UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESTUDO DA BIOLOGIA FLORAL NUMA POPULAÇÃO REGIONAL DE AMEIXEIRAS 'RAINHA CLAUDIA' (*Prunus domestica L.*)

JOÃO M. MOTA BARROSO

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias.

ÉVORA

1990

ÍNDICE

4 - MATERIAL E MÉTODOS

1 — INTRODUÇÃO

Parece ter sido o botânico francês Pierre Belon que no séc.XVI introduziu em França esta variedade de ameixeira, à qual por sua vez a esposa do rei *Francois I*, grande apreciadora dos seus frutos, deu o seu próprio nome: "Reine Claude". A sua origem é no entanto muito mais antiga remontando provávelmente à antiga Grécia (CHAUVIN, 1980). Muito cultivada em França desde então, a ameixeira 'Rainha Claudia' deu origem a numerosos hibridos e mutantes, constituindo uma grande diversidade de cultivares, que os agricultores foram propagando ao longo dos anos.

Já em 1768 no seu "Traité des Arbres Fruitiéres", DUHAMEL DU MONCEAU descrevia entre 48 variedades de ameixeira de tipo europeu dois tipos de 'Rainha Claudia': a grossa 'Reine Claude' 'Apricot vert' ou 'Dauphine', de fruto grande e redondo, amadurecendo em principios de Agosto e de melhores caracteristicas para consumo em fresco e em compotas; e a 'Petit Reine Claude' de fruto pequeno, maturação em Setembro e de sabor menos doce que a primeira, culturalmente menos interessante.

A sua fácil propagação por pôlas, tradicionalmente muito utilizada na instalação dos novos pomares, incluindo mesmo por vezes plantas provenientes de sementes, proporcionou uma variabilidade enorme, que associada á diversidade de nomes por que é designada, se presta a uma grande confusão. A forma culturalmente mais interessante é a 'Rainha Claudia Verde', que se distingue pela inexcedivel qualidade dos seus frutos. Tratando-se no entanto de uma variedade população(*) muito heterogénea, é por vezes dificil distinguir qual o verdadeiro tipo de 'Rainha Claudia Verde'. É mesmo frequente aparecerem clones desta cultivar, que recebem o nome da região onde foram seleccionadas ou da pessoa que as identificou, como por exemplo 'R.C. de Moissac', 'R.C. Leon Hisse' e outros.

(*) -denominação utilizada para o grupo de clones de 'Rainha Claudia Verde', suas mutações e hibridos naturais (CHAUVIN, 1985).

Cultivada em muitas regiões da Europa, são-lhe atribuidos os nomes de 'Reine Claude Vert' e 'Reine Claude Dorée' em França; 'Regina Claudia Grande' em Itália; 'Reina Claudia Verdadera' em Espanha; 'Grosse Grune Reine Claude' na Alemanha; 'Green Gage' em Inglaterra; 'Reine Claude Crottée' na Bélgica, à verdadeira 'Rainha Claudia Verde' e que corresponde em cada um destes países, ao tipo com melhores caracteristicas culturais. No entanto não é já fácil admitir tratar-se da mesma cultivar em todos eles. A evolução e selecção do material vegetal, ocorrendo separadamente em cada região de produção, conduziu como é natural, a populações relativamente diferentes.

Em França, que pode ser considerada o centro de dispersão da variedade, é onde existe ainda hoje a maior variabilidade de tipos de 'Rainha Claudia'. RENAUD (1975), divide esta população em dois grandes grupos: as verdadeiras Rainhas Claudias originadas por mutação da 'Rainha Claudia Verde' e diferindo desta apenas em caracteristicas como o tipo de ramificação, calibre do fruto e época de maturação; e as falsas Rainhas Claudias originadas a partir de sementes da primeira e de caracteristicas já muito diferentes, como por exemplo a coloração do fruto, hábitos de frutificação, etc. Estão neste ultimo caso a 'R. C. de Bavay', 'R. C. d'Oullins', 'R. C. Violette', 'R. C. D'Althan' em França; a 'R. C. Rosa' e 'R. C. de Tolosa' em Espanha; a 'R.C. Espanhola' em Portugal.

No nosso país, embora existindo dispersa um pouco por todo o lado, sobretudo em hortas e jardins onde por vezes nunca chega a produzir frutos, foi na região do Alto Alentejo interior, que a cultivar encontrou as condições climáticas ideais para a sua cultura.

Se a localização nesta região é relativamente fácil de explicar, pelas suas exigências em horas de frio (cerca de 700 h < 7,2°C -Fig.3.1) e temperatura durante a floração e maturação, já o mesmo não sucede no que se refere à sua localização particular em certas áreas dos concelhos de Elvas, Estremoz, Borba e Vila Viçosa, parecendo haver para além do clima uma clara influência do solo sobre essa dispersão.

TAMARO (1920) refere que a natureza do solo pode ter influência decisiva sobre o calibre e qualidade do fruto. Segundo CAILLAVET (1948), os solos calcáreos e permeáveis influenciam positivamente a qualidade tanto nas 'Rainhas Claudias' como nas 'Mirabelles'. Em França é mesmo reconhecida a existência de "crus" de 'Rainha Claudia Verde', comprovando assim a grande influência que a região pode ter sobre a produção obtida. Segundo RABATÉ (1913) a natureza do solo tem uma influência considerável sobre o volume, coloração e sabor dos frutos, sendo nos solos permeáveis, profundos e férteis que se obtêem as melhores produções.

Apesar da influência do solo sobre a qualidade dos frutos ser reconhecida na região do Alto Alentejo, tanto pelos agricultores como pelos industriais, parece-nos que a principal razão da localização da 'Rainha Claudia Verde' nos solos vermelhos mediterrânicos dos concelhos de Estremoz, Borba e Vila Viçosa, e nos férteis de xisto do concelho de Elvas, está no tipo de propagação utilizada. De facto a sua cultura de pé franco, método abandonado em França há já trinta anos, condiciona a sua expansão aos solos bem drenados, que na região correspondem aos tipos referidos.

Embora não seja possivel calcular a data da sua introdução no nosso País não restam duvidas da origem francesa do material de 'Rainha Claudia Verde' cultivado no Alto Alentejo (PEREIRA, 1970). A prová-lo está o nome de 'Ameixa de França' utilizado na região de Elvas para designar esta cultivar e que MORAES (1896) também refere no seu Manual Prático de Agricultura.

O nome de 'abrunho', geralmente utilizado em Portugal para designar as variedades indígenas não selecçionadas de ameixeiras e que aparece apenas na região de Estremoz e Borba a designar a 'Rainha Claudia Verde', pode explicar que a introdução se tenha realizado primeiramente em Elvas e só depois se espalhado às regiões vizinhas, já sem o conceito de cultivar importada. Aliás, um doce muito antigo que na região é feito com a confitagem dos frutos de 'Rainha Claudia Verde' tem precisamente o nome de 'Ameixa de Elvas'.

Referida por diversos autores como uma cultivar autoestéril, tem na resolução do problema da polinização a prin-

cipal chave da viabilidade da sua cultura. No entanto, nunca o problema foi estudado em Portugal, apesar da grande tradição de cultura que têm na região do Alto-Alentejo interior. No âmbito da preocupação constante que a Universidade de évora têm em ajudar ao desenvolvimento regional, pensamos com este estudo dar uma contribuição para a reestruturação do pomar de 'Rainha Claudia Verde' na região referida.

2- O GRUPO DAS AMEIXEIRAS EUROPEIAS. IMPORTANCIA RELATIVA DA 'R. CLAUDIA VERDE' E ASPECTOS PERTINENTES PARA O SEU ESTUDO NO AMBITO DA I & DE.

2.1 - Origem e sistemática das espécies do grupo

A ameixeira, sendo uma das espécies fruteiras há mais tempo cultivada, é também uma das que parece ter uma origem mais antiga. Não deve no entanto na opinião de NAVARRO (1926) ser anterior à era terciária. Caroços desta espécie foram encontrados na Suiça e em Itália, em cavernas que datam da idade da pedra. Autores há que consideram mesmo a ameixeira, como sendo a origem genética do pessegueiro, damasqueiro e cerejeira.

Segundo CAILLAVET (1948), a cultura da ameixeira não deve remontar na Europa a mais de dois mil anos. O homem das habitações lacustres apenas conhecia a *Prunus spinosa* e a *Prunus insititia*. Referências a variedades de ameixeira só se encontram a partir da Renascença (TRAGUS, 1539, referido por CAILLAVET, 1948).

A sistemática do género *Prunus*, sobretudo do subgénero *Prunophora*, está ainda muito confusa, apesar das diversas descrições morfológicas existentes sobre as espécies deste vasto grupo (SALESSES, 1967, 1970). Incluidas no referido subgénero, as ameixeiras são um grupo genéticamente complexo, onde se encontram vários niveis de ploidia e três centros de origem (Quadro 2.1).

REHDER (1954, citado por OKIE, 1987), divide o subgénero *Prunophora* em três secções: *Euprunus*, onde se incluem as espécies Europeias e asiáticas, *Prunocerasus* (espécies americanas) e *Armeniaca* (damasqueiro).

A espécie mais importante pelos seus frutos, é sem duvida a *Prunus doméstica*, que segundo CAILLAVET (1948) é originária da região que se estende do Caucaso à Persia e à Anatolia. Vários relatos da época das cruzadas, mostram que essa era sem duvida uma região onde havia muitas ameixeiras.

Não se conhecendo formas selvagens de *P. doméstica* CRANE e LAWRENCE (1956) propuseram que a sua origem estivesse num hibrido natural entre a *P. spinosa* e *P. cerasifera*. O hibrido triploide após duplicação do numero de cromossomas originaria o hexaploide *P. doméstica*. A explicação parece lógica e mais tarde, RIBINE apoiou esta hipótese ao encontrar ameixeiras hexaploides nos seus hibridos obtidos de cruzamentos entre *P. spinosa* e *P. cerasifera* (SALESSES, 1973a, 1973b).

Estudos mais recentes efectuados por SALESSES (1973b), mostram no entanto que tanto a *P. doméstica* como a *P. spinosa* parecem conter o genoma da *P. cerasifera*, sugerindo assim uma origem mais complexa daquela espécie. Por outro lado a existência de variedades de *P. doméstica* com frutos verdes e amarelos, vêm segundo este autor reforçar a duvida quanto à origem daquela espécie no cruzamento entre *P. spinosa* e *P. cerasifera*, pois que em todos os hibridos artificiais assim obtidos, a caracteristica azul escuro dos frutos de *P. spinosa* domina em 100% dos casos. EREMIN (1989) veio reforçar a hipótese de SALESSES (1973), apresentando a *P. spinosa* como um anfidiploide hibrido entre *P. cerasifera* e *Microcerasus microcarpa (C.A.Mey) Erem e Juschev*, uma forma cultivada de *P. cerasifera*. A *P. doméstica* teria assim segundo este autor, resultado de uma selecção em cultura e não apenas na natureza, em regiões de agricultura muito antiga, onde algumas formas de *P. cerasifera* eram cultivadas.

Se dificuldades existem na compreensão da origem da espécie *P. domestica*, maiores são ainda aquelas que se põem na classificação botânica das diversas espécies, sobretudo na distinção entre *P. insititia* e *P. doméstica*. Apesar de alguns autores fazerem clara distinção entre aquelas duas espécies de ameixeiras, é muito dificil se não mesmo impossivel, estabeleçer as diferenças entre ambas. Os mais recentes estudos genéticos e citológicos, colocam mesmo em evidência a semelhança entre as duas espécies. Em estudos realizados sobre a meiose de hibridos *P. doméstica x P. insititia*, SALESSES (1970) não observou qualquer diferença estrutural entre os cromossomas das duas espécies, concluindo a sua identidade do ponto de vista cromossómico.

centro de origem:	Espécies:	Constituição cromossómica
Europeu:	Prunus doméstica (L.)	2n =6x =48
	Prunus insititia (L.)	2n =6x =48
	Prunus spinosa (L.)	2n =4x =32
	Prunus cerasifera (Ehrh.)	2n =2x =16
	(...)	
Asiático:	Prunus salicina (Lindl.)	2n =2x =16
	Prunus simonii (Carr.)	2n =2x =16
	(...)	
Americano:	Prunus americana(Wight & Hedr)	2n =2x =16
	Prunus hortulana (Bailey)	2n =2x =16
	Prunus maritima (Marsh.)	2n =2x =16
	Prunus mexicana (S.Wats.)	2n =2x =16
	Prunus munsoniana(Wight & Hedr)	2n =2x =16
	Prunus subcordata (Benth)	2n =2x =16
	(...)	

Quadro 2.1- Sistemática do grupo das ameixeiras

Sendo impossivel de fazer a caracterização por estudos citogenéticos, resta a caracterização morfológica. Na classificação botânica de REHDER (1947), as caracteristicas morfológicas das duas espécies são:

P. doméstica - ramos jovens glabros ou glabrescentes; pedicelos glabros, raramente pubescentes; frutos alongados, em geral elipsoides; folhas pubescentes na base da face inferior;

P. insititia - ramos jovens tomentosos ou pubescentes; pedicelos geralmente pubescentes; frutos subglobulosos; caroço quase liso; frutos pendentes; flores agrupadas duas a duas.

Retomando a divisão de DE CANDOLLE em ameixeiras europeias e ameixeiras asiáticas, LAMARCK é também de opinião que no caso da *P. doméstica* e da *P. insititia* se trata de facto de duas espécies diferentes (KAPETANOVIC, 1960). Para MOULLEFERT, citado pelo mesmo autor, as caracteristicas mais importantes que distinguiriam as duas espécies seriam:

P. doméstica - ramos sem espinhos; jovens ramos glabros; folhas pubescentes nas duas faces, finalmente glabras na face superior; nervuras geralmente muito salientes; flores agrupadas em 1 a 2 por gomo; pedicelos pubescentes.

P. insititia - ramos espinhosos; jovens ramos peludos; folhas pubescentes nas duas faces; pedicelos geminados e pubescentes; frutos arredondados de polpa amarga e caroço rugoso.

Poderiamos ainda referir outros autores, alguns mesmo como ROUY e CAMUS (citados em KAPETANOVIC, 1960), que consideram no grupo das ameixeiras hexaploides uma terceira espécie, a *P. ambigua* de caracteristicas intermédias entre a *P. doméstica* e a *P. insititia*. Parece no entanto haver cada vez mais consenso sobre a dificuldade em considerar mais que uma espécie dentro do grupo hexaploide. Mesmo morfológicamente, embora as formas de *P. insititia* apresentem em geral um menor porte e frutos mais pequenos, não é fácil de caracterizar as duas espécies e as opiniões dos diversos autores estão geralmente relacionadas com as observações efectuadas sobre material de uma determinada região apenas.

Tal como NATIVIDADE (1947) afirma num seu trabalho sobre os abrunhos, as diferenças entre as duas espécies são tão subtis que se torna muito dificil afirmar que se trata de duas espécies distintas. Uma hipótese provável que este autor sugere é a de que a forma original seria a *P. insititia*, por ser de facto a mais disseminada, não passando a *P. doméstica* de uma variedade botânica daquela, resultante da selecção com finalidade cultural. Esta hipótese não está porém de acordo com o centro de dispersão das duas espécies. De facto, enquanto que a *P. doméstica* parece ter-se expandido a partir da Ásia Menor, onde foi muito cultivada na antiguidade, a *P. insititia* desde há muito que é considerada expontânea na parte oriental da bacia mediterrânica (PEREIRA, 1970).

Se esquecermos porém a tradicional tendência para incluir dentro da *P. doméstica* todas as variedades cultivadas pelos seus frutos, poderemos admitir sem dificuldade, que as variedades com frutos amarelos e verdes, estão morfológicamente mais perto das descrições da *P. insititia* do que das de *P. doméstica*. Variedades como as 'Mirabelles' são mesmo por

alguns autores (MESNIER, 1977). consideradas como fazendo parte da *P. insititia*.

Também acerca da cultivar 'Rainha Claudia Verde', podiamos concluir que em relação a alguns caracteres como por exemplo a forma do fruto, rugosidade do caroço e numero de flores por gomo floral, ela está de facto mais perto de alguns tipos de *P. insititia* do que da maioria das variedades de *P. domestica*. Autores há mesmo como WETTSTEIN, que a consideram pertencendo áquela espécie, preferindo outros tomá-la como um hibrido entre ambas.

2.2 - A importância da 'Rainha Claudia Verde' na cultura das ameixeiras de tipo Europeu.

Apesar do grande desenvolvimento que a cultura da ameixeira tem tido nos ultimos anos em regiões como a California, Africa do Sul e Marrocos, é ainda na Europa onde se encontra a maior parte da área ocupada com esta cultura, sobretudo nos paises de Leste. A produção europeia representa actualmente cerca de 70% de toda a produção mundial, sendo os maiores produtores a Roménia, Jugoslávia e R.F.A., que produzem principalmente variedades do tipo Quetsche. Ao nível dos paises da CEE cuja produção total ronda as 950 000 T., o maior produtor é a R.F.A. com cerca de 445 000 T., seguido da Itália, França e Espanha.

Na cultura das ameixeiras podem distinguir-se quatro sectores distintos: o grupo de variedades tipo Quetsche, cujo destino principal, além de uma pequena parte para consumo em fresco, é a destilação e que representa a maior parte da àrea cultivada de ameixeiras na Europa; o grupo das variedades de secar, que inclui alguns Quetsches, mas que é sobretudo constituido por cultivares do tipo 'Prune d'Ente'; o grupo das ameixeiras japonesas cujo destino exclusivo é o consumo em fresco; finalmente um outro grupo de variedades do grupo europeu onde se incluem os diversos tipos de 'Rainha Claudia', as 'Mirabelles' e muitas outras de aptidão diversa, destinadas ao consumo em fresco, confitaria, compotas etc..

Embora reconhecida como de entre todas as variedades a de melhor qualidade e com mais utilizações, a cultura da 'Rainha Claudia Verde' tem vindo a perder interesse, como re-

sultado dos seus grandes problemas ao nível cultural. Apesar de muito apreciada em todo o sul da Europa, apenas em França esta cultivar tem ainda grande importância, representando cerca de 50% da ameixa para consumo em fresco e 20% de toda a produção de ameixas daquele país (RENAUD, 1977). Neste país é cultivada sobretudo no sudoeste, região dos Midi-Pirinées (Tarn et Garonne).

Em Espanha cultiva-se um pouco na região da Rioja, sem grande importância comercial no entanto. Na Bélgica tem alguma importância não a 'R. C. Verde', mas sim a 'R.C. d'Althan'. Nos outros países da Europa não passa de uma cultivar de amador, sendo cultivada apenas nas hortas e jardins.

Fora da Europa apenas na Argentina aparece como cultivar importante, sendo cultivada nas provincias de Mendoza e Buenos Aires.

Em Portugal, sem nunca ter sido uma cultura dominante, mesmo ao nível das pequenas explorações da região do Alto Alentejo, a cultivar tem vindo a perder importância, chegando aos dias de hoje num estado de quase completo abandono (Quadro 2.2).

concelhos	1954 *	1986 **
Elvas	27 617	12 336
Borba	20 607	19 080
Estremoz	22 148	16 110
Vila Viçosa	--	1 410
TOTAL	70 372	48 936

Quadro 2.2. -Evolução do numero de árvores de 'R.C. Verde' na região do Alto Alentejo. (*-sg. PEREIRA, 1970; **-sg. cadastro da D.R.A.A, 1987).

Se considerarmos que a maioria das árvores cadastradas em 1986, constituem povoamentos dispersos de origem expontânea, teremos de concluir que a cultura tradi-

cional da 'Rainha Claudia Verde' no Alto Alentejo, se encontra nesta data em risco de extinção.

De facto se exceptuarmos uma dezena de casos em toda a região, onde a cultivar recebe alguns dos cuidados exigidos por quaquer fruteira, podemos dizer que todas as restantes árvores cadastradas constituem uma dádiva da natureza, vegetando a maioria delas no próprio local em que nasceram, e não recebendo qualquer atenção além da colheita dos seus frutos.

2.3 - Problemas culturais da cultivar

Responsáveis pelo desinteresse que a cultura da 'Rainha Claudia Verde' vem manifestando, estão alguns problemas culturais, que cada vez mais dificultam a sua produção rentável, comparativamente a outras cultivares. Vejamos pois alguns desses problemas, sua natureza e importância:

-Auto-esterilidade. -Em virtude de ser uma cultivar auto-incompativel, necessita sempre de ser consociada com outras variedades de floração concordante. (NATIVIDADE, 1932; BERNHARD, 1949; CAMBRA, 1950; CAILLAVET, 1973; RENAUD, 1975).

