinças e bisturis, utilizados regularmente nos métodos de propagação *in vitro* para manusear os explantes nas distintas fases do processo.

3.3. Métodos

3.3.1. Esterilização de materiais

De modo a assegurar a esterilidade do meio de cultura e dos próprios explantes, toda a manipulação realizada no processo de propagação *in vitro*, realizou-se no perímetro estéril de uma câmara de fluxo laminar horizontal.

Durante o processo de manipulação e corte dos explantes, utilizaram-se folhas de jornal esterilizado durante 120 minutos a 180°C de temperatura com recurso a uma estufa. Os utensílios utilizados durante a preparação e repicagem de explantes dividiram-se em três

conjuntos, sendo cada conjunto constituído por pinça, bisturi e lança. O uso de três distintos conjuntos permitiu a esterilização, arrefecimento e manipulação de explantes sem que operador cessa-se o ritmo de trabalho.

A esterilização dos utensílios consistiu na colocação destes em etanol a 70° e de seguida, a permanência dos mesmos em esterilizador de esferas de vidro durante 1 minuto. Após o tempo de esterilização concluído, cada conjunto arrefeceu até a temperatura ambiente, antes de voltar a ser colocado em uso.

3.3.2. Preparação de material vegetal

O processo de multiplicação *in vitro* foi iniciado a partir de clones instalados em laboratório, com o objetivo de obter explantes em quantidades suficientes para a realização dos ensaios pretendidos.

Para tal, colocaram-se em frascos de cultura, explantes uninodais de 1 cm de comprimento durante 30 dias, em meio OM de multiplicação. Cada frasco tem capacidade de albergar 100 explantes e após perfazer os 30 dias, os explantes retiraram-se destes e foi removido o calo existente nos mesmos, a par das folhas em excesso. Posteriormente colocaram-se de novo em meio de multiplicação durante 30 dias até atingirem o comprimento ideal.

Ao fim de 30 dias (60 desde a instalação dos mesmos em fase de multiplicação), os explantes atingiram os 6 cm de comprimento e procedeu-se à escolha daqueles que apresentavam melhores características de interesse, tais como o vigor, de modo a iniciar a fase de enraizamento.

Com o intuito de fomentar a fase de indução radicular em certos tratamentos, realizou-se a indução prévia dos explantes em solução de AIB com uma concentração de 3000 mg/L durante 10 segundos, seguida da colocação destes em meio de cultura OM sem reguladores de crescimento adicionados durante um período de 7 dias. Outros tratamentos realizaram a indução radicular com a adição de AIB diretamente ao meio de cultura, com uma concentração de 3 mg/L, no qual se mantiveram durante 3 e 5 dias respetivamente (ver cap. 3.3.7.).

Para proceder ao enraizamento, colocaram-se em frascos de cultura contendo meio OM de enraizamento, cerca de 15 explantes com 4 a 6 folhas terminais cada um, e 3 a 4 entrenós, dependendo da distância entre os mesmos de modo a respeitar a uniformidade de explantes, como podemos observar na figura 19. O corte dos explantes realizou-se junto à base e abaixo de um entrenó, de modo a remover o calo formado durante a fase de multiplicação.

De cada frasco de 100 explantes obtidos através da fase de multiplicação, apenas se utilizaram 15 a 25 durante a fase de enraizamento, sendo que o restante foi utilizado posteriormente para assegurar a continuidade de multiplicação para novos ensaios.



Figura 19 - Explantes instalados *in vitro* em meio de enraizamento.

3.3.3. Preparação do meio de cultura

3.3.3.1. Preparação de meio de cultura *in vitro* para multiplicação vegetal

Tal como descrito anteriormente (ver cap. 3.2.2.1), tanto para a fase de multiplicação como para a fase de expressão de enraizamento, o meio de cultura base utilizado foi o OM.

Para a preparação deste, foram pesados e diluídos em água destilada, pela ordem representada na tabela 1, 200 ml de macronutrientes, 20 ml de micronutrientes e 20 ml de quelatos de ferro, num balão volumétrico de 2 L de volume.

Este volume de 2 L, permitiu a elaboração de cerca de 10 frascos de cultura, com cerca de +- 200 ml de volume por frasco. Dentro do balão volumétrico, um agitador magnético homogeneizou a solução à medida que os componentes desta se adicionaram.

Posteriormente, adicionou-se ao meio, 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de D-Mannitol.

Seguidamente, o pH foi ajustado para um valor de 5.8, após lavagem e secagem do eléctrodo do medidor de modo a garantir uma leitura correta do mesmo. Por norma, o pH obtido após as anteriores dissoluções, aproxima-se de um valor de pH de 4, sendo este corrigido com KOH (Hidróxido de potássio) até obtermos o valor pretendido.

Depois de corrigido o pH, a solução foi dividida em dois Erlenmeyer's de 1 L cada, contendo o agente gelificante, neste caso agar-agar, numa concentração de 7g L⁻¹ e colocou-se em autoclave a 121°C de temperatura durante 20 minutos, de modo a garantir a esterilização do meio.

Alguns ensaios foram realizados com inserção de AIB diretamente no meio de cultura, tendo sido este aplicado numa concentração de 3 mg/l.

Posteriormente, adicionou-se 1 mg L⁻¹ de Zeatina (por filtração), as vitaminas previamente filtradas e esterilizadas, e o meio foi distribuído pelos frascos de cultura, autoclavados previamente, no perímetro estéril da câmara de fluxo laminar.