-Alternância de produção: motivada sobretudo por razões fisiológicas. Segundo COURANJOU (1970, 1971, 1978, 1982 e 1983) na origem desta alternância está o facto de se tratar de uma variedade muito fértil, com grande capacidade de formar orgãos de fruto, e ao mesmo tempo muito sensivel à presença de frutos sobre a árvore no processo de indução e diferenciação floral.

A diferenciação é máxima no ano de contra-safra, a qual associada á inexistência de uma "queda de Junho" que possa regular o numero de frutos sobre a árvore, origina no ano seguinte grande produção. Por sua vez em presença de muitos frutos, a diferenciação é reduzida devido á sua elevada sensibilidade. A contribuir para a sua grande irregularidade de produção, está também o facto de ser uma cultivar auto-estéril. Dependendo exclusivamente do pólen de outras variedades transportado pelos agentes polinizadores, a sua polinização está assim condicionada pelas condições climatéricas da altura da floração.

-Pequeno calibre dos frutos. -Inconveniente mais marcado quando se destinam ao consumo em fresco. De facto ao lado de modernas variedades cujo fruto alcança sem dificuldade as 60-70 g, não é fácil interessar o consumidor por frutos de 35-40 g ainda que de grande qualidade. Algumas das denominadas falsas 'Rainhas Claudias' possuem frutos de maior calibre, como por exemplo a 'R. C. d'Althan'. No entanto perdem em qualidade e tipicidade do fruto. Todos os clones de 'Rainha Claudia Verde' selecçionados até hoje nas diversas regiões de produção, possuem de facto frutos de pequeno calibre.

-Tardia entrada em produção (5º a 6º ano). -Qualquer que seja o sistema de condução. Comparativamente às modernas variedades que iniciam a sua produção logo ao fim do 3º ano e atendendo aos elevados investimentos hoje necessários para a implantação de um pomar, dificultam a sua escolha por parte do agricultor.

-Curto escalonamento da produção. -Não possibilitando seguir o aprovisionamento do mercado por um periodo de tempo suficientemente longo. No grupo de clones culturalmente mais interessantes as diferenças na época de maturação são muito pequenas, concentrando assim muito a oferta.

-Hábitos de vegetação que impossibilitam a utilização dos modernos sistemas de condução. -A ramificação é fortemente basitona e desordenada, o que associado ao desguarnecimento dos ramos, dificultam muito a sua condução em pomares intensivos. A forma de condução que melhor se adapta ás suas caracteristicas de vegetação e que menores custos de produção unitários proporciona, é o vaso aberto.

2.4 - Interesse da cultivar para os actuais programas de melhoramento

Apesar dos seus inumeros problemas ao nível cultural, a 'Rainha Claudia Verde' tem caracteristicas que a tornam um importante progenitor em programas de melhoramento de ameixeira europeia, como já hoje sucede por exemplo no INRA -Bordéus, em França.

Por parte da qualidade dos seus frutos é inegável que esta cultivar possui características apreciáveis: boa consistência da polpa, que associada à grande suculência, a torna particularmente apreciada em fresco; elevado índice de açucares logo a partir da prématuração, que evoluem favorávelmente mesmo depois do fruto ser colhido da árvore; extraordinário aroma e coloração muito particular. Todas estas caracteristicas possibilitam uma utilização muito diversificada dos seus frutos desde o consumo em fresco, às passas, compotas, confitados e mesmo destilação.

A resistência dos frutos ao fendilhamento, bem como a elevada resistência ao transporte desde que colhidos em plena pré-maturação, são também caracteristicas muito importantes numa cultivar de ameixeira para consumo em fresco, e que se podem encontrar na 'Rainha Claudia Verde'(RENAUD, 1978).

Outra das caracteristicas importantes nesta variedade é a sua boa resistência a algumas doenças criptogâmicas, nomeadamente à moniliose sobre flores e sobre frutos.

Por outro lado, ao nivel dos trabalhos de melhoramento há ainda a considerar a sua comprovada auto-esterilidade, que facilita em muito a sua utilização como progenitor femenino nos programas de hibridação, dispensando a castração das flores.

2.5 - Objectivo e justificação dos trabalhos realizados.

2.5.1 - Interesse actual da cultura na região

Num estado de quase abandono a que tem vindo a ser devotada, a cultura da 'Rainha Claudia Verde' surge de repente, desde há dois ou três anos, como uma das possibilidades de a agricultura da região diversificar os seus sistemas de produção, criando uma das alternativas culturais compativeis com as novas regras de mercado que a entrada de Portugal na CEE obriga. Com efeito, bastantes agricultores do Alto Alentejo, procuram neste momento informar-se sobre a possibilidade de se poder explorar com êxito esta cultivar, não sendo poucos aqueles que já avançaram com a instalação de novos pomares.

Se é verdade que a cultivar já provou estar bem adaptada à região e que as multiplas utilizações possiveis para os seus frutos, dão algum descanso aos agricultores sobre o êxito da sua cultura, não podemos no entanto esquecer que para conseguir uma boa produtividade, os novos pomares não poderão ser conduzidos como até aqui.

Além de todos os problemas técnicos relacionados com a instalação e condução de qualquer pomar, como sejam por exemplo a preparação e fertilização do solo, compassos e condução das árvores e controlo efectivo de pragas e doenças, dois elementos base se consideram fundamentais para a eficiente reestruturação da cultura: escolha dos porta-enxertos adequados à cultivar e aos solos disponiveis e resolução do problema da polinização.

É sobre o problema da polinização que nos debruçaremos neste trabalho, estudando-o na sua vertente mais teórica, mas ao mesmo tempo procurando uma resposta de aplicação imediata ao nível do agricultor.

2.5.2 - Resolução do problema da polinização

A 'Rainha Claudia Verde' é como vimos um dos exemplos em que os problemas de polinização podem condicionar só por si a expressão das suas caracteristicas de produtividade. Esta cultivar referida por muitos autores como autoestéril, devido a um fenómeno de auto-incompatibilidade (SOUTY, 1949; BERNHARD, 1949; RENAUD, 1975; BELLINI e BINI, 1978; FACCIOLI e MARANGONI, 1978), parece ter na região do Alto Alentejo um comportamento algo diferente. Com efeito ao contrário do que sucede noutras regiões de produção da Europa, onde a utilização de variedades polinizadoras é norma, aqui não só é muito pouco frequente, como a sua escolha é relativamente aleatória, utilizando-se por vezes mesmo variedades com época de floração diferente da variedade a polinizar.

Apesar deste facto, a produtividade embora mais baixa e irregular do que é normal, está muito acima do que seria de esperar numa cultivar referida como totalmente auto-estéril, cultivada sem polinizadoras eficientes. Parece assim existir

na região algum condicionalismo, ao nível do material vegetal ou das condições edafoclimáticas, responsável pela produção residual da 'Rainha Claudia Verde'.

Numa primeira abordagem pensamos existirem três respostas possiveis: ou existem clones autocompativeis na população originados por mutação, o que como veremos adiante não é muito provável em virtude de se tratar de material hexaploide. Ou como sugere JEFFERIES (1975) e CRESTI, DONINI e DEVREUX (1978), as condições de temperatura durante a floração, nesta região particularmente elevada, permitem uma pseudo-compatibilidade. Ou finalmente, existe suficiente variabilidade genética na população regional de 'Rainha Claudia Verde' e compatibilidade entre os diversos clones, possibilitando um nivel razoável de frutificação.

Seja qual for a explicação para a produtividade da cultivar nesta região, dificilmente ela será suficiente para permitir só por si uma regular e elevada produção, indispensável para o desenvolvimento da cultura, numa perspectiva de fruticultura moderna e competitiva. Por outro lado, a reestruturação dos pomares passa necessáriamente pela selecção dos clones com melhores caracteristicas e pela sua multiplicação por enxertia, o que resulta em pomares homogéneos monoclonais, ou pelo menos com um reduzido numero de clones.

O fim da promiscuidade dos actuais pomares vai com certeza agravar os problemas da falta de polinização e as polinizadoras regionais actualmente utilizadas, não parecem ser a solução para este problema. Com base neste raciocinio, decidimos logo a partir do primeiro ano do trabalho, iniciar uma componente exclusivamente dedicada à identificação e testagem das possiveis variedades polinizadoras para a 'Rainha Claudia Verde' nesta região.

O estudo da população regional no que respeita á sua biologia floral, particularmente no aspecto da incompatibilidade pólen-pistilo, não deixa no entanto de ser importante, pois que além de poder contribuir para a melhor compreensão deste mecanismo em espécies poliploides, servirá para a identificação de clones a utilizar como progenitores num futuro programa de melhoramento.

Essencial para uma abordagem actual aos problemas da fertilidade em fruticultura, é a revisão das contribuições que a investigação nos últimos anos tem trazido ao sector, sobretudo no que diz respeito à metodologia de trabalho. Com efeito, embora nos possamos orgulhar de ter tido na figura do Professor VIEIRA DA NATIVIDADE um dos maiores contribuintes a nível mundial para a compreensão dos problemas relacionados com a improdutividade das fruteiras, muita reduzida tem sido a actividade de I & DE neste sector em Portugal nos ultimos 30 anos, tornando indispensável uma revisão do estado actual de conhecimentos no âmbito geral da improdutividade e mais em pormenor da incompatibilidade sexual.

3- FERTILIDADE EM FRUTICULTURA

3.1 - Fertilidade e produtividade.

3.1.1 - Conceitos

Todo o progresso conseguido nos domínios da selecção e melhoramento varietais, protecção fitossanitária, fertilização e irrigação, condução do pomar em geral, não terá repercursões na produtividade das fruteiras, se o aspecto da fertilidade, em particular a parte que respeita ao processo da passagem de flor a fruto, não fôr bem compreendido e resolvido no âmbito concreto de cada pomar. À medida que a fruticultura se vai especializando, obrigando o agricultor a conciliar uma elevada qualidade com produtividades cada vez maiores, o estudo da fertilidade é cada vez mais matéria prioritária na investigação dos assuntos relacionados com este sector.

Tal como NATIVIDADE (1932) afirmava no seu trabalho sobre a improdutividade das fruteiras, poucos assuntos como o da fertilidade em fruticultura, poderão entusiasmar tanto o investigador e ao mesmo tempo ser de tão oportuno interesse para o agricultor. Mesmo assim, temos de reconhecer que os esforços dedicados em Portugal a esta matéria depois dos trabalhos daquele grande investigador, têm ficado muito aquêm do que seria de esperar, num País cuja vocação fruticola é constantemente sublinhada.

O problema assume ainda maior importância, se atendermos que a cada vez mais rápida renovação varietal, implica o aparecimento constante de novos problemas, obrigando os responsáveis pelo apoio técnico ao fruticultor, a aumentarem também o ritmo dos seus trabalhos e observações sobre os novos materiais. Qualquer nova cultivar por mais elevadas perfomances que possua, só poderá manifestar correctamente as suas qualidades, se as suas caracteristicas no domínio da fertilidade forem devidamente consideradas desde a instalação do pomar, não constituindo segredo para o agricultor.

Por outro lado, a diversidade de comportamento que o material vegetal manifesta consoante o condicionalismo edafo-

climático, implica que os estudos de fertilidade incluam sempre uma importante componente regional, pois que a informação vinda de outras regiões produtoras, com condições ecológicas diferentes, tem em geral pouca validade (SOUTY, 1949; BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE, 1949).

No caso concreto das prunoideas, para cuja cultura Portugal possui regiões particularmente aptas, a situação é ainda mais preocupante. Com efeito, não só as prunoideas constituem um grupo onde os problemas de fertilidade são relativamente frequentes e complexos, como a sua cultura fora das regiões tradicionalmente fruticolas obriga a uma cuidada observação da sua adaptação ambiental. A divulgação de novas variedades junto do agricultor, sem ser precedida dos necessários estudos de adaptação, onde os aspectos relacionados com a polinização e vingamento dos frutos assumem destacada importância, levam em geral não só ao fracasso dos primeiros pomares, mas também ao descrédito futuro na cultura, o que é mais grave.

Constatamos neste momento no nosso País, que a situação é precisamente aquela que importantes investigadores franceses reconheceram existir em França nos anos quarenta e cinquenta, em plena fase de mudança para a fruticultura moderna. No entanto o problema ali, além de equacionado, foi também resolvido com o pragmatismo que se exigia, tendo sido dada plena prioridade dentro das Estações de Investigação aos problemas de fertilidade das fruteiras. Precisamente por reconhecerem, que a par do melhoramento, esse conhecimento era indispensável para dar o salto qualitativo e estabelecer as bases de uma moderna e competitiva fruticultura. O futuro veio a mostrar que o esforço foi meritório.

A improdutividade das fruteiras, responsável em tantos casos pelo fracasso da sua cultura económica, está directamente relacionada com uma das seguintes situações: a inexistência de flores sobre a árvore, ou a impossibilidade dessas flores se transformarem em frutos.

O primeiro aspecto, mais ligado à adaptação das cultivares a determinadas condições ambientais, está dependente de complexas relações internas entre os processos vegetativos e reprodutivos (NATIVIDADE, 1932), que determinam a impossi-

bilidade de diferenciação dos orgãos florais e não nos iremos ocupar dele neste trabalho.

No segundo caso, a não produção de frutos deve-se a uma falha ao nível da polinização, fecundação ou desenvolvimento do fruto e apesar de muito estudado em fruticultura, é ainda hoje o principal responsável pelos casos mais graves de improdutividade. No quadro 3.1 resumimos as diversas situações relacionadas com a improdutividade.

Para NATIVIDADE (1932) o termo fertilidade deve reservar-se para os casos de produtividade em que há sementes viáveis, originadas portanto da fecundação do ovo. Assim de acordo com este autor, em fruticultura poderiamos distinguir a produtividade com fertilidade, caso das prunoideas em geral e muitos frutos secos, e a produtividade sem fertilidade, como por exemplo a figueira e as pomoideas.

A fertilidade assim definida, pode constituir mesmo o objectivo cultural da fruticultura. É o caso da obtenção de novas plantas por semente, como sucede no caso de alguns porta-enxertos, ou o do melhoramento por hibridação, ou ainda quando a semente constitui ela mesma a parte comercial do fruto, como sucede por exemplo com a amendoeira, aveleira e nogueira. Nestes casos fertilidade pode confundir-se pois com produtividade.

Noutros casos, apesar da fertilidade das sementes não interessar directamente o agricultor, ela é no entanto indispensável para que possa haver o desenvolvimento do fruto. É o caso das prunoideas por exemplo, em que apesar da vantagem que poderia trazer a inexistência de caroço, tal não é possível devido à impossibilidade de haver desenvolvimento partenocarpico. Ao contrário do que acontece com as pomoideas, onde a polpa do fruto se desenvolve a partir da urnula, bastando para tal em muitos casos que apenas a polinização se efectue (partenocarpia estimulativa), nas prunoideas a polpa do fruto desenvolve-se a partir das paredes do ovário implicando necessáriamente a fertilização de um óvulo pelo menos (NATIVIDADE, 1932).

No entanto para a maior parte das espécies fruteiras, excluindo os raros casos de partenocarpia, o fruto necessita

sempre para iniciar o seu desenvolvimento, do estimulo hormonal proporcionado pelo ovo fertilizado (HUGARD, 1975) e fertilidade confunde-se assim com produtividade.

IMPRODUTIVIDADE	ausência de gomos florais	- juvenilidade - alternância - determinação ambiental		
	Produção de flores sem vingamento de fruto	falta de um dos gâmetas	-dioicia	
		ausência de polinização	causas externas à planta	- edafoclimáticas - culturais - transporte do pólen
			causas internas da planta	- dicogamia - morfologia da flor
		polinização sem fecundação	esterilidade de dos gâmetas	- androesterilidade
			incompatibilidade pólen-pistilo	- esporofítica - gametofítica
			anomalias ao nível da fecundação	- poliploidismo - origem hibrida
	- queda anormal de frutos			

ESTERELIDADE

Quadro 3.1 -Principais causas da improdutividade nas fruteiras

Recentemente o termo fertilidade é utilizado num sentido mais geral, significando a capacidade de uma árvore para produzir frutos, englobando todas as fases do processo reprodutivo, desde a diferenciação floral até ao vingamento do fruto (SANSAVINI, 1978). é neste sentido que aqui utilizaremos o termo fertilidade.

O termo esterilidade, utilizado inicialmente para explicar o facto de plantas hermafroditas ou monoicas, que produziam gâmetas funcionais, não darem origem por fecundação a sementes viáveis (LACADENA, 1981), é hoje utilizado num sentido mais lato, designando de uma forma geral todas as situações em que havendo flores, não há produção de frutos. Para alguns autores no entanto, a esterilidade está mais ligada a anomalias ao nível dos gâmetas, devendo reservar-se para a primeira situação o termo incompatibilidade.

Segundo a terminologia de NATIVIDADE (1932), esterilidade corresponde à inexistência de fertilidade e não implica portanto improdutividade. Desta forma o autor utiliza ainda os termos de sui-improdutividade e inter-improdutividade num sentido mais geral para as situações em que não há qualquer vingamento de fruto, em presença apenas do próprio pólen ou de pólen estranho respectivamente.

De acordo com SERRA (1949) e CRANE e LAWRENCE (1938) referidos por COSTA e SOUSA (1967), a incompatibilidade não implica esterilidade na verdadeira acepção da palavra, pois que tanto o pólen como os óvulos são funcionais. Além disso como veremos adiante, a incompatibilidade como inibidora da fecundação está muito dependente das condições ambientais, sendo mesmo possivel ultrapassar essa barreira em certos casos, enquanto a esterilidade representa uma impossibilidade absoluta de haver fertilização dos óvulos. Também BREWBAKER (1957), define a incompatibilidade como sendo a incapacidade da planta que produz gâmetas funcionais, originar sementes, quando é auto-polinizada. Para CRESTI, DONINI e DEVREUX (1978) a incompatibilidade não deve ser de forma alguma confundida com outras causas susceptiveis de reduzir a produtividade, como por exemplo a andro-esterilidade, a dicogamia, ou ainda outros tipos de esterilidade gamética.

Utilizado pela primeira vez por STOUT (1917, referido em PATIL, RAJDAMANE e SANGHAVI, 1974), o termo incompatibilidade significa ainda assim para alguns dos autores consultados, uma situação diferente da esterilidade (BREWBAKER, 1957; HUGARD, 1975). Enquanto que na primeira os gâmetas são funcionais e a não formação de frutos se deve a obstáculos fisiológicos que não permitem a germinação do pólen ou o crescimento do tubo polinico, a segunda diria respeito à incapacidade da planta produzir gâmetas funcionais. Desta forma sugeria-se a utilização dos dois termos para designar a falha na passagem de flores a frutos.

No entanto mesmo durante a fase de passagem de flor a fruto, há causas da improdutividade que se devem exclusivamente a factores ambientais, não sendo correcto atribuir a uma cultivar uma caracteristica que é independente da sua condição genética. Desta forma e de acordo com COSTA e SOUSA (1967), consideramos que a esterilidade engloba todos os casos em que havendo produção de flores, a não existência de frutos é devida apenas a factores internos da própria planta, incluindo também a incompatibilidade (Quadro 3.1). Utilizamos ainda os termos auto-esterilidade e inter-esterilidade, respectivamente para as situações de uma cultivar em situação de autopolinização, ou para duas cultivares em polinização cruzada.

O cruzamento entre individuos provenientes de diferentes familias, géneros ou espécies, é em geral impedido devido às barreiras genéticas existentes, como resultado da evolução das plantas. Esta incompatibilidade denomina-se incompatibilidade inter-especifica em oposição à incompatibilidade intra-especifica que trataremos aqui. Esta ultima refere-se a plantas dentro da mesma variedade e de acordo com NETTANCOURT (1977), pressupõe que não há formação de zigoto, embora ambos os gâmetas sejam funcionais e a polinização seja eficiente. A rejeição do pistilo à fertilização em presença de pólen genéticamente idêntico, é comandada por determinados génes como veremos adiante e constitui o mais importante factor existente nas plantas, para evitar a consanguinidade.

Embora por vezes esteja associado a situações de autofecundação, o termo incompatibilidade pode utilizar-se porém, em relação a duas plantas de natureza genética dife-

rente, quer se trate de espécies distintas ou de variedades dentro da mesma espécie. Surgem assim os termos de auto-incompatibilidade e inter-incompatibilidade, para designar respectivamente a ausência de fertilização, na sequência da determinação genética entre pólen e pistilo da mesma variedade ou clone, ou de individuos genéticamente diferentes (SANSDRAP, 1978; LACADENA, 1981).

3.1.2 - A fertilidade nas ameixeiras

De acordo com LAYNE e SHERMAN (1986), a auto-incompatibilidade foi encontrada nas seguintes espécies do género *Prunus*: *P. bessey*, *P. pumila*, *P. avium*, *P. tomentosa*, *P. amygdalus*, *P. salicina* e *P. americana*. Nas espécies de ameixeiras do grupo europeu, *P. doméstica*, *P. insititia*, *P. cerasifera* e *P. spinosa*, é em geral mais referido o aparecimento de auto-incompatibilidade parcial.

Apesar das ameixeiras serem em geral consideradas potencialmente bastante férteis, frutificando abundantemente (BELLINI e BINI, 1978), existem muitos casos de improdutividade originados sobretudo por situações de incompatibilidade pólen-pistilo e por factores externos à planta. Na ameixeira como nas outras prunoideas, a fecundação é indispensável para o desenvolvimento do fruto, daí a importância que todas as fases da polinização, crescimento do tubo polinico e fecundação, têm na sua produtividade.

No grupo das ameixeiras japonesas, todas diploides, a maior parte das cultivares são auto-incompativeis, necessitando para produzirem económicamente, de pólen estranho (BELLINI, 1975; BELLINI e BINI, 1978; COBIANCHI et al; COSTA e GRANDI, 1982; HURTER, TONDER e BESTER, 1979).

Também nas do grupo europeu, a nula ou baixa produtividade de muitos pomares resulta em geral de serem constituidos por uma só cultivar, onde existe uma insuficiente polinização efectiva (FACCIOLI e MARANGONI, 1978). Um grande numero de trabalhos realizados sobre a fertilidade na ameixeira, têm mostrado que são frequentes os casos de cultivares parcial ou totalmente auto-incompativeis. Alguns casos de

cultivares cujo pólen é estéril ou de germinação insuficiente, têm também sido descobertos.

PATIL, RAJDAMANE e SANGHAVI (1974), referem mesmo que a frutificação da maior parte das cultivares de ameixeira, quer europeias quer japonesas, é sempre muito baixa quando em autopolinização, sendo a auto-incompatibilidade pólen-pistilo a principal razão.

Num trabalho sobre a fertilidade de 63 cultivares de ameixeira europeia, efectuado em Itália durante três anos por FACCIOLI e MARANGONI (1978), apenas 26 delas apresentaram mais de 5% de frutificação final quando em autofecundação, nível considerado minimo para uma boa produção. Em contrapartida 29 tiveram menos de 1% de frutos, situando-se as restantes entre aqueles dois valores.

Segundo NATIVIDADE (1932), a inter-incompatibilidade e a auto-incompatibilidade em ameixeiras europeias não é tão frequente como em outras prunoideas como a cerejeira por exemplo, devido à sua condição hexaploide. Também AFIFY (1933), se refere à maior complexidade do mecanismo de incompatibilidade na Prunus doméstica, que geralmente é parcial, sendo os casos de inter-incompatibilidade raramente recíprocos. A maior dificuldade na compreensão do fenómeno de incompatibilidade nesta espécie, que também é observada na macieira por exemplo, deve-se ao seu estado poliploide, que provoca uma grande variação no crescimento do tubo polinico.

Nas observações de CRANE E LAWRENCE (1929) de 66 cultivares estudadas, apenas 10 se revelaram inter-incompativeis, registando-se no entanto 23 auto-incompativeis entre as quais a 'Rainha Claudia Verde'.

Segundo BERNHARD (1972) o vingamento dos pequenos frutos na ameixeira que por vezes atingem 6 a 12 mm de diâmetro, pode ser aparente não correspondendo a qualquer fecundação. É por isso que no vingamento observado até duas semanas depois da floração, não parece haver diferença em certas cultivares nas várias polinizadoras utilizadas, nem sequer mesmo para as flores não fecundadas.

SURANYI (1971, 1973, 1974, 1976 e 1978), observou uma interessante correlação entre a fertilidade de diversas cultivares de ameixeiras e algumas caracteristicas da morfologia floral. Segundo este autor, a auto-fertilidade está em geral associada a cultivares de pistilo longo e baixo numero de estames. O índice (numero de estames / comprimento do pistilo), caracteristico de determinada cultivar, poderia assim constituir um método rápido de detectar as situações de falta de produtividade devida a problemas de fertilidade.

Para além dos factores internos da planta, outros há que influem de forma decisiva na fertilidade da ameixeira. Destes ultimos, as condições climatéricas são sem duvida os mais importantes. A ameixeira sendo uma espécie de floração relativamente precoce, pode ser sériamente afectada na sua frutificação, em caso por exemplo de baixas temperaturas durante esse periodo. Os climas continentais caracterizados por uma passagem rápida do Inverno para a Primavera, são geralmente mais favoráveis para o desenvolvimento dos processos de polinização e fecundação, que os climas maritimos de Primavera fresca e humida. Nestes ultimos, embora a duração de receptividade dos estigmas seja grande, o índice de vingamento é em geral baixo devido à reduzida longevidade dos óvulos. (MARTINEZ-TELLEZ e CROSSA-RAYNAUD, 1982).

Também KEULEMANS (1981) refere que apesar da maior parte das cultivares de ameixeira serem pouco férteis ou mesmo totalmente estéreis, o seu comportamento nas diversas regiões é muito diferente e até por vezes contraditório, devido à influência determinante das condições ambientais. Em observações realizadas na Bélgica durante vários anos, DECKERS e KEULEMANS (1980) registaram uma correlação significativa (r=0,95), entre a temperatura média diurna durante o periodo de floração e a produção por árvore.

Em relação á cultivar 'Rainha Claudia Verde' de que existem como já vimos muitos clones em cultura, parece confirmar-se pelos vários trabalhos até hoje realizados, que se trata de uma cultivar auto-incompativel (BERNHARD, 1949). Existe no entanto uma cultivar de 'Rainha Claudia Verde' na América do Norte conhecida como 'Stark Green Gage', que diversos autores referem como autofértil. No entanto a sua qualidade parece ser inferior aos tipos cultivados na Europa.

3.2 - Tipos de esterilidade e suas principais causas

3.2.1 - Esterilidade morfológica

Consideramos aqui de acordo com CRANE e LAWRENCE (1929), para além da esterilidade devido a anomalias na morfologia da flor, todas as irregularidades que podem ocorrer ao nível da constituição dos gâmetas impedindo a fecundação.

Também chamada de incompatibilidade heteromórfica por alguns autores, a esterilidade morfológica é devida a anomalias ao nível da morfologia floral que impedem a polinização de se efectuar. Sem grande importância ao nível das plantas cultivadas (ALLARD, 1971), este tipo de esterilidade é comandada por um géne S cujo determinismo é esporofítico, determinado portanto pelo génotipo da planta mãe.

O caso de há mais tempo conhecido, desde DARWIN (1877, segundo LEWIS, 1979), acontece no género Primula, onde a existência de plantas de estilete longo e anteras curtas (dolicostiladas) e de outras com anteras longas e estilete curto (braquistiladas) determina um eficaz sistema de autoesterilidade, só tornando possivel a polinização entre plantas braquistiladas e dolicostiladas.

No entanto segundo LEWIS (1954), as diferenças pistilares não são as únicas responsáveis neste caso pela esterilidade. Também se observam efeitos secundários ao nível do crescimento do tubo polinico, que impedem a autofecundação entre aqueles dois tipos de plantas. LEWIS sugere assim que nas plantas heteromórficas, as diferenças morfológicas estão relacionadas com a incompatibilidade fisiológica, não se sabendo qual delas é a causa e qual o efeito.

A falta de germinação do pólen, ou androsterilidade segundo HUGARD (1975), assim como a atrofia das anteras, são dos casos mais frequentes em ameixeiras, no que respeita à esterilidade morfológica. BERNHARD (1949) observou casos de ameixeiras cujas flores não produziam qualquer tipo de pólen. Noutros casos os grãos de pólen estão atrofiados, não germinando quer sobre o estigma, quer sobre meio artificial.

Alguns casos observados de pólen estéril em cultivares de ameixeira, são por exemplo a 'Golden Esperen' (CRANE e LAWRENCE, 1929), 'Mirabelle dorée' e 'Mirabelle tardive' (BERNHARD, 1949), a 'Red Beauty' (NAVARRO, 1987).

Segundo BELLINI e BINI (1978), a esterilidade do pólen pode ser devida apenas em parte a causas citológicas, podendo por vezes ter mais a ver com carências hídricas ou nutricionais, situações em que a resolução do problema passa pelo lado cultural.

É sabido que a hibridação entre espécies afastadas tem como consequência quase certa a sua esterilidade. Sendo a grande parte das nosssas fruteiras originadas de cruzamentos mais ou menos complexos, que posteriormente foram multiplicados por via vegetativa (NATIVIDADE, 1929), é natural que muitos casos observados de esterilidade ao nível dos gâmetas, sejam devidos precisamente a irregularidades ao nível da organização nuclear.

Segundo REMY (1953) a percentagem de grãos de pólen normais numa variedade, está relacionada com a sua homogeneidade genética, sendo tanto maior quanto mais "pura" fôr essa variedade. Apesar da sua natureza heterógenea, a *P. doméstica* apresenta no entanto uma percentagem elevada de grãos normais (CHAUVIN, 1985).

Muito frequente em algumas cultivares de macieira e pereira triploides segundo HUGARD (1975 e 1978), a esterilidade devido a um mau equilibrio cromossómico não parece muito importante em ameixeiras. No caso das espécies hexaploides (poliploides pares) que apresentam uma repetição de cromossomas homólogos, no momento do emparelhamento podem originar a formação de polivalentes, o que é muitas vezes considerado como uma causa da fraca germinação do pólen. No entanto BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) encontraram para a *P. doméstica* uma elevada germinação do pólen e meioses regulares.

NATIVIDADE (1929) aponta no entanto algumas irregularidades na meiose, sobretudo nas espécies poliploides como a ameixeira europeia, e em algumas cultivares aneuploides de cerejeira, como responsáveis por uma má formação do grão de

pólen com a consequente perda de viabilidade. Um dos casos de emparelhamento anormal entre cromossomas homólogos, em cultivares poliploides do género Prunus, referidos por este autor, é precisamente a 'Rainha Claudia Verde'. NATIVIDADE relaciona assim a irregularidade de forma dos grãos de pólen desta variedade e o fraco poder germinativo do pólen de cultivares análogas, com aquelas irregularidades ao nível da meiose.

BERNHARD (1949) chama a este tipo de esterilidade, esterilidade cromossómica, e no caso das ameixeiras poliploides observou meioses em geral tão regulares como no caso dos diploides simples. Segundo este autor, também a percentagem de germinação não parece só por si, ser insuficiente para permitir uma boa fecundação. Conclui pois ao contrário de NATIVIDADE, da pouca importância deste tipo de causa para a esterilidade da ameixeira.

3.2.2 - Esterilidade provocada por factores internos da fecundação

Em algumas espécies de fruteiras a presença do embrião não é imprescindivel para o desenvolvimento do fruto. Porém ele é absolutamente necessário para as prunoideas, não se conhecendo até hoje qualquer caso de partenocarpia sobre o género Prunus.

Embora alguns autores refiram que a incompatibilidade pode também ocorrer ao nível do óvulo, impedindo a fecundação, na maior parte dos casos a inibição do tubo polinico a este nível, também chamada de incompatibilidade gamética (SOUSA, 1967), não tem a ver com o fenómeno da incompatibilidade, mas sim com a existência de factores letais em condição homozigótica que provocam a morte do zigoto. Também de acordo com RICHARD (1986) todos os tipos de auto-incompatibilidade ocorrem sempre antes da fertilização, não incluindo aquela as anomalias que podem ocorrer ao nível da fecundação.

Entre os autores que se referem à esterilidade zigótica, BELLINI E BINI (1978) distinguem três situações que podem fazer com que o zigoto embora fecundado, não se desenvolva: esterilidade do zigoto por causas citológicas -quando a ovocelula embora fecundada não possui a capacidade de

desenvolver um embrião normal, devido à estrutura cromossómica anormal; esterilidade do zigoto por causas factoriais -quando devido à combinação de determinados factores hereditários paternos com os maternos impedem o desenvolvimento do mesmo; esterilidade do zigoto devido a causas fisiológicas, nomeadamente carências ao nível hormonal impedindo a formação da semente.

Em espécies como as ameixeiras, em que o vingamento está dependente da fecundação e subsequente desenvolvimento da semente, é indispensável que haja sacos embrionários normais e que a longevidade do óvulo esteja de acordo com o tempo necessário para o crescimento do tubo polinico (THOMPSON e LIU, 1973).

Situações em que o saco embrionário tem um desenvolvimento anormal ou uma degenerescência muito precoce, têm sido apontados como importantes causas da esterilidade em algumas cultivares de pereiras, damasqueiros e macieiras (JAMONT, 1965; HARTMAN, 1954; JAUMIEN, 1968; referidos por THOMPSON e LIU, 1973). Também na oliveira, a existência de sacos embrionários anormais que conduzem à precoce degenerescência dos óvulos tem sido apontada como a principal causa de baixo vingamento em algumas cultivares (RALLO, MARTIN e LAVEE, 1981).

PEJKIC (1969, referido por THOMPSON e LIU, 1973) observaram, que a cultivar de ameixeira 'Pozegaca' quando cultivada de pé franco, tinha mais 155% de sacos embrionários normais do que quando era enxertada sobre Mirobolano. No entanto, são as condições climáticas no periodo imediatamente a seguir à polinização, os principais determinantes de todo o processo embriológico, como poderemos ver mais adiante.

3.2.3 - Incompatibilidade pólen-pistilo

3.2.3.1 - Tipos de incompatibilidade e local do pistilo onde se exprimem

Para além da incompatibilidade inter-especifica que se opõe ao cruzamento entre espécies diferentes, mais ou menos evidente consoante a sua proximidade genética, e que

segundo LINSKENS (1975), é comandada pelo menos por dois factores genéticos, existe outro tipo de incompatibilidade pólen-pistilo, observado em muitas familias de angiospérmicas, intra-especifico e que é o responsável pela improdutividade de muitas variedades de fruteiras. Do ponto de vista cultural, só esta ultima tem importância.

Muito divulgado nas angiospérmicas, este fenómeno pode ser observado em espécies de 56 familias de plantas (LEWIS, 1979). Constitui uma eficiente barreira que impede a autofecundação, assegurando a alogamia ou fecundação cruzada, responsável pela diversificação genética, base de toda a evolução vegetal.

Segundo GAUDE e DUMAS (1987), o fenótipo da incompatibilidade observado numa planta (Pi), é sempre o resultado de dois factores; de um lado o seu genótipo (G) e de outro as condições de meio ambiente em que se encontra (E), podendo ser esquematizado pela fórmula seguinte:

$$Pi = G + E + (G,E)$$

em que (G,E) representa a interacção entre G e E.

Consideram-se em geral dois sistemas de incompatibilidade sexual; homomorficos, quando não há alterações ao nível da morfologia da flor; heteromorficos, quando o mecanismo fisiológico da incompatibilidade é acompanhado de anomalias na morfologia floral.

A reacção de incompatibilidade que provoca a falta de fertilização pode ocorrer a diferentes niveis do pistilo (Fig.3.2) e é geralmente considerada como uma resposta de rejeição activa ao pólen (HESLOP-HARRISON, 1983, referido por GAUDE e DUMAS, 1987), (Fig. 3.1).

De acordo com o tipo de controle genético, mas também com o local do pistilo onde se exprime a reacção de incompatibilidade, consideram-se dentro dos sistemas homomorficos dois tipos de auto-incompatibilidade: esporofítica, em que a inibição se produz ao nível da germinação do pólen não chegando este a penetrar no estigma; gametofítica, em que o pólen germina normalmente, mas o tubo polinico acaba por parar o seu crescimento no estilete, sem nunca alcançar o

saco embrionário. Em qualquer dos casos nunca há lugar à fecundação dos óvulos.

Segundo BREWBAKER (1957), a incompatibilidade gametofítica é tipica das espécies cujo pólen é binucleado, como nas Rosáceas por exemplo. Ao contrário do tipo esporofítico, o comportamento do tubo polinico ao longo do estilete em situações de incompatibilidade gametofítica, é muito diferente de espécie para espécie.

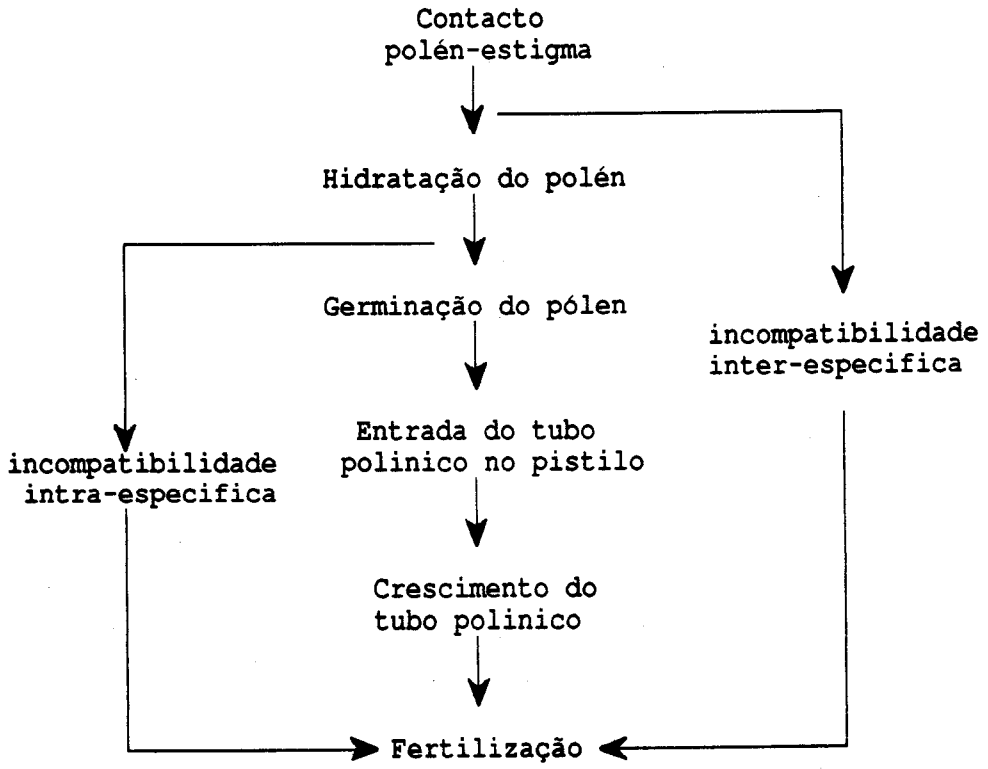


Fig.3.1 -Barreiras ao longo do pistilo que constituem a incompatibilidade sexual. De GAUDE e DUMAS (1987).

Em pereiras a reacção de incompatibilidade dá-se sensivelmente a meio do estilete e em pereira japonesa o tubo polinico cresce normalmente até à base, mas aí acaba por parar (PATIL, RAJDAMANE e SANGHAVI, 1974). Segundo STRYDOM (1962, citado pelos mesmos autores) na cultivar de macieira

'Granny Smith' o tubo polinico não cresce mais que o primeiro terço do estilete.

Nas observações de incompatibilidade em ameixeiras europeias realizadas por SOULIE (1980) e CHAUVIN (1985), o tubo polinico parava o seu crescimento sensivelmente a um terço do estilete.

Também AFIFY (1933) refere que nas espécies diploides como as cerejeiras por exemplo, o tubo polinico pára a um terço do pistilo, enquanto que nas espécies tetraploides e hexaploides, macieira e ameixeira europeia, os tubos polinicos podem parar a diferentes niveis.

De acordo com CROW (1964, citado por SOCIAS I COMPANY e KESTER e BRADLEY (1976), nas Rosáceas em geral, o mais frequente em caso de incompatibilidade, é o tubo polinico parar ainda no primeiro terço do estilete.

Ainda que muito raro, a incompatibilidade pode acontecer também ao nível do ovário, como por exemplo em algumas Liliáceas (ARASU, 1970 referido por LATORSE, 1981), ou em Hemerocallis citrina segundo STOUT e GHANDLER (1933, referido por PATIL, RAJMANE e SANGHAVI, 1974).

Segundo BREWBAKER (1957) a inibição tardia ao nível do ovário resulta da falta de contacto suficiente entre o tubo polinico e os tecidos do estilete, impedindo assim a reacção de incompatibilidade de se produzir mais cedo.