Depois de solidificado, procedeu-se à selagem dos frascos com película aderente, de modo a garantir a inibição de uma possível contaminação com o meio exterior.

3.3.3.2. Preparação de meio de cultura *in vitro* para enraizamento

O processo de elaboração do meio de cultura *in vitro* para expressão de enraizamento, foi idêntico ao do meio de multiplicação.

No entanto, diferiu pelo facto de a alguns destes meios, ter sido adicionado carvão ativado numa concentração de 2 g/l com o intuito de escurecer o mesmo, de modo a

avaliar a relação da presença e inibição de luz no meio de cultura, com a taxa de enraizamento obtida.

3.3.3.3. Preparação de solução de AIB para realização de pulse

O AIB é uma hormona vegetal, que fomenta o enraizamento de caules, sendo limitante em cultivares de difícil enraizamento de oliveira.

Esta solução, foi realizada com o intuito de uma imersão (Pulse) da base das estacas a enraizar, antes da colocação destas em meio de cultura, e nos tratamentos aos quais não se adicionou AIB ao meio de cultura.

Como tal, os reguladores de crescimento foram colocados num copo de precipitação, numa concentração de 0.3 mg/l e dissolvidos em Hidróxido de Sódio (NaOH). Posteriormente, foi feito o volume pretendido com água destilada e ajustado o valor de pH, sendo o valor pretendido entre 6 e 7. Para corrigir o pH, utilizou-se HCL (Ácido Clorídrico).

De seguida, a solução foi filtrada com um filtro de 0.22 μ no perímetro da câmara de fluxo laminar de forma a garantir um ambiente estéril durante o processo e, posteriormente, colocou-se em frasco estéril com o intuito de prevenir possíveis contaminações num posterior contacto com o meio de cultura.

Por fim, etiquetou-se o recipiente no qual se manteve até a sua utilização e armazenou-se em câmara fria, envolvido em papel de alumínio de modo a prevenir a sua fotodegradação.

3.3.4. Preparação de substratos *ex vitro*

Nesta etapa, foram preparados os alvéolos de Jiffy®Preformas, de modo a instalar as estacas provenientes de meio de multiplicação ou, no caso de um tratamento em específico, que após indução em AIB através da técnica de pulse, se instalou nos substratos em questão. Estes alvéolos são recebidos com um grau considerável de humidade, tendo sido hidratados com água pura previamente e posteriormente à

colocação da estaca, de modo a garantir uma zona de contacto homogénea com o material vegetal. Além de fomentar o melhor enraizamento da estaca, permitiu ainda uma rápida condensação da campânula de aclimação, sendo este um fator de extrema importância para evitar stress de transplantação e garantir as condições ótimas de proliferação radicular.

Relativamente aos Jiffy®Growblocks, realizou-se a hidratação destes previamente à transplantação, até atingirem o seu volume original, nos quais se inseriram os alvéolos de Jiffy®Preformas.

3.3.5. Condições de cultura utilizadas

Durante a fase de cultura *in vitro*, os explantes permaneceram em sala de crescimento de plantas, iluminadas com recurso a lâmpadas fluorescentes Osram L 36W/840 *cool white*, com fotoperíodo diário de 16 horas de luz e de intensidade luminosa de 44 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante a fase de multiplicação, sendo esta intensidade aumentada para 81 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante a fase de expressão radicular. Relativamente à temperatura dentro da sala, esta oscilou entre os 24°C e 22°C, durante o período diurno e noturno, respetivamente.

Relativamente à fase de aclimação, esta realizou-se dentro de campânulas colocadas em estufim, com 60% de humidade e temperaturas idênticas às praticadas na sala de crescimento de plantas. A intensidade luminosa durante a fase de aclimação foi aumentada para 238 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ mantendo o fotoperíodo de 16 horas de luz.

A aclimação dentro dos estufins foi realizada com a abertura gradual das grelhas durante as três primeiras semanas, retirando-se as campânulas ao fim da terceira semana. Ao fim da quarta semana, as plantas reuniam condições para se transferirem para a estufa já aclimatadas.

3.3.6. Delineamento experimental e análise de dados

Os objetivos dos ensaios consistiram no teste de três distintos tipos de clones e na comparação entre estes com os distintos tratamentos aos quais foram sujeitos, informação que se resume na tabela 3.

Tratamento	Clone utilizado	Promotor Enr.	Método de aplicação	Indução rad.	Tempo (dias)	Expressão rad.	Tempo (dias)
1		3000 mg L ⁻¹	Pulse de 10 segundos	-	-	OM S/ Reguladores + carvão	30
2		AIB		-	-		
3	Cl. 1441		Adição ao meio <i>in vitro</i>	OM S/ reguladores	7	Jiffy Preformas [®]	
4	Cl. 1053			OM S/ LUZ	3		
5	Cl. 2022			3 mg L ⁻¹ AIB	5		
6				3 mg L ⁻¹ AIB	3		
7				3 mg L ⁻¹ AIB	5		

Tabela 3 - Tratamentos efetuados

A indução de enraizamento, com os referidos clones, dividiu-se entre a imersão em solução de AIB durante 10 segundos, realizada no tratamento 1, 2 e 3, e a adição de AIB a 3 mg L⁻¹ ao meio de cultura nos tratamentos 4, 5, 6 e 7.