Também KNOX, WILLIAMS e DUMAS (1986) referem a existência de incompatibilidade ao nível do óvulo, impedindo a fusão dos gâmetas. No entanto, este fenómeno é em geral confundido com o aborto do embrião pós- fecundação.

JEFFERIES (1975) refere como provável, que também na P. doméstica a reacção de incompatibilidade se produza ao nível do ovário, tendo observado grande semelhança entre o crescimento do tubo polinico nos cruzamentos incompativeis e compativeis. Sugere mesmo este autor, que a grande quantidade de proteinas disponiveis no pólen da ameixeira, e que como veremos adiante são apontadas como a base molecular da incompatibilidade, não tem relação com o mecanismo de imcompati-

bilidade, servindo apenas de enzimas de degradação da membrana do estigma.

3.2.3.2 - Genética da incompatibilidade

Referido pela primeira vez por CORRENS em 1913, só mais tarde em 1925, EAST & MANGELSDORF trabalhando em plantas do género Nicotiana, tornaram claro o mecanismo genético da incompatibilidade. Posteriormente, vários autores tem estudado o problema; CRANE e LAWRENCE (1929); LEWIS (1976, 1979); NETTANCOURT (1972, 1977); PANDEY (1977); HESLOP-HARRISON (1983), KNOX, WILLIAMS e DUMAS (1986).

A incompatibilidade gametofítica, a primeira a ser estudada é um caractere quantitativo comandado em geral por um só gene, designado de gene "S", associado a um ou a mais que um locus, que se expressa por uma série de diferentes alelos S1, S2, S3, ... Sn. De facto segundo LEWIS (1979), em alguns casos mais do que um géne são responsáveis pela incompatibilidade: dois génes nas gramíneas e quatro génes nas quenopodiáceas por exemplo. Porém segundo o mesmo LEWIS, como nos casos poligénicos os génes segregam como unidades simples, todos os casos podem ser tratados de facto como monogénicos.

Devido ao próprio mecanismo de incompatibilidade o gene S é por natureza heterozigótico e os diferentes alelos são codominantes entre si. A codominância entre os alelos ao nível do pistilo é fundamental no sistema gametófitico, caso contrário se um deles fosse dominante em auto-polinização poderia não haver alelo activo para se opor a ele e a planta seria autocompativel (LEWIS, 1979).

A incompatibilidade de tipo gametofítica, determinada pelo genoma haploide do pólen, dá-se quando o tubo polinico é possuidor do mesmo genótipo no gene S que o pistilo. Neste caso o tubo polinico pára o seu crescimento e a fecundação não se dá. Básicamente num sistema gametofítico três tipos de polinização podem acontecer (Fig 3.3): com incompatibilidade completa (S1 S2 x S1 S2), quando por exemplo num individuo diploide ambos os alelos são comuns no pólen e no tecido do pistilo. Compatibilidade parcial (S1 S3 x S1 S2), quando

existe pólen com um alelo diferente. Compatibilidade plena (S3 S4 x S1 S2), quando todo o pólen possui alelos diferentes (Fig.3.3).

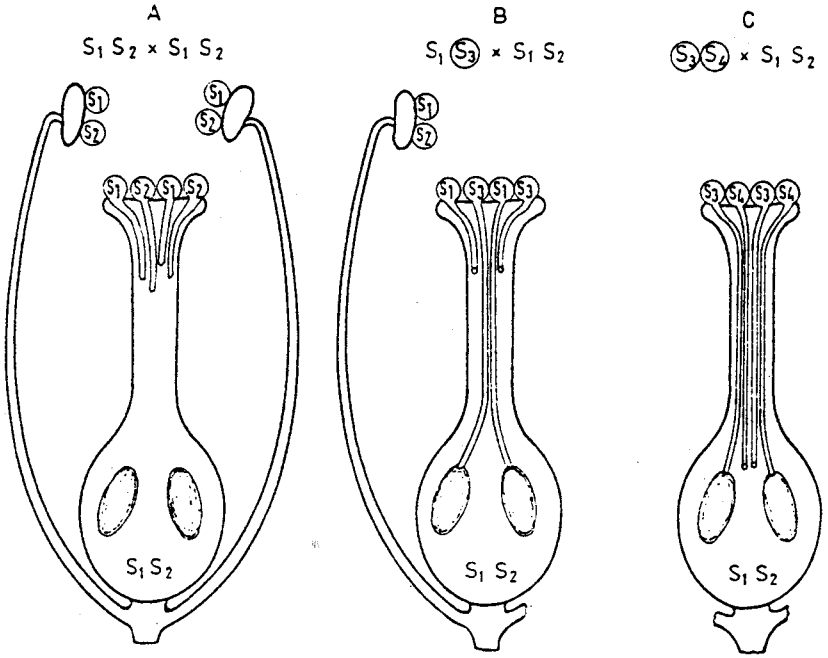


Fig.3.3 -Mecanismo de incompatibilidade do tipo gametofítico

Em plantas cujo gene S esteja activo, não há pois qualquer possibilidade de ocorrer autofecundação. Note-se que em polinização cruzada dentro da mesma espécie, mesmo tratando-se de individuos genéticamente diferentes, não há fecundação, se os alelos S presentes no pólen e no pistilo forem os mesmos (BRIGGS e WALTERS, 1969). Segundo PANDEY, 1979 e HESLOP-HARRISON, 1982, referidos em GAUDE e DUMAS (1987), é provável que o gene S controle muitos outros dos processos da reprodução, inclusivé a incompatibilidade inter-especifica.

Nas pomoideas e prunoideas, o mecanismo de incompatibilidade gametofítica é do mesmo tipo do observado sobre Nicotiana e comandado por um só gene. Nas espécies de constituição diploide o comportamento da incompatibilidade é relativamente simples. É o caso das cerejeiras por exemplo, em

que a incompatibilidade é a regra geral, sendo ainda frequentes os casos de inter-incompatibilidade (NATIVIDADE, 1932). Neste caso como uma planta só pode produzir dois tipos de gâmetas, e cada gâmeta apenas possui um factor 'S', só pode haver compatibilidade ou incompatibilidade plenas.

Em material poliploide a incompatibilidade é bastante mais complexa. é o caso da ameixeira europeia, de constituição hexaploide, onde as situações de incompatibidade embora menos frequentes do que na cerejeira, são no entanto mais dificeis de compreender (CRANE e LAWRENCE, 1929).

A incompatibilidade diz-se esporofítica quando é o fenótipo S do grão de pólen, determinado pelo genótipo da planta que o produziu, a desencadear o mecanismo de incompatibilidade (LACADENA, 1981). Neste caso o caractere de incompatibilidade, é determinado pelas células mãe do pólen antes da segregação meiótica e a reacção de incompatibilidade produz-se ao nível do estigma, sempre que este possui um alelo da série S comum com a planta-mãe do pólen. Por exemplo o pólen S1 S2 proveniente de uma planta S1 S2, será sempre incompativel sobre estigmas S1 S3 ou S2 S3. Só sobre plantas S3 S4 ele será compativel (SOULIE, 1980).

A maior complexidade deste sistema esporofítico vem do facto de, ser comandado pelo genoma diploide de ambas as plantas e poder haver alelos com dominância, com acção individual ou mesmo com competição, tanto no pólen como no estigma, conforme o tipo de combinação alelica (ALLARD, 1971). O sistema esporofítico, considerado o mais complexo sistema de incompatibilidade, existe em geral nas familias de plantas de evolução mais avançada (GAUDE e DUMAS, 1987), estando bastante menos divulgado que o sistema gametofítico.

De acordo com BRIGGS e WALTERS (1984), ao contrário das plantas que possuiem o sistema de incompatibilidade gametofítico, nas de incompatibilidade esporofítica, algumas podem ser heteromorficas, possuindo também diferenças ao nível da morfologia floral.

Nos sistemas esporofíticos, embora os estudos sobre a mutação do gene S sejam mais dificeis, devido ao curto periodo em que o mesmo se pode exprimir, LEWIS (1979) considera

muito provável tratar-se em alguns casos também de um complexo de vários sub-genes, como por exemplo nas cruciferas.

3.2.3.3 - A incompatibilidade na ameixeira europeia

No caso da ameixeira doméstica a incompatibilidade é do tipo gametofítico, comandada por um só gene. No entanto devido ao seu estado hexaploide, é dificil a compreensão do processo, sobretudo em muitas situações de incompatibilidade parcial, onde se pode registar um índice de frutificação residual, que pode chegar em certos casos a 6%. Enquanto que num individuo diploide cada gâmeta possui apenas um factor de incompatibilidade, levando á existência de apenas dois genomas possiveis no grão de pólen, num hexaploide cada gâmeta pode possuir até três factores de incompatibilidade diferentes, aumentando assim muito o numero de genomas possiveis (BERNHARD, 1949).

Por outro lado nos poliploides, não só a determinação genética da incompatibilidade é mais complexa, implicando também relações de dominância entre os vários alelos S, como a própria interacção com os factores do meio ambiente.

AFIFI (1933) constatando precisamente a grande variedade de situações na incompatibilidade da ameixeira doméstica, distingue cinco situações em que o tubo polinico não chega ao óvulo:

1- o pólen não germina devido a uma causa genética.

2- o tubo polinico pára imediatamente a seguir à germinação, mal penetrando no estigma.

3 - o tubo polinico chega até um quarto do estilete.

4 - o tubo polinico chega até metade do estilete.

5 - o tubo polinico cresce normalmente mas não fecunda o óvulo.

A poliploidia, se por um lado complica bastante a compreensão do mecanismo de incompatibilidade, por outro faz com que as situações de incompatibilidade extrema diminuam bastante, ao contrário do que sucede por exemplo com a cerejeira. Com efeito, a probabilidade de se encontrarem dois gâmetas portadores do mesmo géne S é muito menos frequente do

que nos diploides. Surgem assim os casos de pseudo-compatibilidade, a que diversos autores se referem.

Por outro lado, o comportamento entre cruzamentos reciprocos é muito diferente. Num caso de S1 S1 S1 S2 S2 S2 x S1 S1 S2 S2 S3 S3 por exemplo, enquanto que um gâmeta macho S1 S2 S3 pode fecundar a planta fêmea, no caso inverso a fecundação é impossivel, pois não há possibilidade de se formarem na primeira planta, gâmetas cujos alelos S não estejam já na segunda planta (CRANE e LAWRENCE, 1929).

Segundo BERNHARD (1972), na ameixeira doméstica onde muitos casos de cultivares auto-incompativeis existem, a escolha das polinizadoras é mais fácil do que por exemplo na cerejeira ou na amendoeira, em virtude dos casos de inter-compatibilidade não serem muito frequentes. Por outro lado em virtude de se tratar de um poliploide, a inter-incompatibilidade não é em geral reciproca.

BERNHARD (1972) refere ainda, que em geral qualquer cultivar auto-compativel, pode polinizar uma cultivar auto-incompativel desde que as florações sejam coincidentes. Também CRANE e LAWRENCE (1929) observaram em ameixeiras, que os casos de inter-incompatibilidade só ocorriam entre cultivares elas próprias auto-incompativeis, e o pólen das auto-compativeis era sempre efectivo nas auto-incompativeis.

3.2.3.4 - A complexidade de actuação do gene S

Apesar de há muito tempo ser conhecida a determinação genética da incompatibilidade, parece cada vez mais evidente, que muitas das explicações para a compreensão da incompatibilidade ao nível fisiológico, passam por um melhor conhecimento sobre a estrutura do super gene S. Neste domínio, muito pouco progresso tem havido depois da hipótese de LEWIS (1960), que sugeriu uma estrutura tripartida no lócus S; uma parte determinando a especificidade no pólen e no estilete e as outras duas partes, uma a actividade no pólen e a outra no estilete. A possibilidade de estas fracções mutarem separadamente explicaria a complexidade da sua actuação. A grande dificuldade no estudo do mecanismo da incompatibilidade ao nível bioquimico e molecular, reside aliás por um lado, na

sua sensibilidade às condições ambientais externas à planta, como a temperatura por exemplo, por outro nas mutações ao nível dos vários alelos S (MITTEMPERGHER, s.d.).

Em 1979, LEWIS propôs dois modelos possiveis para explicar o mecanismo da incompatibilidade. O primeiro baseado numa interacção de oposição entre a informação do gene S no pólen e no pistilo, cujo resultado nas combinações incompativeis seria a inibição activa do tubo polinico. O segundo modelo sugere uma interacção do tipo complementar, em que o tubo polinico é travado devido à falta de nutrientes ou outras substâncias necessárias ao seu crescimento. No sistema gametofítico o primeiro modelo tem sido em geral aceite (GAUDE e DUMAS, 1987).

Recentemente e considerando apenas a incompatibilidade gametofítica, um outro modelo foi proposto por MULCAHY e MULCAHY (1983, referido em GAUDE e DUMAS, 1987) baseado num dispositivo do tipo heterosis. Segundo este modelo, a interacção entre pólen e pistilo imita a interacção entre ambos os genomas. Deste modo, se o pólen e o pistilo possuem muitos alelos diferentes no locus S, o crescimento do tubo polinico será grande. Pelo contrário se o estilete for homozigótico para um alelo recessivo existente também no pólen, então o tubo polinico será fortemente inibido. A reacção de incompatibilidade seria assim tanto mais forte, quanto mais semelhanças houver ao nível do locus S, no pólen e no pistilo.

Um outro aspecto relacionado com o controle genético da incompatibilidade e ainda muito mal esclarecido, é o referente ao aparecimento de individuos auto-compativeis numa população por natureza auto-incompativel e que alguns autores denominam de pseudo auto-compatibilidade. Das poucas investigações existentes sobre este assunto, duas explicações são sugeridas. Uma propõe a existência de modificações no gene S ou interacções ao nível dos diferentes alelos; já WILLIAMS (1951) se referia à mutação do gene S como uma das origens da auto-compatibilidade. A outra sugerida por HINATA et al (1983, referido por GAUDE e DUMAS, 1987) em trabalhos sobre *Brassica campestris* e confirmada posteriormente, implica a existência de outro gene (m), que quando na forma ho-

mozigótica (mm) impede a expressão da incompatibilidade no estigma.

No âmbito da genética da incompatibilidade, a questão mais importante hoje, está precisamente em saber se a compatibilidade e incompatibilidade são comandadas por um unico gene ou complexo de genes, ou se por outro lado, cada uma é determinada por sistemas de genes distintos.

3.2.3.5 - Base fisiológica da incompatibilidade

Se do ponto de vista genético, a incompatibilidade pólen-pistilo apesar de relativamente bem estudada, ainda não está completamente compreendida, no que respeita à base bioquimica e molecular sobre que assenta o mecanismo, grande parte permanece ainda por esclarecer. Das várias teorias até hoje propostas, nenhuma parece poder explicar completamente o fenómeno (KNOX, WILLIAMS e DUMAS 1986; GAUDE e DUMAS, 1987).

A hipótese mais antiga para a acção do gene S ao nível do pistilo, proposta por LEWIS em 1952 e hoje abandonada, foi a da existência de uma reacção do tipo antigene-anticorpo, à semelhança do que acontece nos animais, que levaria à paragem do tubo polinico (LATORSE, 1981).

Em 1965 o mesmo LEWIS propôe um modelo possivel de aplicar a ambos os sistemas, gametófiticos e esporofiticos, conhecido por hipótese dimera. Este autor sugere que os alelos S tanto no pólen como no estilete, codificam um polipéptido especifico para cada gene S, que por polimerização dão origem a um dimero. Nos casos de incompatibilidade, a existência de dois dimeros idênticos provoca a sua união num tetramero, com a ajuda provável de uma molécula alostérica, que pode ser a glucose. Seria esta ultima a desencadear a reacção de incompatibilidade, actuando como repressor ao nivel tanto da germinação do pólen, como do crescimento do tubo polinico. Mais tarde, LEWIS em face das dificuldades em encontrar proteinas homologas no pólen e pistilo, associadas ao génotipo S, propõe a possibilidade de as substâncias em causa serem antes do tipo complementar, como chave e fechadura.

LINSKENS (1965, referido em LACADENA, 1981) refere que nos sistemas esporofíticos a barreira da incompatibilidade está ligada ao sistema enzimático cutinase, essencial para romper a cuticula do estigma, tendo confirmado que a cutinase do pólen é activada de forma irreversivel.

Por sua vez NASRALLAH et al (1970, referido em LACADENA, 1981) confirmou experimentalmente que as proteinas associadas ao gene S e codificadas pelos respectivos alelos, podem actuar como reguladores dos sistemas enzimáticos implicados na germinação e crescimento do tubo polinico.

NETTANCOURT (1977) reunindo os conhecimentos até então existentes, procurou formular uma teoria unica para todos os sistemas de incompatibilidade, com excepção dos heteromórficos, cujo processo se resumiria nas seguintes etapas:

-Reunião das proteinas-S nas paredes do tubo polinico e nos pontos de inibição do pistilo, estigma ou estilete.

-Reconhecimento no caso de incompatibilidade, das proteinas S idênticas no pólen e no pistilo.

-Incapacidade do grão de pólen para estabelecer permutas com o estigma, acabando por se formar depósitos de calose por baixo do grão de polen e dentro das papilas estigmáticas. Ou no caso do sistema gametofítico a desintegração da parede interna do tubo polinico, rica em calose ao redor do apice e a acumulação dessas particulas da parede no citoplasma do tubo.

-Inibição da germinação do pólen ou do crescimento do tubo polinico, através de uma reacção de incompatibilidade, tendo como consequência uma alteração ao nivel da actividade metabólica, que se traduz pela ineficácia de certos enzimas como por exemplo a cutinase nos sistemas esporofíticos e as glucano-hidrolases nos gametofíticos.

-Finalmente, pelo menos no caso dos sistemas gametofíticos, uma alteração do reticulo endoplásmico, que corresponde à paragem final do metabolismo do tubo polinico.

A teoria de LEWIS em que o mecanismo de incompatibilidade, está dependente da conjugação de proteinas especificas do pistilo e do grão de polen, pôde já ser confirmada experimentalmente. Por um lado recorrendo-se a testes serológicos, realizados a partir de extractos de proteinas do pólen e

estilete, por outro procedendo à separação por meio de electroforese, dessas mesmas proteinas marcadas com C14, em situações de compatibilidade e incompatibilidade (LEWIS, 1979). Ainda segundo o mesmo autor, o reconhecimento dessas moléculas complementares acontece muito cedo, logo a seguir á polinização e ao nível do estigma, mesmo no caso da incompatibilidade gametofítica. No entanto a reacção de inibição ao crescimento do tubo polinico, que se desencadeia de seguida alterando o metabolismo do crescimento do mesmo, pode demorar mais ou menos tempo.

Isolando proteinas a partir das lipoproteinas de pólen incompativel e colocando-as em contacto com células estigmáticas, LEWIS (1979) pode confirmar a natureza proteica da molécula envolvida no mecanismo de incompatibilidade, ao observar que se produzia um depósito de calose. A mesma deposição de calose foi encontrada em casos de incompatibilidade esporofítica, no interior das células estigmáticas em contacto com os grãos de polen, o que permite supor uma base molecular idêntica para ambos os sistemas.

NETTANCOURT et al (1973) referem que em caso de incompatibilidade, o tubo polinico não deixa apenas de crescer, mas é mesmo destruido por um processo especifico de degradação, que precede o desaparecimento da parede interna do tubo.

BURNET (1971, referido por KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986) partindo do modelo proposto por LEWIS, conclui que a substância em causa é uma glucoproteina associada ao genotipo S, que no caso de incompatibilidade se liga a receptores especificos nos tubos polinicos com o mesmo genotipo S.

Recentemente HESLOP-HARRISON (1983, referido por KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986) propuseram, para o caso concreto da incompatibilidade gametofítica, uma interacção ao nível da ligação lectina-carbohidrato entre as glucoproteinas do estilete associadas ao gene S e hidratos de carbono da parede do tubo polinico correspondentes. O papel destas glucoproteinas S está no entanto ainda por esclarecer completamente, pois até ao momento os estudos bioquimicos efectuados sobre estas substâncias, difere muito consoante os tipos de incompatibilidade das diferentes espécies.

SPERANZA e CALZONI (1986) referem, que durante a germinação, o conteudo de proteinas fixado ionicamente à parede celular do grão de pólen aumenta bastante, sobretudo no que respeita a glucoproteinas, confirmando assim que estas ultimas, constituem de facto a sede do mecanismo de reconhecimento da incompatibilidade.

3.2.3.6 - A importância da incompatibilidade nas plantas cultivadas

Enquanto no reino animal a separação dos sexos em individuos diferentes, associada aos seus instintos, constituem a forma de evitar a consanguinidade, assegurando assim a variabilidade necessária à evolução das espécies, no reino vegetal para conseguir esse mesmo objectivo desenvolveram-se os sistemas de incompatibilidade (LEWIS, 1955). A auto-incompatibilidade é assim um mecanismo existente em muitas familias de plantas que força à fecundação cruzada, contribuindo para a diversificação do germoplasma.

Conhecido em cerca de 100 das 300 familias de plantas com flores (GAUDE e DUMAS, 1987) e presente em muitas familias de plantas cultivadas o fenómeno é importante em fruticultura em espécies da familia das Rosáceas, Rutáceas, Oleáceas, Fagáceas e Betuláceas.

Segundo LEWIS (1955), a maior parte das plantas com flores têm actualmente ou tiveram no passado um sistema de incompatibilidade, tendo as auto-compativeis derivado de progenitores auto-incompativeis. A auto-incompatibilidade pode por sua vez como sugere WILLIAMS (1951), surgir numa espécie auto-compativel por mutação. O que evidencia que no decurso da evolução de uma espécie, houve em geral um estádio em que a fecundação cruzada foi indispensável. Um bom exemplo é o do pessegueiro, onde a auto-compatibilidade é hoje o caso geral em todas as cultivares, mas que segundo WEINBAUM, POLITO e KESTER (1986), teria evoluido a partir de progenitores do género Prunus com um sistema de auto-incompatibilidade, por mutação do gene S seguido de selecção.

No cultivo de fruteiras, a incompatibilidade constitui uma séria dificuldade, pois que obrigando à consociação de cultivares, diminui a rentabilidade dos pomares, ao mesmo tempo que torna mais complexo a condução dos mesmos.

No âmbito do melhoramento, a incompatibilidade pode trazer vantagens, como por exemplo na obtenção de hibridos comerciais, dispensando o processo de castração. Também no caso de cultivares que têm a capacidade de desenvolver frutos partenocarpicos, a auto-incompatibilidade pode aumentar essa possibilidade. Pelo contrário se o objectivo cultural é a produção de sementes, então a auto-incompatibilidade é indesejável.

Um outro aspecto do domínio do melhoramento, em que a auto-incompatibilidade surge como um factor negativo, é o da obtenção de cultivares homozigóticas. Com efeito a eficácia na obtenção de novas cultivares por cruzamento, está em grande parte ligada à homozigotia dos progenitores utilizados. Um exemplo deste facto é o que se passa actualmente com o pessegueiro, em que a existência de linhas relativamente puras, possibilita todos os anos, a obtenção de um considerável numero de novas cultivares. No entanto na maioria das espécies fruteiras, o material é muito heterozigótico ainda, em boa parte devido a fenómenos de auto-incompatibilidade, o que torna dificil a selecção de linhas puras como progenitores. No entanto também aqui, novas técnicas vêem sendo propostas como possiveis alternativas para resolver o problema. A mais optimista é a cultura de anteras, possibilitando a obtenção de individuos haploides, que após duplicação de cromossomas permite ghegar aos homozigóticos em apenas duas gerações (HERMSEN, 1974 referido em HAVE, 1979).

3.2.3.7 - Possibilidades de superar o mecanismo de incompatibilidade

Vários métodos têm sido propostos para superar o problema da incompatibilidade: polinização precoce das flores ainda antes do abrolhamento, utilização de altas temperaturas, irradiação do estilete, tratamento hormonal do pólen ou do pistilo, utilização de pólen mentor, polinização directa dos óvulos, etc. Porém, nenhum destes métodos é em

geral de fácil utilização na prática (HAVE, 1979), devido à dificuldade de controlar todos os factores em jogo.

-Utilização de pólen "mentor":

Esta técnica há muito tempo conhecida, consiste na mistura do pólen incompativel com outro pólen, que seja compativel no individuo a polinizar e que vai estimular ao nível do estigma e estilete a aceitação do primeiro. Desta forma é possivel cruzar variedades que de outra forma não teriam possibilidade de se interfertilizar e até mesmo conseguir hibridos inter-especificos, cada vez mais importantes ao nível do melhoramento de plantas.

Uma variante desta técnica consiste em aplicar o pólen compativel algumas horas antes do pólen incompativel, de modo a estimular posteriormente o crescimento deste ultimo no estilete. Neste caso o pólen compativel designase "pioneiro" (VISSER e OOST, 1982).

Inicialmente utilizado sem ser préviamente esterilizado, o que reduzia o numero de hibridos do cruzamento pretendido, o pólen "mentor" passou a ser sujeito a tratamentos quer fisicos -irradiações gama, quer quimicos -lavagem em solventes como o metanol por exemplo, que sem destruir as substâncias responsáveis pela estimulação do pólen incompativel, bloqueiam a sua capacidade de fecundação atravéz da esterilização dos gametas.

Para a maioria dos autores, o efeito do pólen "mentor" é explicado pela existência de substâncias especificas de reconhecimento (PGS), possivelmente proteinas, que se desprendem da parede externa daquele, indo inibir a acção do gene S de incompatibilidade. A mais recente proposta por GAGET et al (1985, referido em KNOX, GAGET e DUMAS, 1987) prevê a existência de uma interacção de três factores, dois deles agindo positivamente; um primeiro constituido pelo fornecimento ao pólen incompativel, de proteinas de reconhecimento provenientes do pólen "mentor", ao nível da superficie do estigma e necessárias para a sua germinação (F1); um segundo relativo às substâncias para o crescimento do tubo polinico (F2). Finalmente um terçeiro factor, mas de sinal negativo, que traduz a competição entre os tubos polinicos

provenientes do pólen incompativel e do pólen "mentor" (F3). O efeito final do pólen "mentor" seria assim Fm = F1+F2+F3.

Segundo PANDEY (1977) em estudos realizados sobre Nicotiana, a eficácia do pólen "mentor" no bloqueamento da incompatibilidade, depende dos progenitores utilizados, parecendo haver uma clara relação entre aquela e a severidade da incompatibilidade nos diversos casos.

VISSER e MARCUCCI (1983) atribuiem uma grande importância ao intervalo entre as duas polinizações, na remoção da incompatibilidade utilizando esta técnica. Segundo estes autores, a segunda polinização deve ser efectuada só depois dos tubos polinicos provenientes do pólen "mentor" atingirem pelo menos um terço do pistilo, variando assim o intervalo entre as duas polinizações com as condições de temperatura e com a velocidade de crescimento do tubo polinico caracteristica das espécies.

Ainda de acordo com PANDEY (1977), existirá uma maior eficiência do pólen determinado esporofiticamente como pólen "mentor", do que o proveniente de um sistema gametofítico. A explicação estaria na maior quantidade de "PGS" libertadas por aquele. Por outro lado é também aconselhada a utilização de pólen de espécies de pistilo curto, na remoção da incompatibilidade em espécies de pistilo longo. Desta forma, diminui-se o risco dos tubos polinicos provenientes do pólen "mentor", cujo crescimento é mais rápido que os provenientes do pólen incompativel, penetrarem nos óvulos antes destes ultimos os atingirem, esterilizando-os.

Determinante também na eficiência do pólen mentor, é a proporção relativa utilizada deste pólen, com o pólen imcompativel. Segundo WILLING e PRIOR (1976, referido por KNOX, GAGET e DUMAS, 1987), a proporção de pólen "mentor" na mistura final tem uma grande influência na eficácia pretendida, devendo-se situar sempre acima dos 40%, para se conseguir uma elevada quebra da incompatibilidade.

-Influência da temperatura:

As referências à influência da temperatura sobre a expressão do fenómeno da incompatibilidade são numerosas;

SCALDLAK (1963, referido em PATIL, RAJMANE e SANGHAVI, 1974); ASCHER e PELOQUIM (1966 e 1970); CHEN e GIBSON (1973 referidos por PANDEY, 1977); JEFFERIES (1975); WILLIAMS e MAIER (1977); MATSUBARA (1981); LAYNE e SHERMAN (1986); HIRATSUKA e TOMITA (1989).

Embora muito variável consoante as espécies (SOULIE, 1980), a temperatura parece ser o factor ambiental mais importante sobre a expressão do fenómeno da incompatibilidade. Para alguns autores (LEWIS, 1942; BRADLEY e GRIGS, 1963); as temperaturas elevadas favorecem a paragem dos tubos polinicos mais cedo. Para outros como JEFFERIES (1975) por exemplo, a temperatura elevada paralisaria a acção dos génes S, podendo mesmo não se produzir o fenómeno de incompatibilidade. WILLIAMS e MAIER (1977) observaram em macieira que o crescimento do tubo polinico a temperaturas de 15 e 20° C, numa cultivar considerada auto-incompativel, passava a zona onde geralmente se produz a reacção de incompatibilidade.

SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) observaram para a cultivar de amendoeira 'Ne Plus Ultra', um mais rápido crescimento do tubo polinico à temperatura de 15 °C. Porém em nenhum caso foi suficiente para ultrapassar a barreira da incompatibilidade.

ASCHER e PELOQUIN (1970), em Lilium longiflorum Thunb. referem a influ@ncia positiva de temperaturas elevadas acima de 30°C, na dissimulação da incompatibilidade, à semelhança de outros autores como por exemplo HECHT (1964) em Oenothera organensis e TOWNSEND (1966) em Trifolium hibridum. Por outro lado para temperaturas mais baixas, 12.5°C, 19°C e 24°C, aqueles autores observaram que a reacção de incompatibilidade se dava tanto mais tarde, quanto menor a temperatura. No primeiro dia após a polinização para 24°C, terceiro dia para 19°C e sexto dia para 12.5°. É assim sugerido, que temperaturas moderadamente baixas, podem retardar a entrada em actividade das substâncias responsáveis pela incompatibilidade.

Também MATSUBARA (1981) e HIRATSUKA e TOMITA (1989) confirmaram recentemente, que a temperatura pode de facto inactivar as proteinas especificas que comandam o mecanismo de incompatibilidade quer no pistilo quer no pólen.

Um problema prático da utilização de temperaturas elevadas durante o crescimento do tubo polinico, é o da sensibilidade dos tecidos do pistilo, que após algum tempo começam a ficar necrosados. Assim têm-se ultimamente estudado a eficácia do tratamento quer dos pistilos quer do pólen, durante um curto periodo de tempo a temperaturas até 50°C, antes de proceder à polinização. Segundo MARCUCCI, VISSER e TUYL (1982) em estudos sobre Malus e Pyrus, a viabilidade do pólen não é significativamente afectada, sobrevivendo a maior parte dos grãos 48 h a 40°C e 24h a 50°C.

- utilização de poliploides:

A poliploidia, que pode excepcionalmente ser uma das causas da esterilidade, como acontece por exemplo em certas formas hibridas de ameixeiras, apenas utilizadas como ornamentais, é apontada por diversos autores como uma das possibilidades de quebrar, ou pelo menos enfraquecer, o mecanismo de incompatibilidade. É o caso da cultivar de pereira 'Giant' auto-incompativel e que por duplicação de cromossomas originou uma forma auto-compativel da mesma cultivar (LEWIS, 1979). A quebra do mecanismo da incompatibilidade foi também possivel em várias espécies de dicotiledóneas auto-imcompativeis, cujo tratamento com colchicina, originou o aparecimento de uma certa percentagem de pólen compativel. CRANE e LAWRENCE (1929) referem ainda a este propósito, o facto de nas ameixeiras hexaploides a reacção de incompatibilidade se manifestar relativamente enfraquecida.

Segundo JANICK e MOORE (1975) pode-se inclusivé conseguir um incremento da fertilidade aumentando o nível de ploidia. Segundo BELLINI e BINI (1978) a mais elevada fertilidade situa-se em geral ao nível dos tetraploides.

-polinização antecipada:

A polinização precoce dos pistilos, antes de se ter desenvolvido o sistema de incompatibilidade, é hoje uma técnica utilizada em algumas espécies. Em geral nos sistemas gametofíticos, a capacidade do estilete para inibir o crescimento do tubo polinico desenvolve-se tarde, imediatamente

antes da antese (LINSKENS, 1963; KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986). Desta forma, é possivel ultrapassar a barreira de incompatibilidade, se a polinização for efectuada antes desse periodo. Para ultrapassar a dificuldade dos estigmas estarem nessa altura ainda imaturos, o que impede a germinação do pólen, pode recorrer-se à utilização da secreção estigmática de outros estigmas que já estejam receptivos. ASCHER e PELOQUIN (1966) em variedades de Lilium, observaram que polinizando antes da antese, o crescimento do tubo polinico era idêntico nas combinações compativeis e incompativeis.

-mutagénese ao nível do gene S:

Ainda que ultrapassável através da utilização de polinizadoras, a cultura de certas cultivares de fruteiras auto-incompativeis ganharia muito interesse como já vimos, se se pudesse cultivá-las extremes no pomar. De acordo com LEWIS (1954), tal seria possivel através da introdução nessas plantas, de alelos de autofertilidade. O método consiste na irradiação das células-mãe do pólen, provocando mutações ao nivel do alelo S, cujo pólen utilizado na polinização de plantas do mesmo grupo de incompatibilidade, possibilita a obtenção de individuos autoférteis.

Também HUGARD (1975) refere que a mutação ao nivel dos alelos S, originando um novo alelo Sf, pode de facto fazer aparecer a auto-compatibilidade no seio duma espécie auto-incompativel. Deste modo um individuo portador deste alelo Sf é inter-compativel com todas as variedades de determinada espécie, pois que o pólen com este gene germina sobre qualquer estigma, assim como todo o tipo de pólen germina sobre o seu estigma.

Esta técnica já utilizada em cerejeiras possibilitou a obtenção de plantas portadoras do alelo Sf, que estão a ser utilizadas no cruzamento com diversas variedades culti-vadas, com a finalidade de obter descendentes portadores daquele alelo de auto-compatibilidade (LEWIS, 1954).

No entanto em estudos sobre Nicotiana, GASTEL e NETTANCOURT (1974) usando raios gama durante largo periodo, e PANDEY (1965) usando raios X, encontraram uma baixo indice

mutagénico dos alelos S, em certos casos inferior mesmo à que ocorre expontâneamente.

Apesar das dificuldades referidas, alguns programas de melhoramento de fruteiras têm hoje como objectivo principal a obtenção de cultivares auto-compativeis a partir das cultivares auto-incompativeis, pela introdução no seu genoma do gene Sf de auto-compatibilidade. Os mais importantes destes programas decorrem com amendoeiras, onde o fenómeno de auto-incompatibilidade é muito frequente, recorrendo ao cruzamento com outras espécies portadoras do alelo Sf, sobretudo de pessegueiro. A auto-compatibilidade parece ser dominante sobre a auto-incompatibilidade, daí que no cruzamento amendoeira x pessegueiro todos os individuos da geração F1, apresentem a expressão de auto-compatibilidade semelhante ao pessegueiro (WEINBAUM, POLITO e KESTER, 1986; WEINBAUM, SHAW e MURAOKA, 1989).

3.3 - O pólen como factor de fertilidade

3.3.1 - Natureza e caracterização do grão de pólen na ameixeira

O grão de pólen é basicamente um orgão desidratado, com uma humidade relativa entre 6% e 60% consoante as espécies, não apresentando qualquer metabolismo e que funciona como portador dos gâmetas masculinos (GAUDE e DUMAS, 1987).

Como na maior parte das Angiospérmicas, o grão de pólen das Rosáceas depois de atingir a maturidade é bicelular (KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986), contendo um nucleo denominado vegetativo, que dá origem ao tubo polinico e outro reprodutivo ou gerador, que constitui verdadeiramente o gâmeta masculino (VASCONCELOS e COUTINHO, 1946). Depois da germinação o nucleo reprodutivo divide-se em dois nucleos espermáticos, que na altura da fertilização se destinam a assegurar a dupla fecundação do óvulo. No pólen tricelular, tipico de algumas familias como as Cruciferas e Compostas, aquela divisão ocorre antes da libertação do pólen, ainda durante a fase de maturação do microsporo.

Na ameixeira, a deisçência das anteras é rápida após a antese se o tempo for seco, não necessitando mais que um dia com temperaturas acima de 15°C. Nas regiões meridionais onde a temperatura durante a floração pode atingir os 30°C durante o dia, como acontece por exemplo no Alentejo, a deisçência das anteras pode-se iniciar no mesmo dia da abertura das flores. Em caso de chuva durante a floração as anteras fecham-se retardando a sua deiscência e o pólen já liberto é arrastado pela água (DORSEY 1919a).

O grão de pólen das ameixeiras, variando um pouco de tamanho segundo as variedades, é de forma arredondada a triangular, não ultrapassando em geral os 50 microns de diâmetro. Possui três polos germinativos bastantes largos e curtos, sendo a sua superficie nitidamente estriada. As aberturas na parede externa do grão de pólen são uma caracteristica de quase todos os tipos de pólen e constituem os locais por onde se inicia o crescimento do tubo polinico.

Duas camadas distintas se podem observar na parede celular; a exina localizada exteriormente e a intina interior áquela. Na exina podem ainda considerar-se dois estratos, no que respeita à sua organização fisica; a sexina, mais externa e descontinua, constiuida por cavidades e estrias e a nexina colada à intina e continua. Toda a exina é constituida por uma substância impermeável aos liquidos e gases, denominada de esporopolenina, cuja composição quimica está ainda em grande parte por esclarecer (KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986). A sexina contém ainda diversas substâncias, incluindo proteinas, enzimas e lipidos, que migraram do tapete ou camada nutritiva das anteras, durante a maturação do grão de pólen. Estas substâncias têm uma função importante durante a germinação do pólen e emissão do tubo polinico, sendo as responsáveis pela perfuração da menbrana do estigma e como já vimos pelo mecanismo de incompatibilidade. A intina é composta por diversos estratos ricos em pectina, onde além de diversos polisacarideos, se econtram ainda alguns tipos de proteinas e enzimas, de grande importância ao nível da germinação do pólen (BAGNI e GEROLA, 1978).

3.3.2 - Recolha e conservação do pólen

Na recolha do pólen um método muito utilizado por exemplo sobre a oliveira, onde é necessário recolher grandes quantidades de pólen, consiste na colocação de sacos de papel nos ramos em plena floração durante os primeiros dias da antese (GRIGGS et al, 1975, referidos por FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ-VALLEDOR e RALLO, 1981).

Nas prunoideas o processo mais utilizado é a recolha das anteras no campo, antes da antese e promover a sua deiscência posteriormente no laboratório. Conforme a quantidade de pólen pretendido e o grau de precisão do trabalho em causa, assim se podem recolher apenas as anteras, com a ajuda de uma pinça apropriada, ou as flores inteiras no estado de botão branco.

Para acelerar a deiscência das anteras em laboratório, colocam-se estas num ambiente bem seco, para quebrar a parede externa dos sacos polinicos. Vários podem ser os produtos para conseguir esse meio de muito baixa humidade. O ácido sulfurico utilizado por alguns autores no inicio, foi posteriormente desaconselhado por REMY (1953), por ter uma influência negativa sobre a germinação do próprio pólen. O produto utilizado por este autor foi o cloreto de sódio e o cloreto de magnésio, tendo o primeiro proporcionado melhores resultados. Recentemente a silica gel (Ca SO4) é a mais utilizada, dando bons resultados.

A conservação do pólen é um problema que sempre tem interessado os melhoradores, pela necessidade que têm de proceder a cruzamentos de variedades com épocas de floração por vezes muito diferentes. O interesse da conservação do pólen é hoje no entanto muito mais vasto, indo desde a utilização na produção comercial de sementes ou polinização artificial de pomares, até à constituição de bancos genéticos de conservação de germoplasma.

Dos muitos trabalhos especificos sobre este assunto, parece poder concluir-se serem a temperatura e a humidade os factores mais importantes a considerar, nas técnicas de conservação. No entanto, se em relação a algumas espécies como as fruteiras em geral, é já hoje possivel dispor de técnicas,

que permitem efectuar a conservação do pólen por largos periodos de tempo, noutras como as gramineas, a conservação em boas condições é ainda muito dificil (KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1986).

Segundo NSEIR (1969), é possivel conservar o pólen das prunoideas em bom estado, a uma humidade inferior a 30% e a baixa temperatura.

LEE, BUNEMANN e HERRMANN (1981) consideram que o factor mais importante para a conservação do pólen é a temperatura. A técnica proposta por estes autores, testada precisamente sobre pólen de ameixeira, possibilita a sua conservação em ampolas sob vácuo a -20° C, durante três anos.

USHIROZAWA e SHIBUKWA (1951, referidos por LEE, BUNEMANN e HERRMANN, 1981) conseguiram conservar pólen de Pyrus durante 9 anos a muito baixas temperaturas (17 a 37°C), sem qualquer quebra de poder germinativo.