O tratamento 2 consistiu na colocação direta dos explantes em substrato Jiffy Preforma[®] após imersão dos explantes em solução de AIB a 3000 mg L⁻¹ enquanto, nos tratamentos 1 e 3, após imersão em AIB, os explantes se colocaram em meio de cultura. Porém, o meio de cultura do tratamento 1 visou promover a expressão radicular com o uso de carvão ativado durante um período de 30 dias em câmara de cultura, ao passo que no tratamento 3, os explantes apenas se mantiveram em meio de cultura a realizar indução radicular durante um período de 7 dias, sem adição de carvão ativado.

Relativamente aos tratamentos 4 e 5, ambos idênticos entre si, nos quais se adicionaram 3 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultura de indução radicular onde se mantiveram por um período de 3 e 5 dias respetivamente, privados de luz, sendo posteriormente repicados para substrato Jiffy Preforma[®] durante um período de 30 dias.

Por fim, os tratamentos 6 e 7 seguiram as condições às quais se submeteram os explantes nos tratamentos 4 e 5, variando apenas o fator luminosidade visto se ter fornecido um fotoperíodo de 16 horas de luz diárias.

Para cada um dos sete tratamentos, realizaram-se três repetições com intervalos de 30 dias e com 20 plantas por repetição, para cada distinto clone, perfazendo um total de 63 frascos de cultura e um somatório de 1260 explantes utilizados na totalidade.

Todos os dados foram testados para avaliar a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação de médias (Fisher's-LSD). Diferenças significativas foram registradas para $P \leq 0.05$.

Os valores em percentagem foram transformados por *arcseno* da raiz quadrada antes da análise estatística.

A Análise de dados foi efetuada através do Software Statistica 12.0.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise das variáveis em estudo

Começamos por apresentar, na Tabela 4, um resumo da análise de variância efetuada aos dados de enraizamento obtidos nos vários tratamentos em análise. Pode verificar-se, que existem diferenças significativas entre tratamentos e entre clones ($p \leq 0.05$). No entanto, não se verificam diferenças significativas para a interação Tratamento x Clone.

Efeitos	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Erro Padrão	F	P
Tratamentos	9076.2	6	1512.7	9.459	0.000001
Clones	2031.0	2	1015.5	6.350	0.003895
Tratamentos x Clones	2819.0	12	234.9	1.469	0.174593
Erro	6719.7	42	159.9		

Tabela 4 - Tabela de análise de variância relativa aos sete tratamentos.

Dos tratamentos realizados, o primeiro corresponde ao controlo pois retratou o processo de enraizamento utilizado em rotina para a oliveira, no Laboratório.

O tratamento 2, por sua vez, corresponde àquele que seria o ideal, tendo em vista a simplificação do processo de enraizamento, porque nesse caso, como previamente descrito (ver cap. 3.3.6), os explantes passam diretamente do meio de multiplicação para a condição *ex vitro*, sem necessidade de passarem por meios de enraizamento em condições de assepsia. A razão pela qual se testou este método baseia-se na praticidade e eliminação de passos anteriores, o que traria uma redução mais drástica de custos de produção, quer em mão de obra, quer em constituintes de meio de cultura para enraizamento.

Como podemos verificar na figura 20, os resultados obtidos com o tratamento 2 não foram melhores do que os já conseguidos no laboratório com o processo de enraizamento *in vitro* (tratamento 1), tendo-se mesmo obtido menores taxas de enraizamento, ainda que não diferindo significativamente entre os dois tratamentos em análise. Como tal, realizaram-se outros tratamentos com a expectativa de obter melhores resultados.

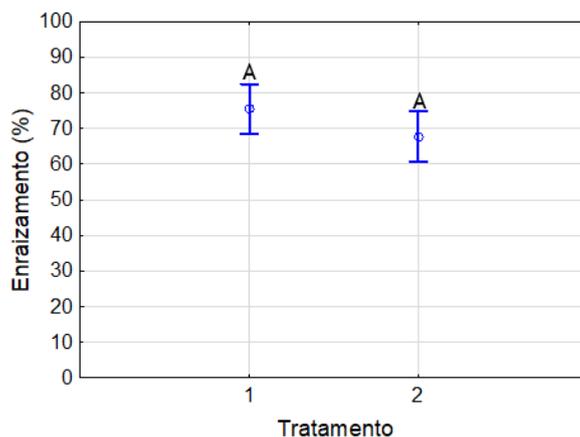


Figura 20 - Comparação entre as taxas de enraizamento obtidas nos ensaios 1 e 2 (LSD 95%).

Viriato (2016) testou tratamentos idênticos utilizando os clones de cultivar 1441 e 2022, também por nós testados. Concluiu que o clone que melhor resultados obteve foi o

1441. No entanto, como previamente descrito (ver cap. 2.5.2.5.2), devido a um número elevado de contaminações nos meios de cultura utilizados, os resultados revelaram-se inconclusivos.

Comparando os resultados no tratamento 2 com os obtidos por Leva (2011), estes divergem no que diz respeito ao enraizamento. Leva (2011) observou um enraizamento quase nulo ao expor explantes *ex vitro* a um fotoperíodo de 16h e, os explantes enraizados, não sobreviveram à fase de aclimação. Porém, no tratamento 2 obteve-se um valor médio de enraizamento de 68% apesar do uso de um fotoperíodo de 16 horas durante a fase de expressão radicular e consequente aclimação.