A humidade é talvez a seguir à temperatura, o factor ambiental mais importante na conservação do pólen (LEE, 1980). As referências bibliográficas são porém muito contraditórias: Para alguns como PFUNDT (1910) e OLMO (1942) referidos em LEE, 1980), NSEIR (1969), a humidade ideal seria abaixo dos 30%. Para outros como NEBEL (1939) e ZIELINSKI (1968) referidos por LEE (1980), o óptimo estaria entre 50 e 95% de humidade relativa.

Segundo POLITO e LUZA (1988), a humidade relativa durante a conservação do pólen pode desempenhar um papel importante para algumas espécies. Nos seus trabalhos sobre a conservação de pólen de pistáchio, observaram niveis de viabilidade idênticos entre a germinação logo a seguir à antese e oito dias depois, à temperatura do laboratório, desde que se procedesse neste ultimo caso, a uma rehidratação gradual do pólen.

Outra possibilidade de conservar o pólen é em solventes orgânicos, a baixa temperatura. Segundo JAIN e SHIVANA (1986) este método permite a conservação do pólen em boas condições durante um largo periodo, vários anos mesmo, desde que o produto utilizado mantenha a integridade da membrana do

grão. AGARWAL (1983) testando dez tipos de solventes orgânicos sobre pólen de Vitis vinifera, observou para todos eles uma alta percentagem de germinação até quatro meses de conservação. Porém ao fim de seis meses, apenas o pólen conservado em alcool-amilico e em benzeno conservaram a sua capacidade germinativa.

3.3.3 - A germinação do pólen "in vitro". Comparação com outros métodos alternativos.

Desde há muito tempo se sabe, que a capacidade de germinação do pólen é caracteristica de cada espécie diferindo muito de umas para outras. Também entre as variedades da mesma espécie, grandes diferenças existem em relação a este parâmetro. LEE (1980), encontrou valores entre 2% e 64% para cultivares de ameixeira Europeia, germinadas nas mesmas condições de meio e temperatura. Apesar das suas limitações, a percentagem de germinação, avaliada sobretudo "in vivo", continua a ser a forma mais segura de avaliar a qualidade do pólen.

EINSET (1939, referido por LEE, 1980) classificou o pólen em três grupos de acordo com a sua capacidade de germinação; 0 a 15% -fraca capacidade germinativa; 15 a 50% -média capacidade de germinação; acima de 50% -boa capacidade de germinação. Para LEE (1980), as cultivares com percentagens de germinação abaixo de 15%, devem ser consideradas más polinizadoras e não ser utilizadas como tal.

O fraco poder germinativo do grão de pólen resulta muitas vezes de anomalias durante a meiose. é o caso da cultivar de amendoeira 'Molar Italiano' referido por ALMEIDA (1945).

Segundo REMY (1953), as espécies puras do género Prunus, tem uma maior percentagem de grãos viáveis que os hibridos inter-especificos. Para este autor, a percentagem de grãos normais no caso dos hibriodos inter-especificos, reflecte directamente a compatibilidade e a afinidade durante a meiose dos stocks cromossómicos das espécies parentais. Quanto menor for essa percentagem mais distantes genéticamente estão essas mesmas espécies. Por isso grande numero de

hibridos inter-especificos em prunoideas é estéril. Também DORSEY (1919b) refere que a percentagem de grãos de pólen abortados, é maior nos hibridos que nas espécies puras.

COUTAUD (1954), refere que por exemplo nas variedades triploides de macieira a germinação do pólen é inferior às variedades diploides. Igualmente RAPTOPOULCS (1940 citado por NSEIR, 1969) observou que sobre *P. avium* diploide, a germinação do pólen é superior à de *P. cerasus*, tetraploide.

No caso da *P. doméstica* e *P. insititia* cuja possivel origem hibrida já atrás discutimos, parece que que se encontram bem estabilizadas no seu estado hexaploide. De facto, nos diversos estudos de germinação de pólen até hoje realizados sobre variedades de ameixeiras do grupo hexaploide, tem sido observado em geral um elevado índice de germinação.

Uma outra causa da fraca germinação do pólen em alguns casos, pode ser a presença de virus. MARENAUD e DESVIGNES (1965) referem, que certos virus como por exemplo o 'Necrotic Ring Spot' e o 'Nó Curto', podem ter uma influência negativa sobre a morfologia e germinação do pólen. Também BASAK (1966, referido por NSEIR, 1969) observou anomalias em pólen de gingeiras causadas pelo virus 'Necrotic Ring Spot', diminuindo a sua capacidade germinativa.

Factores externos como o clima, solo e técnicas culturais, agindo sobre a fisiologia da árvore, podem influenciar também, ainda que indirectamente, a qualidade dos grãos de pólen.

A capacidade de germinação do pólen "in vitro" é no entanto um parâmetro que está longe de reflectir a sua viabilidade potencial. De acordo com HESLOP-HARRISON, HESLOP-HARRISON e SHIVANA (1984), esta deve ser entendida como a capacidade que o grão de pólen tem, de transportar os gâmetas masculinos até ao saco embrionário.

Os factores que condicionam no entanto a viabilidade do pólen são tantos e em tão grande numero, que podemos considerar este parâmetro como impossivel de avaliar de forma precisa. POLITO e LUZA (1988) refere por exemplo, que muitas vezes a não germinação do pólen deve-se apenas ao facto de

não estarem reunidas as condições de temperatura e humidade necessárias ao processo de germinação, não significando que este esteja inviável.

Para além do problema da incompatibilidade, a percentagem de pólen viável é o factor mais importante, que pode caracterizar a eficiência de uma cultivar como polinizadora (CRANE e LAWRENCE, 1929). A avaliação da qualidade do pólen é ainda da máxima importância nos trabalhos de melhoramento, quer para testar a eficiência dos cruzamentos, quer a fertilidade dos hibridos obtidos.

Vários métodos podem ser utilizados para determinar a viabilidade do pólen; testes de germinação "in vitro", testes sobre a capacidade de coloração do conteudo da célula vegetativa, testes de actividade enzimática, testes de ressonância magnética nuclear (NMR) e testes de fluorescência (FCR) avaliando a integridade da plasmalena na célula vegetativa. Nenhum deles porém permite determinar exactamente a capacidade que o grão de pólen têm, para transportar até ao saco embrionário o gâmeta masculino. (HESLOP-HARRISON, HESLOP-HARRISON e SHIVANA, 1984). Só directamente, através da observação da germinação e crescimento do tubo polinico "in vivo", se pode observar com precisão a viabilidade do pólen. No entanto mesmo com este método, hoje já bastante aperfeiçoado, alguns problemas existem como veremos adiante.

Nos testes de coloração podem utilizar-se vários corantes, como o reagente de Schiff, azul de anilina, azul de toluidina, azul carmin e outros. Em todos eles o objectivo é o de deixar a exina o menos corada possivel, para se observar bem a coloração do conteudo celular.

Os testes enzimáticos destinam-se a estabelecer a actividade de determinados enzimas da célula vegetativa, estando hoje em geral abandonados.

O teste que utiliza a ressonância magnética nuclear (NMR), é o unico que permite uma avaliação da qualidade do pólen de forma não destrutiva. Consiste na determinação dos niveis de 'H2 O' livre nas células do grão de pólen e quimicamente ligada, baseando-se na alta correlação existente

entre esta ultima e a viabilidade do pólen (KNOX, WILLIAM e DUMAS, 1986).

O método de avaliação indirecta da viabilidade do pólen hoje mais utilizado, é o denominado FCR (reacção fluorcromática). O pólen é espalhado numa gota de solução de diacetato de fluoresceina e acetona (2 mg/ml de acetona), préviamente misturada com uma solução de sacarose, de modo a ter-se uma pressão osmótica semelhante à dos grãos de pólen, sendo posteriormente observado ao microscópio em fluorescência. Se a plasmalema da célula vegetativa está intacta, uma esterase activa liberta a fluoresceina do acetato de fluoresceina não fluorescente, que é retida no citoplasma, tornando-se fluorescente. Se o grão de pólen está morto, não há actividade da enzima esterase e não há fluorescência (HESLOP-HARRISON e HESLOP-HARRISON, 1970).

No entanto, o método há mais tempo utilizado é sem duvida a germinação "in vitro". Embora autores como KEULEMANS (1981), refiram que esta técnica não parece ser um bom critério para a avaliação de uma cultivar como polinizadora, ela tem no entanto a vantagem de permitir estudar a influência que certos factores como a temperatura por exemplo, têm na germinação do pólen. Em contrapartida, tem a desvantagem do próprio método constituir uma importante fonte de variação (KLUNGNESS, THORP e BRIGGS, 1983).

LEE (1980), tendo em consideração a boa relação existente entre a percentagem de germinação do pólen "in vitro" e o crescimento do tubo polinico através do pistilo, conclui que esta parece ser uma boa técnica para estudar a viabilidade do pólen, associada aos factores de crescimento do tubo polinico.

Não havendo nenhum método indirecto rigoroso para avaliar a viabilidade do pólen, a escolha do método mais indicado depende em geral do objectivo concreto de cada estudo. Como teste rápido para avaliar a qualidade do pólen, o FCR é hoje provávelmente o mais fiável. Mas se pretendermos estudar mais em pormenor o processo da germinação e crescimento do tubo polinico, assim como a sua variação com diversos factores ambientais, teremos que recorrer ainda ao clássico método da germinação "in vitro".

Os factores que podem influir na germinação do pólen "in vitro", são muitos e de diversa índole. Para além dos já referidos atrás em 3.3.1 e 3.3.2, existem outros estranhos ao próprio pólen, uns controláveis outros não, que podem interferir na sua germinação, condicionando assim muito a fiabilidade deste método. Aos mais importantes desses factores nos referiremos a seguir.

3.3.4 - Factores que influênciam a germinação "in vitro"

O meio de cultura é sem duvida um dos factores que mais influencia a germinação do pólen, estando essa influência ligada de perto às caracteristicas de cada espécie. As exigências de germinação de cada tipo de pólen, estudadas por diversos autores são muito variadas. A água parece ser em todos os casos, indispensável para a germinação do pólen, sendo por vezes mesmo o unico meio utilizado.

Os açucares são o elemento sobre que maior diversidade de opiniões há. Necessários segundo alguns, como factor de nutrição do próprio grão e tubo polinico, a exigência deste produto estaria relacionada com a riqueza do pólen em amido (MANGIN, 1886 e VASIL, 1960, referidos por NSEIR, 1969). Para outros porém, os açucares seriam apenas necessários para exercer a pressão osmótica suficiente à sua germinação (VISSER, 1955 referido por NSEIR, 1969).

Segundo LVOV (1950, citado por TUPY, 1959), a sacarose é um hidrato de carbono muito importante para a respiração, sobretudo em orgãos velhos onde os sistemas enzimáticos que activam as hexoses e as tornam disponiveis para o processo de respiração, deixaram de funcionar. Nestes casos a respiração faz-se apenas à custa da fructofuranose existente na sacarose. Este açucar seria assim de importância capital para o crescimento do tubo polinico, tendo-se observado um melhor crescimento do pólen em meio contendo sacarose, do que outros açucares como a frutose ou a glucose.

Segundo observações de REMY (1953) efectuadas em prunoideas, o pólen das variedades diploides exige uma menor

concentração em açucar para uma boa germinação que as restantes variedades.

Para a maioria dos autores, a adição de boro em quantidades reduzidas (até 10 ppm) no meio de crescimento, aumenta a percentagem de germinação e o comprimento dos tubos polinicos. Esta influência positiva do boro na germinação do pólen, desde há muito tempo conhecida, é devida à deficiência do pólen naquele elemento, que é compensada em geral pelos elevados niveis existentes no estigma e pistilo (VASIL, 1964).

BREWBAKER e KWACK (1963) observaram em cerca de 100 espécies que o cálcio é a seguir ao boro, o mais importante estimulador da germinação e crescimento do tubo polinico, tanto "in vivo" como "in vitro".

Segundo REMY (1953), também o ferro a 10 ppm pode estimular a germinação do pólen. Em contrapartida o cobre e o zinco parecem reduzir a sua germinação.

FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ-VALLEDOR e RALLO (1981), em estudos sobre o pólen de oliveira, observaram que a baixa germinação observada em alguns casos se devia à presença de bactérias no meio de cultura. Neste caso a adição de 10 ppm do antibiótico tetraciclina, pôde resolver o problema.

É admitido pela maior parte dos autores, que a concentração de grãos de pólen da mesma variedade estimula a germinação e o comprimento do tubo polinico (REMY, 1953), aumentando também em cerca de 20% a velocidade de crescimento deste.

Segundo SAVELLI (1940, citado por REMY, 1953), o fenómeno da estimulação mutua dos grãos de pólen, explica-se admitindo que substâncias contidas no grão de pólen e libertadas para o meio quando da sua germinação, favorecem a própria germinação. A concentração dessas substâncias aumentaria assim com a densidade de tubos polinicos.

O mais importante de todos os factores ambientais é sem duvida a temperatura. Parece no entanto existirem diferenças nitidas entre as várias espécies, tanto no que

respeita ao óptimo deste factor para germinação, como aos limites inferiores e superiores em que esta é possivel.

Para WILLIAMS e MAIER (1977), na macieira a temperatura óptima é de 20°C. Na oliveira situa-se entre 20°C e 25°C segundo FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ e RALLO (1983). Na videira parece estar entre os 20°C e os 30°C (WINKLER, 1926).

Em relação ao limite superior de temperatura a que a germinação é possivel, ROBERTS e STRUCKMEYER, (1948, referido em NSEIR, 1969) referem 36°C para a macieira, enquanto que em Pisum sativum esse limite se situa nos 24°C. Também HERRERO e JOHNSON (1980) estudando a influência da temperatura elevada na germinação de pólen de milho, observaram grandes diferenças de comportamento entre os genótipos utilizados, mas em todos eles a germinação diminuia acima dos 32°C, chegando mesmo aos 0%.

Em relação ao pólen de ameixeira, os estudos têem incidido mais no que respeita à influência das temperaturas baixas, pois são estas que em geral podem estar na origem de uma fraca frutificação. LEE (1980) refere que a temperaturas inferiores a 5° C o pólen da ameixeira não germina. Porém nos trabalhos de KEULEMANS (1984), em observações sobre a germinação a 4° C, apenas a cultivar 'R.Claudia D'Althan' não germinou, tendo mesmo algumas como a 'Queen Victoria', 'Czar', 'Opal' e 'Stanley' atingido niveis de germinação entre os 4% e os 15% para aquela temperatura.

BECKER (1932, citado por NSEIR, 1969) refere, que ao fim de 24 horas não observou qualquer grão germinado a 5°C, em pólen de ameixeira e de hibridos inter-especificos de cerejeira, embora tenha registado alguma germinação no caso de Prunus serotina.

Em relação à influência da luz, vários autores concluiram não haver qualquer influência sobre a germinação do pólen. No entanto LINSKENS (1964, citado por NSEIR, 1969) considera, que a exposição do pólen durante mais de oito horas à luz ultra violeta, diminui a capacidade de germinação.

Segundo SAITAN (1951, citado por REMY, 1953), o pólen recolhido no inicio e em plena floração é de boa qualidade ; porém o recolhido no fim da floração germina muito mal. Também FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ-VALLEDOR e RALLO (1981), observaram uma nitida perda de viabilidade no pólen de oliveira, quando recolhido após três dias da antese.

KLUNGNESS, THORP e BRIGGS (1983) referem, que o tempo chuvoso e nublado além de diminuir a deiscencia das anteras, afecta também negativamente a qualidade do pólen deiscente, provávelmente devido a um aumento da sua actividade respiratória.

Um factor que pode influenciar também negativamente a germinação do pólen é a sua passagem pelo excicador, sobretudo se a temperatura fôr elevada. REMY (1953) encontrou uma diminuição de cerca de 30% na germinação do pólen apenas devido a este factor.

Observações efectuadas por POLITO e WEINBAUM (1988), sugerem diferenças de viabilidade do pólen de algumas cultivares de nogueira consoante a idade das árvores. Pólen de árvores em inicio de frutificação apresentou menor viabilidade que o proveniente de outras já adultas, chegando a diferença em certos casos aos 50%. Em contrapartida não foram encontradas diferenças significativas em Pistáchio e Kiwi. Também LEE (1980) refere, que na mesma planta a viabilidade do pólen é um parâmetro que pode variar muito de ano para ano.

Segundo REMY (1953), a maior parte dos produtos utilizados como pesticidas, tem um efeito inibidor sobre a germinação do pólen e seu crescimento, alguns deles destruindo-o mesmo. BONOMO e TIEZZI (1986) sobre pólen de macieira germinado "in vitro" observaram uma inibição sensivel tanto na percentagem de germinação, como no comprimento do tubo polinico, provocado pela presença de Alar (Daminozide) e dos fungicidas Bitertanolo e Fenarimol.

Em relação à influência dos reguladores de crescimento, VITI, VITAGLIANO e BARTOLINI (1986) em trabalhos sobre amendoeira e damasqueiro, observaram um significativo aumento da percentagem de germinação provocado pelo tratamento com

"Siapton 10 L" a 1000 ppm, enquanto que a aplicação de ácido giberélico (Ga3) a 200 e 400 ppm inibiu em geral a germinação. O Paclobutrazol não produziu qualquer efeito significativo, excepto a altas concentrações (3000 ppm), que provocou também um decréscimo na percentagem de germinação.

3.4 - Interacção pólen-pistilo. Periodo de Polinização Efectivo.

3.4.1 - Definição e importância do Periodo de Polinização Efectivo (PPE)

Para que haja fecundação é necessário que o pólen uma vez depositado sobre o estigma pelos agentes polinizadores, germine e emita um tubo polinico que depois de atravessar todo o estilete penetre no óvulo e fecunde o saco embrionário. Para além de todos os factores genéticos já referidos, que podem influenciar o processo, este não se realiza se os três orgãos em causa; estigma, estilete e óvulos não estiverem funcionais. A constatação de que a viabilidade e longe-

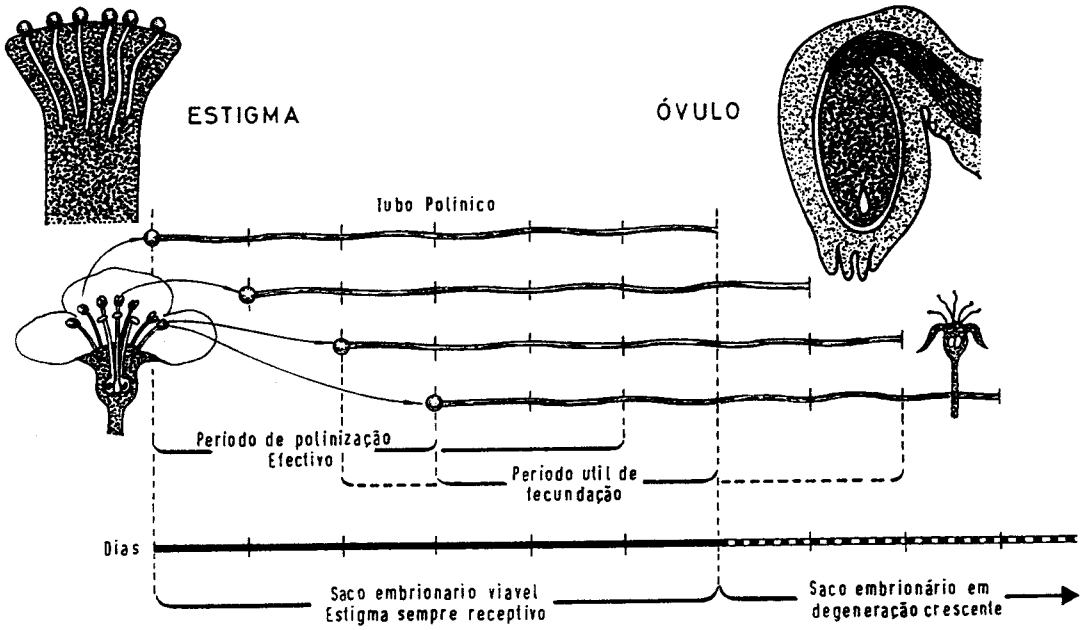


Fig.3.4 -Esquema representativo da importância do Periodo de Polinização Efectivo na possibilidade de fecundação do saco embrionário. Sg. LALATA, MARRO e SANSAVINI (1978)

vidade dos mesmos, afectados pelas condições ambientais, pode variar muito, levou WILLIAMS (1970) a definir o que hoje se chama de Periodo de Polinização Efectivo (PPE).

A duração do Periodo de Polinização Efectivo corresponde segundo o autor atrás referido, à diferença de tempo entre o necessário para que um grão de pólen germine sobre o estigma e atinga o óvulo e aquele que decorre desde a antese da flor, mais própriamente desde a receptividade do estigma, até à degenerescência dos óvulos (Fig.3.4). é em resumo, o curto periodo de tempo a seguir à antese, em que a polinização de uma flor será efectivamente seguida de fecundação e uma medida da longevidade do pistilo, expressa sobretudo pela receptividade do estigma e viabilidade dos óvulos.

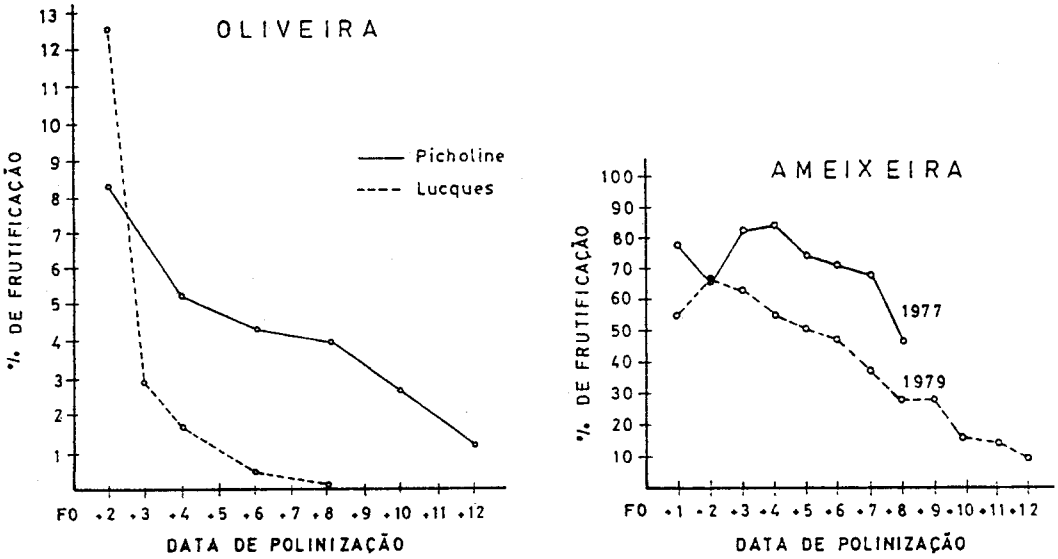


Fig. 3.5 -Efeito da data de polinização (em dias após a antese -Fo), sobre o índice de frutificação (em % do numero de flores). Em oliveira sg. DELMAS, ROZIER e VILLEMUR(1989) e ameixeira sg. BUNEMANN e LEE (1981)

Na cultura de fruteiras em que como espécies alogâmicas que são, a sua frutificação está largamente dependente da eficiência da polinização, é essencial que o Periodo de Polinização Efectivo seja o mais amplo possivel, pois aumenta a probabilidade do pólen ser transportado pelos agentes polinizadores até ao estigma. A importância do PPE na frutificação final, está bem patente nos exemplos apresentados na fig. 3.5. O numero de factores que podem interferir em todo o processo é no entanto muito grande e de diversas origens, como veremos a seguir.

3.4.2- Germinação do pólen "in vivo". Factores de influência

O estigma constituindo a primeira estrutura a entrar em contacto com os grãos de pólen, está dotado de receptores para o reconhecimento da informação contida nestes ultimos, determinando desde logo a sua germinação. é em geral recoberto por células glandulares situadas terminalmente ou lateralmente consoante as espécies (KNOX, WILLIAMS e DUMAS 1986).

De acordo com a existência ou não de secreção na altura da floração, assim se definem dois tipos de estigma; tipo humido e tipo seco. Nas Rosáceas e portanto na ameixeira, o estigma é do tipo humido, segregando durante o periodo em que se encontra receptivo um liquido que ajuda à fixação do pólen. Este liquido além de constituir a expressão exterior da maturidade do pistilo, é ainda em certos casos, o primeiro local onde se faz o reconhecimento do pólen incompativel.

De acordo com GAUDE e DUMAS (1987), o humedecimento do estigma proporciona também uma rápida hidratação do pólen, facilitando a sua germinação. Com efeito, nas combinações compativeis e imediatamente a seguir à plena adesão do grão de pólen à superficie estigmática, inicia-se um fluxo de àgua do estigma para o pólen, devido à diferença de potencial existente entre ambos.

O periodo de receptividade do estigma, assim como a sua duração, é da máxima importância para a eficiência da polinização. Geralmente associado à antese da flor, o periodo

de receptividade pode constituir só por si uma barreira à polinização, como no caso da dicogamia em que a maturação dos orgãos florais femininos e masculinos da mesma planta, ocorrem em alturas diferentes. Neste caso o PPE é nulo. Nas Rosáceas, os problemas de dicogamia não são muito importantes, estando a duração do PPE mais dependente da temperatura,

A receptividade do estigma, que está no caso das prunoideas directamente relacionada com a secreção estigmática, inicia-se em geral logo a seguir à antese, atinge um máximo entre o primeiro e segundo dia de floração e decresce a partir daí mais ou menos rápidamente consoante as espécies e as condições climáticas (MARTINEZ-TELLEZ e CROSSA-RAYNAUD, 1982). DORSEY (1919a), refere para as ameixeiras uma duração média do periodo de receptividade de 4 a 6 dias.

O aparecimento da secreção estigmática marca o inicio do PPE. No caso das ameixeiras, o facto do estigma ficar receptivo algum tempo antes da maturação do pólen e da deiscência das anteras, pode limitar bastante a polinização efectiva. A utilização de polinizadoras surge assim, como a melhor forma de aproveitar todo o PPE.

WILLIAMS (1963) observou em macieiras, que a aplicação de azoto no Verão precedente, pode aumentar o PPE, através do prolongamento tanto do periodo de receptividade do estigma como da longevidade dos óvulos.

A germinação do pólen "in vivo" está dependente não só da sua capacidade germinativa, mas também da influência do estigma receptor, que funciona como meio de cultura neste caso. BUNEMANN e LEE (1980) observaram que nas condições ambientais normais do pomar, o pólen da mesma cultivar germinava entre 70% a 92% sobre o estigma de certas cultivares e apenas 5.1% a 3.8% sobre o estigma de outras. Em contrapartida, quando a polinização era realizada em laboratório a 22°C, essa diferença não existia.

Tal como o verificado "in vitro", também sobre o estigma a densidade de grãos além de influênciar positivamente a percentagem de germinação, determina favorávelmente o crescimento do tubo polinico ao longo do estilete. LEE (1980)

observou esta correlação positiva em cultivares de *P. domés-tica*, cuja polinização artificial possibilitou populações de 2 a 250 grãos de pólen por estigma. Também sobre macieira WILLIAMS e MAIER (1977), observaram uma influência positiva da quantidade de pólen sobre o estigma no crescimento do tubo polinico. Esta relação porém só é válida para as combinações compativeis.

3.4.3 - Crescimento do tubo polinico

3.4.3.1 - Influência da temperatura e de outros factores

A temperatura durante o periodo da floração, é considerado por todos os autores como o factor mais importante no crescimento do tubo polinico, além do genético, condicionando o índice de vingamento. A acção da temperatura traduz-se por uma maior ou menor velocidade de crescimento do tubo polinico, determinando alterações importantes ao nível do Periodo de Polinização Efectivo (KEULEMANS, 1984).

Sendo a ameixeira uma espécie de floração relativamente precoce, este factor pode mesmo tornar-se decisivo para o êxito da cultura em determinada região. Segundo KEULEMANS (1984), este é mesmo o problema mais importante na produção de ameixas de países setentrionais como a Bélgica por exemplo. Este autor observou para algumas cultivares, que a 12°C o tubo polinico crescia dez vezes mais depressa que a 4°C.

Também na costa ocidental dos E.U.A., com a cultivar 'Italian Prune', na Inglaterra com a 'Vitória' e na Alemanha com muitas outras cultivares, o problema tem vindo a ser estudado. Neste ultimo país, Lee (1980) verificou que o pólen da maioria das cultivares testadas, atinge em quatro dias apenas o saco embrionário a 20-21°C, metade do tempo necessário que a 10-11°. SURKOVA e SKIPINA (1963, citados por THOMPSON e LIU, 1973) referem 3,5 dias na cultivar 'Italian Prune', para uma temperatura média de 15.3°C e 7 a 8 dias se a temperatura média descer para os 11,6°C.

A limitação no crescimento do tubo polinico, provocada pelas baixas temperaturas, pode ser uma das razões para a irregularidade de produção tão caracteristica de algumas

cultivares da *P. doméstica*. De facto sendo a fecundação absolutamente necessária para haver produção, o tempo que o tubo polinico leva a atingir o ovário, condicionado pelas condições de temperatura, influencia decisivamente a percentagem de vingamento das flores (Fig. 3.5-b). Segundo observações de JEFFERIES et al (1982) efectuadas sobre a cultivar 'Vitória', o tempo necessário para o tubo polinico atingir o óvulo é 40-50 dias-grau para temperaturas acima de 2.5°C, o que equivale a 16-20 dias a 5°C e apenas 3-4 dias a 15°C. Estes resultados foram registados independentemente de se tratar de autopolinização ou interpolinização.

THOMPSON e LIU (1973) atribuiem mesmo ao factor temperatura durante o crescimento do tubo polinico, uma importância superior à própria polinização. No entanto essa influência parece variar muito com as cultivares (Fig. 3.5-a).

KEULEMANS (1980), encontrou para algumas como 'Stanley', 'Monsieur Hatif' e 'R.C. D'Althan' uma relação muito importante entre temperatura durante a floração e produtividade. Em contrapartida para as cultivares 'Blue de Belgique' e 'Santus Hubertus' parece não se verificar qualquer relação. Por sua vez THOMPSON e LIU (1973) referem que a cultivar 'Stanley' por exemplo, apresenta geralmente boas produções mesmo a temperaturas baixas durante a pós-floração. A explicação para esta diferença de sensibilidade à temperatura, pode estar no facto das variedades indigenas de regiões frias, já estarem de certa forma adaptadas às baixas temperaturas durante a floração.

Também noutras espécies de prunoideas de floração precoce, como por exemplo a amendoeira, este problema tem vindo a ser estudado e correlações positivas entre a temperatura e o crescimento do tubo polinico tem sido encontradas (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1979; VASILAKADIS e PORLINGIS, 1984).

SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) observaram que a influência da temperatura sobre o crescimento do tubo polinico em amendoeira, varia com a origem do pólen, independentemente do fenómeno da incompatibilidade. De facto mesmo nas cultivares auto-compativeis, a velocidade de crescimento

é sempre maior em polinização cruzada que em autofecundação, registando-se um menor decréscimo com a diminuição da temperatura, no primeiro do que no segundo caso.

A temperaturas superiores a 30 °C, a germinação e crescimento do tubo polinico parecem constituir um processo com pouca homogeneidade, observando-se em geral a sua degradação. Segundo VAN WENT e WILLEMSE (1984, referido em MAESTRO e ALVAREZ, 1988), a explicação para a redução na germinação pode estar no facto das temperaturas elevadas, ao reduzirem a humidade relativa da atmosfera vizinha do estigma, dificultarem a hidratação do pólen.

Em amendoeira, SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) observaram que a 30°C e em autofecundação, após ter no inicio uma velocidade de crescimento normal, o comprimento final do tubo polinico era nitidamente inferior do que a temperaturas mais baixas. Também VASILAKAKIS e PORLINGIS (1984), observaram a mesma inibição do tubo polinico a temperatura de 30°C em autofecundação na cultivar autocompativel 'Truoito'.

Para além da influência da temperatura, que como já vimos limita de uma forma decisiva o crescimento do tubo polinico, também a natureza genética das variedades pode ser considerada um factor a interferir nesse mesmo processo. O tempo necessário para o grão de pólen depois de chegar ao estigma, percorrer todo o estilete e efectuar a fertilização do óvulo é determinante do nível de vingamento obtido. Em primeiro lugar esse periodo varia com as espécies e as variedades, mas também com o polinizador.

De acordo com LEE (1980), o crescimento do tubo polinico ao longo do estilete é além de outros factores, como a temperatura e a densidade de grãos sobre o estigma, influenciado pelas caracteristicas genéticas dos dois progenitores.

Ainda segundo LEE (1980) e SURANYI (1976), não há qualquer relação entre o comprimento do tubo polinico e o do pistilo. Assim, a distância do estigma ao saco embrionário, que varia com as cultivares e com as condições ambientais, não pode ser tomada como um factor condicionante do crescimento total do tubo polinico.

Segundo BHATTACHAJYA e LINKSEN (1955), mesmo nos casos de compatibilidade, nem todos os tubos polinicos que iniciam o seu crescimento chegam ao ovário. Grande parte deles param no primeiro terço do estilete, a que estes autores chamam zona de interferência.

Generalizando a teoria para a incompatibilidade proposta por MULCAHY e MULCAHY (1983, referidos em GAUDE e DUMAS, 1987), às interacções pólen-pistilo compativeis, poderiamos supor que a velocidade de crescimento do tubo polinico, não é mais que a expressão das diferenças genéticas entre os progenitores ao nível dos alelos S. Assim se explicaria o facto de em polinização cruzada o crescimento do tubo ser sempre mais rápido que em autofecundação.

Desta forma seria também possivel explicar o facto de mesmo em polinização cruzada, certas cultivares serem mais eficientes que outras. Segundo observações de LEE (1980), o pólen de 'Czar' e 'Stanley', atravessou os estiletes de todas as cultivares testadas, sempre em menos tempo, que outras nas mesmas condições. Isto vêm confirmar as referências de certos autores, em relação ao facto de independentemente da concordância de floração, haver boas e más polinizadoras.

Uma possibilidade de melhorar a produtividade, nas regiões onde as condições da Primavera são más para o vingamento, é a de escolher para polinizadoras cultivares que tenham um rápido crescimento do tubo polinico, aumentando assim o PPE. No entanto também as técnicas culturais podem ser decisivas para o aumento do PPE (WILLIAMS, 1963).

Para além da determinação genética, ROSEN (1975) considera ainda ao nível da interacção pólen-pistilo, uma influência quimiotrópica e nutricional. No entanto, embora tidas como importantes, a natureza das substâncias que podem actuar como factores quimiotrópicos, orientando o crescimento do tubo polinico em determinado sentido, bem como os seus mecanismos de actuação, estão ainda em grande parte por esclarecer.

MASCARENHAS (1973, referido por SOULIE, 1980) indica uma certa actividade quimiotrópica dos iões CA++ em certas

espécies. Segundo MORGENSEN (1972, referido por ROSEN, 1975) os sinergideos seriam a fonte de substâncias quimiotrópicas, que permitem guiar os tubos polinicos ao longo do estilete.

Segundo ROSEN (1975), o comprimento atingido pelo tubo polinico em algumas espécies, relativamente à dimensão do grão de pólen, leva a concluir que durante o seu crescimento, uma grande parte da energia necessária ou das substâncias estruturais provêem do pistilo. Estudos diversos permitiram já concluir, que o tubo polinico incorpora dentro das suas paredes substâncias segregadas pelas células do estilete. A secreção estigmática rica em hidratos de carbono que aparece durante a antese das flores, será um desses produtos.

De acordo com MULCAHY e MULCAHY (1983, referido por GAUDE e DUMAS, 1987) o tubo polinico proveniente de pólen binucleado, apresenta nas combinações compativeis, duas fases distintas de crescimento. Na primeira o crescimento é relativamente lento, sem formação de calose e consumindo apenas as reservas do grão de pólen, autotrófico portanto. Na segunda, o crescimento é mais rápido, iniciando-se a formação de calose e a nutrição é herotrófica, recebendo nutrientes do estilete.

3.4.3.2 - A observação do crescimento do tubo polinico "in vivo". Fluorescência da calose.

Segundo LEE (1980), o crescimento do tubo polinico "in vivo" está sempre positivamente correlacionado com a percentagem de germinação "in vitro". No entanto a observação directa do crescimento do tubo polinico ao longo dos tecidos do estilete, é cada vez mais o método utilizado para estudar a interacção pólen-pistilo. A técnica que veio facilitar estes estudos consiste na observação dos tubos polinicos ao microscópio com luz fluorescente, após fixação dos mesmos e coloração com um corante especifico para a calose existente naquelas estruturas.

Este método relativamente simples, que possibilita a obtenção de imagens nitidas da germinação do pólen e crescimento do tubo polinico, vem sendo regularmente utilizado nos

trabalhos de melhoramento, para verificar a existência de incompatibilidade entre diferentes plantas antes do seu cruzamento (KHO e BAER, 1968 e 1970; IVANICKA, 1977; UDACHINA, 1976). Pode também constituir uma forma de estudar a influência que a temperatura tem na percentagem de germinação e na velocidade de crescimento do tubo polinico (KEULEMANS, 1984).

A observação das manchas de calose correspondentes ao crescimento dos tubos polinicos, mostra bem as diferenças entre as combinações compativeis e as incompativeis. Enquanto que nos tubos polinicos compativeis, as manchas são continuas e finas, nas incompativeis pelo contrário, observam-se manchas espessas e em geral os tubos são tortuosos, havendo mesmo um espessamento no final do tubo (STOTT, 1972).

A calose, nome utilizado pela primeira vez por MANGIN (1890) para designar uma nova substância existente na membrana dos fungos e cuja analogia à celulose foi notada pelo mesmo autor em 1910, é mais conhecida e estudada como meio de reconhecer e observar certos orgãos a que está ligada, do que como produto em si mesmo.

Segundo DUMAS e KNOX (1983) a calose é um polisacarideo da parede celular composto na generalidade por 1.3 B glucose. Para além de constituir uma boa expressão fenotipica para a observação de fenómeno da incompatibilidade, possibilita ainda a observação da viabilidade do estigma e do óvulo, possibilitando assim o estudo do periodo de polinização efectivo (PPE).

Segundo ASPINAL e KESSLER, (1957 referidos por LATORSE, 1981), a calose é um polissacarideo ramificado constituido por residuos de B D glucopiranose e 2% de residuos de ácido urico. Para TUPY (1959), a sua origem está no protoplasma polinico senescente, onde o sistema enzimático activador das hexoses deixou de funcionar.

A maior duvida hoje está em saber, como refere GAUDE e DUMAS (1987), se a calose constitui ela mesma a reacção de rejeição do pistilo ou se é já a consequência dessa mesma reacção. Os mais recentes estudos apenas permitem supor, que a formação de calose é uma resposta da reacção de

incompatibilidade, desencadeada pela interacção entre a informação contida no pólen e os componentes da superficie do estigma.

Segundo TUPY (1959), a maior quantidade de acumulações de calose observada nos tubos polinicos incompativeis, muito semelhante à que se observa nos crescimentos do tubo polinico em meio artificial, não são um resultado imediato do fenómeno de imcompatibilidade, mas sim uma reacção secundária provocada pela paragem do seu crescimento. Segundo este autor, as manchas de calose correspondentes aos tubos polinicos são mais regulares e lineares nas combinações compativeis do que nas incompativeis.

Ainda segundo TUPY (1959), o poliglucósido calose seria originado a partir da glucopiranose que se acumula como componente não consumido do processo de respiração, em virtude da existência de um fraco sistema enzimático para a utilização daquelas formas de açucares no crescimento do tubo polinico. Assim, a parte de glucose respeitante à sacarose metabolizada, seria utilizada na formação das paredes do tubo polinico, enquanto que a restante, devido à sua fraca utilização na respiração, se acumularia na forma do polisacarideo calose. Desta forma se explicaria a maior acumulação de calose nos tubos incompativeis. Sendo o consumo de açucares igual nos tubos compativeis e incompativeis, a acumulação de glucopiranose será maior nestes ultimos, em virtude de não poder ser utilizada na formação das paredes do tubo polinico (LINSKENS, 1955, citado por TUPY, 1959).

Além de existente no tubo polinico, a calose é um constituinte celular que aparece em diversos tecidos vegetais como por exemplo no liber, laticiferos, pêlos e membrana dos fungos, parecendo ser uma fase intermédia na sintese e degenerescência da parede celular (CURRIER, 1957). A sua função especifica é porém desconhecida.

Segundo UDACHINA (1976), a calose destina-se a dar ao tubo polinico um suporte mecânico suficiente, resistindo aos tecidos do estilete que apertam o tubo.