Com o tratamento 3, ainda com recurso à imersão rápida em AIB, o objetivo foi criar uma primeira fase de indução de enraizamento prévia à colocação dos explantes *ex vitro*. Como pode ver-se na figura 21, o tratamento não se revelou eficaz, sendo dos tratamentos testados com recurso à imersão rápida em AIB, aquele que conduziu às taxas mais baixas de enraizamento, 67% em média, ainda que entre estes três tratamentos, as diferenças não se revelem estatisticamente significativas.

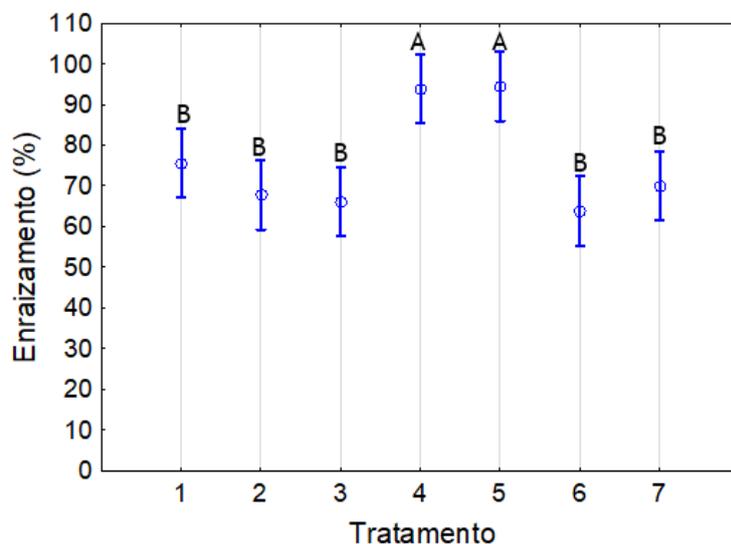


Figura 21 - Variação do enraizamento nos diversos tratamentos (LSD 95%).

A ausência de diferenças significativas deve-se ao facto de a amostragem ser pequena, sendo que com uma maior amostra, as diferenças seriam mais perceptíveis e diminuiriam os valores dos intervalos de confiança observados.

Comparando o tratamento 3 com o tratamento 2, no qual os explantes seguiram diretamente para Jiffy Preformas® após imersão rápida em AIB, verifica-se que os valores de enraizamento obtidos são bastante idênticos e, como tal, o tempo e o custo relacionado com os 7 dias em meio de indução do tratamento 3 não se justificaram, sendo apenas custo acrescido na realização deste tratamento.

O tratamento 1 (controlo), onde os explantes em enraizamento se mantiveram em meio OM em câmara de cultura, acabou por ser o que obteve os melhores resultados entre os três tratamentos até agora descritos, mas, como referido, o inconveniente deste tratamento é o tempo/espço ocupado com a permanência dos explantes em meio de cultura durante 30 dias.

De modo a procurar melhores resultados e otimizar a eficiência do processo, testaram-se os tratamentos 4 e 5, que consistiram na adição direta ao meio OM de 3 mg/L de AIB e consequente colocação dos explantes em câmara escura durante 3 e 5 dias respetivamente, até à transferência destes para Jiffy Preformas®.

Comparando os tratamentos 4 e 5 com o tratamento testemunha, verificamos taxas de enraizamento bastante superiores. Outro fator favorável à adaptação deste método, será a mão de obra exigida para a realização do mesmo, no qual não existe imersão rápida em meio auxínico na pré-instalação no meio de cultura, e onde os custos energéticos pela manutenção dos frascos em sala de cultura se reduzirem a um sexto dos dias utilizados na realização do tratamento testemunha.

No que diz respeito à análise estatística, os tratamentos acima descritos, obtiveram as médias mais elevadas, pelo que se verificam diferenças significativas para com os restantes tratamentos

Os resultados obtidos não vão ao encontro dos observado por Leva (2011) nos quais explantes expostos a períodos de escuro apresentaram enraizamento insignificante, cloroses e abscisão foliar, tendo os explantes enraizados *ex vitro* não sobrevivido à fase de aclimação. Como tal, e apesar dos resultados obtidos nos tratamentos 4 e 5 se

revelarem bastante promissores, testaram-se os tratamentos 6 e 7, durante os quais os explantes foram expostos a um fotoperíodo de 16h.

Para os tratamentos 6 e 7, os explantes instalaram-se em meio de cultura com AIB à concentração de 3 mg/L. A única variante existente entre o tratamento 6 e 7, foi a indução radicular que se promoveu durante três dias no tratamento 6, comparativamente aos 5 dias no tratamento 7, em câmara de enraizamento com luz, tendo sido posteriormente transferidos para Jiffy Preformas®.

Podemos observar na figura 21, que no tratamento 6 obteve-se um valor médio de enraizamento de 62%, comparativamente com o tratamento 7, no qual se obtiveram valores médios de enraizamento de 70%. A permanência dos explantes em meio de indução radicular com reguladores de crescimento adicionados ao meio, fomentam o aumento das taxas de enraizamento, pelo que a remoção dos explantes do meio de indução de uma forma precoce, têm impacto nas mesmas.

Não se verificam diferenças significativas entre ambos os tratamentos 6 e 7. Porém, verificam-se comparativamente com o tratamento 4 e 5, onde se obtiveram os melhores resultados de todos os ensaios elaborados.

Comparando os tratamentos 4 e 5 com os tratamentos 6 e 7, a única variável entre estes consistiu na exposição dos mesmos a períodos de luz dentro da câmara de cultura onde os explantes realizaram a sua indução radicular. No entanto, os tratamentos 4 e 5 apresentaram melhores resultados devido à ausência de luz, sendo esta um fator limitante para a iniciação radicular e a posterior expressão da mesma. Este fenómeno leva-nos a crer que ocorre degradação de auxinas no meio de cultura através da iluminação artificial, impactando negativamente a proliferação radicular dos explantes.

Os resultados apresentados vão de acordo aos observados por Leva (2011), pelo que existem diferenças de enraizamento consideráveis associadas a diferentes fatores como a origem do material vegetal, o tipo de cultivar utilizada, o número de subculturas prévio em meio de cultura *in vitro* e o tipo de auxina, que não se aplica neste ensaio em questão. Pelo facto de os explantes utilizados se encontrarem estabelecidos *in vitro* há mais de 15 anos, o número de subculturas não foi considerado como variável.

4.2. Análise da interação clone x tratamento

A figura 22 apresenta os resultados obtidos para os diferentes clones em função do tratamento efetuado, neste caso para os tratamentos 1 e 2. Observa-se que o clone 1441 foi o que melhor resultado obteve na generalidade, sendo as taxas de enraizamento deste bastante idênticas, independentemente do tratamento efetuado. A percentagem de enraizamento mais elevada verificou-se no tratamento 1, para o clone 1053, no qual se obteve 88% de plantas enraizadas. Porém, este mesmo clone, obteve no tratamento 2 taxas de enraizamento reduzidas, existindo diferenças significativas entre tratamento.

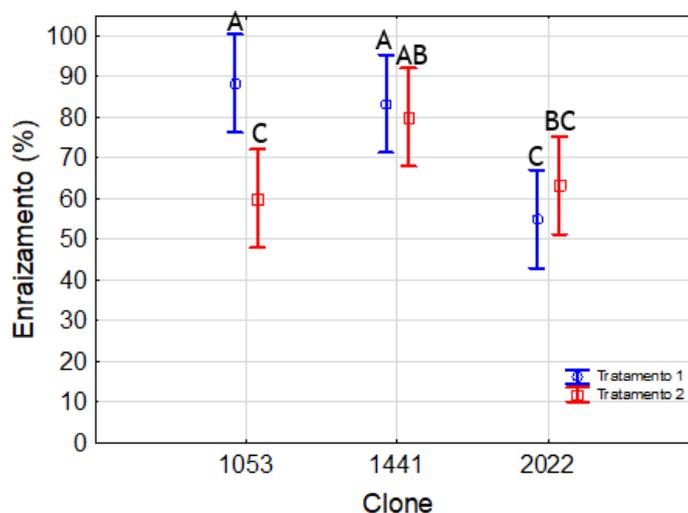


Figura 22 - Variação do enraizamento em função do tipo de clone (LSD 95%).

A figura 23, apresenta um resumo de resultados de enraizamento obtidos por cada clone, em função dos diversos tratamentos. Para o tratamento 3, o clone que melhor resultados obteve foi o 1441, mostrando-se o mais regular para os 3 primeiros tratamentos.

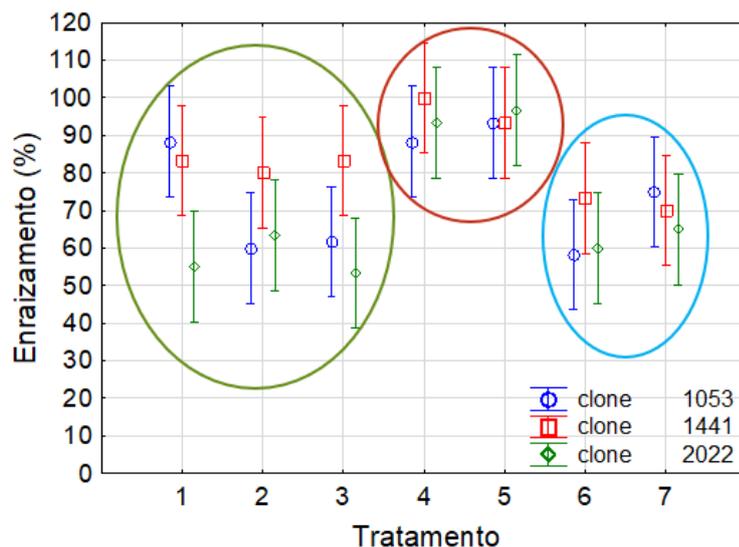


Figura 23 - Variação do enraizamento em função do Tipo de clone vs. Tratamento efetuado (LSD 95%).

Ao realizar os tratamentos 4 e 5, observaram-se valores médios de enraizamento de 94% e 93% respectivamente, sendo que no tratamento 4 o clone 1441, alcançou percentagens de enraizamento de 100% como se pode verificar na figura 23.

Relativamente à variabilidade de enraizamento associada ao tipo de clone utilizado, os resultados obtidos nestes tratamentos diferem dos obtidos por Leva (2011), visto não existirem diferenças significativas entre clones.

Para o tratamento 6 e 7, o clone 1441 mostrou-se mais uma vez o que obteve taxas de enraizamento mais lineares em função do tratamento ao qual é exposto.

Verificamos também que, em tratamentos cujo a indução de enraizamento é induzida através da imersão rápida em AIB (tratamento 1, 2 e 3), estes apresentam diferenças de comportamento entre clone mais acentuadas, como no caso do clone 2022 e 1053, que obtiveram resultados significativamente inferiores ao clone 1441. Porém, quando os reguladores de crescimento se adicionam ao meio de cultura, estas diferenças entre clone demonstram-se menos evidentes e as percentagens de enraizamento aumentam.

4.3. Indução sucessiva de enraizamento no mesmo meio de cultivo

De um modo geral, nos tratamentos acima descritos com adição de AIB ao meio de cultura, foi possível:

- Aumentar a taxa de enraizamento comparativamente ao tratamento 1, que serviu como testemunha;
- Reduzir problemas associados a contaminações, que se verificam bastante comuns ao realizar a técnica de pulse, visto a solução após contaminada transferir a contaminação para os explantes que contactam com esta posteriormente;
- Permitir que as plantas que transitam para a fase de aclimação já possuam raiz protegida, tornando o processo bastante mais fácil para realizar a mesma.

No entanto, não se conseguiu reduzir a mão de obra associada ao método, tal como os custos apensos à preparação do meio de enraizamento. Porém, pelo facto dos tratamentos com melhor resultado apenas permanecerem em meio de cultura durante 3 e 5 dias (tratamento 4 e 5), ao contrário do que ocorria com as testemunhas que realizaram 30 dias, passou a ser possível reutilizar o meio de cultura para mais que um enraizamento de clones. Assim sendo, e de modo a avaliar a eficácia do método, realizou-se um último ensaio onde se procurou induzir o enraizamento por 5 vezes consecutivas com o mesmo meio de cultura.

Para este ensaio, constataram-se diferenças significativas para o enraizamento contínuo de diferentes culturas no mesmo meio de cultura, sendo que ($P \leq 0.05$), como apresentado na Tabela 5.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Erro Padrão	F	P
Culturas	1435.0	4	358.8	26.43	0.000001
Erro	475.0	35	13.6		

Tabela 5 - Tabela de análise de variância para o tratamento de enraizamento consecutivo no mesmo meio de cultura.

Verificámos então, que as percentagens de enraizamento se mantêm elevadas ao longo da rotação de explantes pelo meio de cultura, não ocorrendo assim perdas consideráveis entre repicagens até à 5ª repicagem no mesmo meio de cultura, onde a taxa média de enraizamento decresce consideravelmente, inviabilizando a continuidade do processo, sendo necessário alterar o meio de cultura, de acordo com a Figura 24.

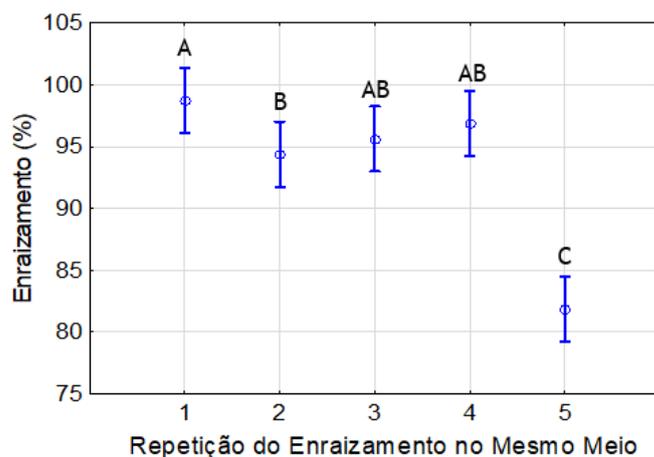


Figura 24 - Percentagem de enraizamento em função da repetição realizada.

As letras apresentadas na figura 24, correspondem às diferenças significativas registadas para $p \leq 0.05$.

Apesar de se verificarem diferenças significativas entre repetições, sendo que a repetição com maior percentagem de enraizamento observada é a primeira repetição, com uma taxa de sucesso de 98%, as percentagens de enraizamento consequentes a esta, permitem obter médias elevadas de enraizamento dentro do espectável para indução radicular em meio de cultura, visto que em nenhuma das repetições consequentes se verificou valores médios de enraizamento inferiores a 94%.

O método testado permite conforto para a empresa, com os benefícios que adjudica sem comprometer a viabilidade do processo, desde que não se realizem mais que quatro repicagens consecutivas no mesmo meio de cultura.

Como tal, de momento o método é utilizado na multiplicação de explantes desta mesma cultivar nas instalações do Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora, no qual decorreram os ensaios, permitindo a redução de custos e mão de obra associada ao processo.

5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir a eficiência dos métodos utilizados, face aos diferentes pressupostos.

Relativamente aos diferentes resultados para os respetivos tratamentos, observamos que a adição de AIB ao meio de cultura *in vitro* influenciou a capacidade de enraizamento entre diferentes genótipos, sendo que o clone 1441 se revelou o genótipo com maior facilidade para a expressão desta característica. Porém, o comportamento dos diferentes clones utilizados não difere entre si estatisticamente.

O fator luminosidade foi limitante no sucesso deste ensaio, sendo que ocorre degradação de hormona de enraizamento, neste caso as auxinas presentes no AIB, quando expostos a períodos de luz, razão pela qual os valores mais elevados de enraizamento, na generalidade, se exprimem em tratamentos no qual os frascos de cultura se encontram inibidos de luz durante 3 e 5 dias respetivamente, em cada tratamento. Porém, verificou-se a indiferença entre tempo de permanência em câmara escura, desde que os primeiros 3 dias de indução radicular se realizarem nestas circunstâncias.

No que diz respeito ao ensaio realizado com indução radicular consecutiva no mesmo meio de cultura, este demonstrou-se bastante conclusivo devido aos valores elevados obtidos durante a repicagem de explantes no mesmo meio de cultura para até 4 sequências de enraizamento sucessivas, reduzindo os custos de produção. Este passo, por permitir que se multipliquem novos explantes sãos e livres de contaminações, torna o processo interessante e apresenta melhorias significativas relativamente ao utilizado até à data no laboratório.

Porém, a redução de mão de obra mantém-se sem grandes melhorias derivada a necessidade de passagem dos explantes por meio de cultura *in vitro*, ainda que o custo de produção se tenha reduzido.

6. Referências Bibliográficas

- Altamura, M. (1996). Root histogenesis in herbaceous and woody *explants* cultured in vitro. A critical review. *Agronomie* 16, 589 – 602. doi: 00885755f.
- Ayoub, S.J. & Qrunfleh, M.M. (2006). Anatomical aspects of rooting Nabali and Raseei olive semi-hardwood stem cuttings. *Jordan J. Agric. Sci.*, 2, 16 – 27.
- Ayoub, S.J. & Qrunfleh, M.M. (2008). A study on some physiological and anatomical aspects of rooting ‘Nabali’ and ‘Raseei’ olive semi-hardwood stem cuttings. *Acta Horticulturae*, 773, 221–226. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.773.32.
- Bartolini, G., Leva, A. R., & Benelli, A. (1989, September). Advances in in vitro culture of the olive: propagation of cv Maurino. *In International Symposium on Olive Growing* 286, 41-44. doi: 10.17660/ActaHortic.1990.286.3.
- Berthon, J.Y., Ben Tahar, S., Gaspar, T. & Boyer, N. (1990). Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* in vitro and their requirements. *Plant Physiology Biochemistry*, 28, 631 – 638.
- Blog Terramanhada (2013). Rebentos adventícios. <http://terramanhada.blogspot.com/p/o-azeite-puro-o-melhor-azeite-do-mundo.html>
- Bohm, J., Miranda, A., Pinheiro, A., Reis, A., Dias, A., Cordeiro, A., Peixe, A., Fabião, C., Meierrose, C., Peres, C., Santos, F., Barroso, J., Gouveia, J., Peça, J., Fevereiro, M., Marcelo, M., Pais, M., Matos, M., Antunes, M., ... Martins, V., (2013). *O grande livro da oliveira e do azeite*. Dinalivro, Lisboa.
- Boustany, N., R.E. Khoury, G., Hassoun, N., Sakrand G.M. Scarpa. (2019). Micropropagation of the millennium olive trees (*Olea europaea* L.) in bshaaleh Lebanon. *Int. J. Curr. Res.*, 11(04), 2751-2759.

- Cançado, G., Braga, F., Souza, R., Nunes, C., Ribeiro, A. & Soares, B. (2012) *Cultivo in vitro da oliveira e suas aplicações*. Arquivo: EPAMIG Sul de Minas - FECD - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, 285-291
- Ciampi, C. & Gellini, R. (1963). The origin and development of adventitious roots in *Olea europaea*: the importance of anatomical structure in rootlet development. *G. Bot. Italy.*, 70, 62 – 74.
- Cordeiro, A.M., Calado, M.L., Morais, N., Miranda, A. & Carvalho, M.T. (2022, outubro). 'Galega vulgar'. *Vida Rural*. <https://www.vidarural.pt/>
- Cultivando (2022, janeiro). Indução de enraizamento através de mergulhia. <https://www.cultivando.com.br/o-que-e-mergulhia/>
- Del Rio, C., Caballero, J., Rallo, L. (1986). Influencia de la sacarosa sobre el enraizamiento de estaquillas vegetativas y fructíferas de olivo Picual. In: *Actas Del II Congreso Nacional de La Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Córdoba, Spain*, pp. 87–93.
- Del Río, C.; Caballero, J.M (2005). Aptitud Al Enraizamento. In: Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero, J.M.; Del Río, C.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I. (Ed.). *Varietades de olivo en España*. Mundi-Prensa, Sevilla, Cap.4, p.277-280.
- Fabbri, A. & Bartolini, G. & Lombardi, M & Kailis, S. (2004). *Olive propagation manual*, Csiro Publishing, Australia.
- Garcia, A. G. (2005) *Nueva olivicultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Gouveia, J.M. B.; Saldanha, J. L. P.; Martins, A. S.; Sobral, V. (2002). *O Azeite em Portugal*. Edições Inapa, Lisboa

- Hartmann, H., Kester, D. & Davies, F. (1990). *Plant Propagation. Principles and Practices, 5th edition*. Prentice Hall, Englewood Clippis, NJ, USA.
- Hava F.Rapoport (1977). *El cultivo del olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Andaluzia.
- Heloir, M.C., Kevers, C., Hausman, J.F. & Gaspar, T. (1996). Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of in-vitro-propagated walnut shoots. *Tree Physiology*, 16, 515 – 519. doi: 10.1093/treephys/16.5.515.
- Leva, A. (2011). Innovative protocol for “ex vitro rooting” on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6 (3), 352-358.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell*, 17, 1090 – 1104. doi: 10.1105/tpc.104.029272.
- Lopes, J.I & Pinto, J.F.S & Divisão Produção Agrícola (2010). *Enxertia da oliveira*. Núcleo de documentação e relações publicas.
- M. Lambardi & E. Rugini (2003), “Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.)”. In: *S. M. Jain and K. Ishii, Eds., Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands*, 621-646. doi:10.1007/978-94-010-0125-0_21U.
- Macedo, E., Vieira, C., Carrizo, D., Porfirio, S., Hegewald, H., Arnholdt-Schmitt, B., Calado, M. & Peixe, A. (2013). Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88, 53– 59. doi: 10.1080/14620316.2013.11512935.

- Martino L., Cuozzo L., Brunori A. (1999) Establishment of meristem tip culture from fieldgrown olive (*Olea europaea* L.) cv. Moraiolo. *Agr. Med.* 129: 193-198. doi: 10.1080/14620316.2013.11512935.
- Matos, M. V. (2021). Registo de produção nacional de azeite. Adaptado de Desafios do setor do azeite em Portugal . *Voz do campo*, Edição de Outubro 2021.
- Matos, V. (2021). *Desafios do setor do azeite em Portugal*. *Voz do campo*, Edição de Outubro. <https://vozdocampo.pt/2023/10/22/o-setor-do-azeite-em-portugal-perspetivas-para-a-proxima-campanha/>
- Mencuccini, M. (1995). Micropropagazione e miglioramento genetic *in vitro* dell' Olivo: Stato dell'arte e prospettive future. *Frutticoltura*, 12: 73-82.
- Mencuccini, M. (2003). Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Instituto di Rcerche sulla Olivicoltura. *Scientia Horticulturae*, 97, 129-139, Italy. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00130-9.
- Mencuccini, M. (2003). Effect of medium darkening on the *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Sci. Hortic.*, 97: 129-139. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00130-9.
- Navarro, C. & Parra, M. A. (2004). *El Cultivo del Olivo*. 5ª edicion, revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa, Andalucia.
- OlivoPampa (2022, setembro). Bancada de enraizamento de estacas semi-lenhosas. https://olivopampa.com.br/?page_id=6978
- Pacurar, D.I., Perrone, I. & Bellini, C., (2014). Auxin is a central player in the hormonecross-talks that control adventitious rooting. *Journal of Plant Physiology*, 151, 83 – 96. doi: 10.1111/ppl.12171.

- Peixe, A., Serras, M., Campos, C., Zavattieri, M. & Dias, M.A., (2007a). Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista de Ciências Agrárias*, 30, 476 – 482. doi: 10.19084/rca.15441.
- Porfírio, S., da Silva, M. D. G., Cabrita, M. J., Azadi, P., & Peixe, A. (2016). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia horticulturae*, 198, 207-226. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.034.
- Porfírio, S., Silva, M., Cabrita, M., Azadi, P., & Peixe, A. (2015). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 198, 207-226. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.034.
- Qrunfleh, M., Rushdi, Y., Musmar, T. & Rushdi, L. (1994). Root formation in cuttings of the Nabali olives with uniconazole and indolebutyric acid. *Dirasat: Agric. Sci.*, 21, 71 – 79.
- Radmann, E.B., V.J. Bianchi, J.C. Fachinello, L.V. Ferreira and R.P.D. Oliveira (2011). *In vitro* multiplication of ‘flordaguard’ rootstock Cytokinin source and concentration effects explants orientation and period of permanence in the culture medium. *Braz. Arch. Boil. Technol.*, 54(1): 25-34. doi: 10.1590/S1516-89132011000100004.
- Rkhis, A.C., M. Maalej, N. Drira and A. Standardi. (2011). Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. ‘Oueslati’. *Turk J. Agric.*, 35: 403-412. doi: 10.3906/tar-1002-741.
- Rodrigues, R., & Correia, M. (2009) *Manual da safra e contra-safra do olival*. Instituto Politécnico de Bragança, 9-17.

- Rugini E., Fedeli E. (1990). Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Y.P.S. Bajaj (ed) *Legumes and oilseed crops I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 10, 593-641.
- Rugini, E., A. Jacoboni and M. Luppino. (1993). Role of basal darkening and exogenous putrescine treatment on *invitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Sci. Hortic.*, 53, 63-72. doi: 10.1016/0304-4238(93)90138-G.
- Rugini, E., Bazzoffia, A. & Jacobini, A. (1988) A simple in vitro method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Hort*, 227, p.438-440.
- Rugini, E., Politi, V., Bignami, C., De Agazio, M., Grego, S. (1990). Effect of polyamine treatments on rooting cuttings of three olive cultivars. *Acta Hortic.* 286, 97–100. doi: 10.17660/ActaHortic.1990.286.17.
- Therios, I. N. (2009). *Olives* (Vol. 18). CABI.
- Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. *J. Mol. Micro. Biotech.*, 37: 169-180. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3.
- Viriato A. (2016). *Simplificação do processo de multiplicação in vitro da oliveira "Olea europaea L."*. Mestrado em olivicultura e azeite, Universidade de Évora.
- Zuccherelli, G. and S. Zuccherelli. (2002). *In vitro* propagation of fifty olive cultivars. *Acta Hortic.*, 586: 931. doi: 10.17660/ ActaHortic.2002.586.204.