O principio de observação da calose baseia-se na sua absorção selectiva para certos corantes, emitindo uma luz fluorescente quando é iluminada por radiações no espectro do azul ou do ultra-violeta. Utiliza-se em geral um microscópio em que a luz é emitida por uma lâmpada de mercurio, obtendo-se o comprimento de onda desejado, intercalando entre a ocular e a objectiva diversos tipos de filtros.

Segundo PREIL (1970), a sintese de calose ao longo do tubo polinico e a sua posterior estabilidade, está dependente até certo ponto das condições ambientais e culturais das plantas durante o crescimento do tubo. A alta temperatura, baixa luminosidade, ou stres hidrico podem reduzir a posterior fluorescência dos tubos polinicos.

NSEIR (1969) refere vários corantes possiveis para conseguir a fluorescência da calose:

-Azul algodão de lactofenol: 0.08 a 1 % de azul algodão. O lactofenol é obtido juntando partes iguais de ácido láctico, de fenol, de glicerina e de água.

-Carmim acético: 45 cc de ácido acético glacial, 55cc de água destilada fervida, 0,5 g de carmim.

-Fucsina ácida-verde brilhante: 54 cc de ácido lactico, 6 cc de glicerina, 1 cc de ácido fucsino 1%, 1 cc de azul brilhante 1%.

Um dos corantes mais utilizados hoje, é o azul de anilina a 0,1%, numa solução de fosfato tripotassico (K_3PO_4) 0,1N, preconizado por MARTIN (1959).

Para JEFFERIES e BELCHER (1974), quando nos tubos polinicos de ameixeira as manchas de calose são pouco espessas, a técnica de MARTIN não é suficiente para obter uma boa fluorescência, tendo obtido melhores resultados com uma mistura de 0.1% de azul de anilina e 0.07% do corante "Calcofluor White M2R New" também fluorescente mas mais brilhante.

Segundo DUMAS e KNOX (1983), para uma boa observação da calose utilizando os métodos clássicos, a fixação do material deve ser feita o mais rápidamente possivel, utilizando uma solução de álcool-ácido acético (3:1) ou o Faa (80% de

álcool absoluto, 10% de ácido acético glacial e 10% de formaldeido).

Para facilitar o esmagamento dos pistilos na preparação, antes de proceder à coloração, dois métodos podem ser seguidos:

-tratamento em autoclave numa solução de 50 g/l de sulfito de sódio, durante 10m a uma hora e à temperatura de 121°C (JEFFERIES e BELCHER, 1974). Este método tem a vantagem de ser rápido e não provocar quaisquer danos sobre os tecidos.

-tratamento por imersão desde algumas horas até vários dias, numa solução saturada 8N de Hidroxido de Sódio (MARTIN, 1959).

3.4.4 - Fecundação nas prunoideas

3.4.4.1 - Longevidade dos óvulos. Sua observação à fluorescência.

A receptividade dos óvulos, que pressupõe a sua capacidade para receber o tubo polinico, constitui a ultima barreira do pistilo à realização da fecundação e determina o fim do periodo util de fecundação (Fig. 3.4).

Já WILLIAMS (1966) referia a importância do estudo de métodos que permitissem aumentar o Periodo de Polinização Efectivo, não só pela aceleração do crescimento do tubo polinico, mas também pelo aumento do tempo de viabilidade dos óvulos.

THOMPSON e LIU (1973), observando que a irregularidade de produção na ameixeira 'Italian Prune' na região Noroeste dos USA junto ao Pacifico, parecia estar relacionada com as condições climáticas do periodo imediato a seguir à floração, concluiram tratar-se de facto da degenerescência precoce dos óvulos. Esta degenerescência, que começa pelo nucelo no fim da calaza, impede a existência de fecundação, quando o tubo polinico finalmente ali chega. Em geral esta situação ocorre, quando a temperatura na pós floração é baixa, retardando o crescimento do tubo polinico.

No entanto, se por um lado a temperatura acelera o crescimento do tubo polinico, por outro acelera também a degeneresçência dos óvulos, diminuindo a sua longevidade. SOCIAS Y COMPANY e FELIPE (1979) referem por exemplo, que para a amendoeira, quando a temperatura sobe acima de 27°C o processo de envelhecimento do óvulo é muito rápido, tornando impossivel a fecundação se a polinização não é realizada imediatamente a seguir à antese. A importância deste facto parece depender muito das espécies e mesmo das variedades e tem sido apontado por outros autores, como responsável por baixos índices de fertilização em cerejeira e macieira.

A temperatura pode assim aumentar ou diminuir o PPE, consoante ela acelera mais o crescimento do tubo polinico ou a degenerescência dos óvulos respectivamente. Na ameixeira 'Italian Prune' em autopolinização, THOMPSON e LIU (1973) não observaram qualquer influência negativa da ligeira diminuição da longevidade dos óvulos em anos de temperaturas elevadas durante a floração e pós-floração, no vingamento final da cultivar. Aliás na maioria das referências a este problema, parecem ser mais de recear as temperaturas baixas do que as demasiado elevadas.

Segundo LEE e BUNEMANN (1981), a longevidade dos óvulos condicionada de perto pelos factores ambientais, sobretudo a temperatura, pode variar muito de ano para ano. No entanto ela é também uma caracteristica de cada espécie e mesmo de cada variedade (STOTT, 1972). Assim, independentemente do tipo de condições ambientais e forma de polinização, haverá variedades em que por determinação genética o PPE é maior do que noutras.

A observação de fluoresçência nos óvulos, tem sido associada com a degenerescência dos mesmos, após a qual se comprovou ser impossivel a sua fertilização, mesmo que se mostrem normais do ponto de vista citológico (DUMAS e KNOX, 1983; ANVARI e STOSSER, 1978). Observações realizadas por estes ultimos autores, permitiram concluir que nenhum tubo polinico penetra em óvulos que apresentem fluoresçência, existindo assim um mecanismo selectivo na direcção do tubo polinico. No entanto segundo aqueles autores, não é conhecida a substância que provoca a fluoresçência e que aparece apenas nos óvulos não fecundáveis.

Desta forma a observação em fluorescência permite a determinação num estado ainda precoce, durante o periodo de floração, do estado funcional dos óvulos, ao passo que a técnica clássica dos cortes histológicos, além de dificil de pôr em prática, não fornece resultados senão num estado já avançado de degeneresçência.

Nas espécies do género Prunus, em que cada ovário possui dois óvulos, apenas um em geral é fecundado, degenerando o outro. Segundo ANVARI e STOSSER (1978), o óvulo que degenera apresenta logo no momento da antese ou pouco tempo depois, uma forte fluorescência. Segundo aqueles autores, a fluorescência aparece no caso dos Prunus cultivados, cerca de 3 a 6 dias depois da antese. A fluorescência dos óvulos começa em geral pela região da calaza sendo sempre mais intensa nessa zona.

Nas observações de THOMPSON e LIU (1973), mesmo nos anos de temperaturas baixas durante a floração, que retardam bastante o envelhecimento do pistilo, todos os óvulos secundários degeneram ao fim do sexto dia após a antese.

Também SOLDATOV (1982), refere o facto de em geral na ameixeira, o segundo óvulo ainda que apresente um saco embrionário normalmente desenvolvido, degenerar nos primeiros dias de floração.

3.4.4.2 - Fecundação e vingamento

Cada grão de pólen de ameixeira contém dois nucleos, um deles divide-se para formar dois nucleos espermáticos. Quando o tubo polinico chega ao óvulo entra pelo micrópilo, um pequeno poro no tegumento que envolve o óvulo e ocorre a fecundação no saco embrionário, através da fusão da oosfera com um dos nucleos espermáticos do tubo polinico, originando o zigoto. Na ameixeira para que se dê a fecundação, basta que um só tubo polinico penetre dentro do óvulo e fecunde o saco embrionário, através da fusão das células germinais masculinas e femeninas. O segundo nucleo espermático funde-se com um dos dois nucleos polares do saco embrionário e origina o albumen.

Esta dupla fertilização dá origem a duas estruturas, o zigoto que se desenvolve num embrião dentro da semente, e o endosperma que resulta da proliferação celular na sequência da segunda fecundação com o nucleo polar.

De acordo com JEFFERIES (1975), o saco embrionário só atinge o seu desenvolvimento pleno algum tempo depois da antese. Este periodo que nas condições de Inglaterra para a cultivar 'Victoria' é de uma semana e meia, varia no entanto muito com as condições climáticas.

O albumen ou endosperma alimenta o desenvolvimento do embrião enquanto a semente amadurece, tendo assim uma existência transitoria. O seu desenvolvimento precede o do embrião e é consumido enquanto o embrião atinge a maturação. O albumen nas Rosáceas tem ainda um papel importante nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto, antes de ser substituido pelo próprio embrião, sendo o gerador de substâncias de crescimento (HUGARD, 1975).

Depois de fecundado, o óvulo inicia o seu desenvolvimento associado ao crescimento do ovário dizendo-se então que se verificou o vingamento do fruto. Nas prunoideas o fruto desenvolve-se a partir da parede do ovário e embora a semente não tenha valor comercial, o seu crescimento influencia positivamente o desenvolvimento daquele.

Durante a pós floração é no entanto impossivel de à vista desarmada, distinguir os frutos fecundados dos não fecundados. JEFFERIES (1975), refere mesmo que o desenvolvimento inicial do saco embrionário não fecundado, é semelhante ao que foi alvo de fecundação.

É frequente nas ameixeiras, como por exemplo também nas amendoeiras, ovários procedentes de flores polinizadas mas não fecundadas, iniciarem o seu crescimento. Este pseudo-vingamento do fruto, pode na ameixeira prolongar-se até aos 12 mm de diâmetro, acabando no entanto estes pequenos frutos por amarelecerem e cairem ao fim de duas ou três semanas depois da floraçãão. O crescimento do tubo polinico através do estilete, parece assim ser suficiente para produzir o estimulo necessário ao crescimento inicial do ovário, mesmo

no caso de incompatibilidade (KESTER e GRIGGS, 1959; MEITH et al, 1974, referidos por SOCIAS Y COMPANY e FELIPE, 1979).

De acordo com DORSEY (1919b) em trabalho sobre ameixeiras e outros autores como KESTER e GRIGGS (1959a) sobre amendoeira, existem três quedas naturais de frutos nas prunoideas entre a floração e a maturação. A primeira ocorre ainda durante a floração ou imediatamente a seguir e corresponde às flores defeituosas, onde não se regista sequer nenhum engrossamento do ovário. A insuficiente diferenciação das flores, parece ser o motivo principal desta queda. Como explicação do fenómeno apontam-se entre outras causas, a não satisfação das necessidades em horas de frio durante o Inverno.

A segunda queda regista-se entre duas a três semanas depois da floração no caso das ameixeiras. Nesta, caiem todos os frutos em que não houve fecundação, ou que o zigoto não se desenvolveu (LUCKA, 1959). É a partir desta altura que se pode observar a percentagem de vingamento real, ou percentagem de fecundação para alguns autores.

A terceira queda natural corresponde à normal queda de Junho, registada em quase todas as fruteiras. Esta queda regista-se na ameixeira cerca de duas semanas depois da anterior e deve-se a uma paragem no desenvolvimento do embrião provocada pela competição entre frutos (DORSEY 1919b).

3.5 - A polinização cruzada nas ameixeiras

3.5.1 - Vantagens na utilização de variedades polinizadoras

Durante muito tempo a necessidade da utilização de variedades polinizadoras em fruticultura não se pôs, podendo afirmar-se que este problema foi originado pela especialização cultural. A grande promiscuidade de variedades cultivadas existente nos pomares antigos, mascarava por completo grande parte dos problemas de esterilidade existentes, não se apercebendo o agricultor de casos graves de improdutividade devido a falta de polinização efectiva.

Com a selecção do material vegetal e o melhoramento cada vez mais apurado das cultivares, o agricultor foi diminuindo a variabilidade nos pomares, unica forma de conseguir os altos niveis de qualidade exidos pelo mercado. Chegamos assim ao extremo de pomares monovarietais e muitas vezes até monoclonais. é a partir daqui que os problemas de esterilidade e incompatibilidade, em variedades que por vezes até eram muito produtivas, se começam a registar.

As situações mais frequentes de auto-esterilidade que surgem em variedades cultivadas extremes, são como já vimos, devidas à falta de pólen viável, à inibição no crescimento do tubo polinico ou a irregularidades na fecundação. Nestes casos torna-se pois indispensável a introdução de outras variedades, que forneçam pólen compativel.

Nas prunoideas, os problemas de auto-esterilidade são graves sobretudo em amendoeiras, cerejeiras e ameixeiras. Em amendoeiras este problema foi desde muito cedo constatado, tendo sido estudado pela primeira vez por TUFTS em 1929 na California, tendo-se concluindo que todas as variedades de amendoeira cultivadas então naquela região eram auto-incompativeis, havendo ainda bastantes casos de inter-incompatibilidade (SOCIAS I COMPANY e FELIPE, 1979). A consociação de diversas cultivares nos pomares de amendoeira, é hoje uma regra básica da sua cultura.

Além das situações extremas de auto-esterilidade outras existem, em que devido à fraca percentagem de germinação do pólen, ou à auto-incompatibilidade parcial, a percentagem de frutificação não atinge um nível suficiente. Também nestes casos, o aumento da produtividade passa pela utilização de polinizadoras (SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY, 1976).

Segundo FACCIOLI e MARANGONI (1978), a consociação com outras variedades ou clones da mesma variedade, deve ser regra sempre que possivel nos pomares de prunoideas, mesmo tratando-se de variedades autoférteis, pois conduz a um aumento do índice de frutificação. A polinização cruzada proporciona sempre um maior numero de fertilizações que a autopolinização (BATEMAN, 1956 referido em REAL, 1983). De facto, sendo o crescimento do tubo polinico sempre mais

rápido no caso de polinização cruzada, é pois compreensivel que o PPE seja também maior, aumentando por conseguinte a probabilidade de fecundação dos óvulos.

Além do mais rápido crescimento do tubo polinico, que se traduz por um aumento no PPE, a polinização cruzada proporciona também um aumento do periodo em que há pólen disponivel no pomar. Deste modo é maior a probabilidade de coincidência do PPE com o Periodo de Transferência natural de pólen. Este ultimo, na definição de WILLIAMS e al (1984), corresponde ao periodo de deiscência das anteras, e pode em certas condições de clima e para uma cultivar, ocorrer só depois de ter já terminado o Periodo de Polinização Efectivo.

Também CRANE e LAWRENCE (1929) e KESTER e GRIGGS (1959b) observaram para a amendoeira, um maior índice de frutificação no caso de cultivares auto-compativeis polinizadas com pólen de outras cultivares, do que em autopo-linização. Parece pois existir uma elevada correlação entre a produção final e o numero de flores alvo de polinização cruzada.

Embora se entenda em geral por polinização cruzada, apenas a transferência de pólen de umas àrvores para outras, na verdade existe um outro tipo de interpolinização, que ocorre entre flores da mesma árvore e que alguns botânicos distinguem da verdadeira autopolinização. É porém óbvio que do ponto de vista genético, não se pode considerar esta como polinização cruzada. No entanto este tipo de polinização, devido às pequenas diferenças de fenologia das flores na mesma àrvore, tem muita importância na dilatação do Periodo de Polinização Efectivo (BARBIER, 1985).

A percentagem de vingamento ideal para uma boa produção varia muito com as espécies, mesmo dentro das prunoideas. Ela deve ser máxima por exemplo na amendoeira, onde 14% é considerada baixa (SOCIAS I COMPANY e FELIPE, 1987) e minima no pessegueiro onde cerca de 3% é apontado como suficiente. Varia também com a intensidade de floração da árvores, que é em geral determinada pela alternância fisiológica da cultivar.

Na ameixeira, várias referências existem sobre o índice de frutificação que possibilita atingir uma boa pro-

dução. Os numeros são no entanto muito diferentes consoante as variedades e os sistemas de condução utilizados, podendo apenas servir de indicação. CRANE e LAWRENCE (1949) indica por exemplo o numero de 12 %, como o ideal para em ameixeiras europeias se atingir uma boa produção. JEFFERIES (1975) refere que para a cultivar 'Victoria', um vingamento de 10 % é suficiente. THOMPSON e LIU (1972) referem para a 'Italian Prune', valores que podem variar de 4 % a 50 %, consoante a densidade de flores. Este factor é de facto o mais importante na diversidade dos valores referidos sobre este assunto. Para além de constituir uma caracteristica varietal, a densidade de flores por árvore, varia ainda muito de ano para ano em função da alternância fisiológica a que certas variedades estão sujeitas. Um bom exemplo é a 'Rainha Claudia Verde', que como já vimos manifesta em elevado grau esta caracteristica.

3.5.2 - Critérios na escolha das variedades polinizadoras e sua instalação no pomar

Se por um lado a utilização de variedades polinizadoras em ameixeiras, constitui quase a regra geral, a escolha das que possam funcionar como polinizadoras efectivas não é porém tarefa fácil. Um conjunto de condições deve ser satisfeito: -Concordância de floração entre ambas as variedades; -inter-compatibilidade com a variedade principal, de preferência nos dois sentidos; -percentagem elevada de germinação do polen; -interesse cultural da variedade polinizadora.

Encontrar uma concordância de floração todos os anos, é sem duvida o factor mais importante na escolha de uma variedade polinizadora. Não é no entanto fácil de conseguir, se atendermos a que as variedades reagem às irregularidades climáticas de modo diferente. Tal como refere TABUENCA e HERRERO (1965), as distintas variedades diferem tanto no que respeita às exigências de frio durante o Inverno para quebrar a dormência dos gomos, como nas exigências de calor na época que antecede a floração. Casos há em que a unica solução para diminuir o risco da não concordância das florações, é a utilização de mais que uma variedade polinizadora, uma de floração mais precoce que a outra.

Iniciando-se a receptividade dos estigmas em geral antes da deiscência das anteras, o ideal será que a antese da polinizadora preceda a da variedade principal, de modo a aproveitar ao máximo o PPE. Este facto pode ser ainda mais importante em casos como o da cultivar 'Prune d'Ente', onde o estigma tem tendência a mostrar-se mesmo antes da flor abrir, em pleno estado E, ficando receptivo algum tempo antes da deisçência das anteras. Nesta situação a consociação com outros clones ou variedades de floração mais precoce é essencial, sem o que o PPE se torna muito curto ou até, em certos climas que favoreçam a rápida degenerescência dos óvulos, mesmo inexistente.

Constituindo as polinizadoras cerca de 8 a 10 por cento das árvores num pomar, é desejável que elas sejam também produtoras de frutos interessantes. Este facto tem duas implicações: uma ao nível da escolha da própria variedade, condicionando assim ainda mais a escolha; a outra ao nível da polinização da segunda variedade. Se esta fôr também auto-estéril e inter-incompativel com a variedade principal, torna-se necessário utilizar uma terceira variedade como segunda polinizadora. Mesmo que tal não aconteça, no minimo existirá sempre uma menor eficiência da polinização neste segundo sentido, provocada pela floração ligeiramente mais precoce da segunda variedade.

O mais aconselhável será escolher variedades auto-férteis como polinizadoras, sempre que isso seja possivel, ainda que possa implicar perder um pouco na sua valorização como produtoras de frutos. A apoiar esta ideia está a referência de BERNHARD (1949), segundo a qual em variedades de ameixeiras auto-férteis, existe sempre inter-compatibilidade com outras variedades.

Nos seus trabalhos sobre a inter-compatibilidade em ameixeira europeia, BERNHARD (1949) observou diferenças de frutificação nitidas para a mesma variedade, utilizando pólen de diversas proveniências. Por exemplo para a 'Rainha Claudia Verde' esses valores variaram de 3 a 24 %. Em relação à compatibilidade entre clones de 'Rainha Claudia Verde', também estudada nesta altura por BERNHARD, nenhum dos quatro clones testados em interpolinização deu qualquer fruto.

Para além da escolha das variedades a utilizar como polinizadoras, outro factor importante é a sua instalação no pomar. De preferência, as árvores polinizadoras devem ser instaladas de modo a que haja uma fácil distribuição do pólen por toda a plantação. O numero de 8 a 10% do total de árvores, utilizado em geral como polinizadoras, poderá ser superior, se a variedade polinizadora também tiver interesse como produtora de frutos, podendo mesmo chegar até 50% de cada uma. Neste ultimo caso a organização da plantação é fácil, devendo-se optar por plantar uma linha de cada variedade alternadas, facilitando depois a colheita e as outras operações culturais.

No caso mais frequente porém, deseja-se reduzir a presença das polinizadoras ao minimo, caso em que a distância entre estas, bem como a sua distribuição no pomar é da máxima importância para se conseguir uma boa eficiência dos agentes polinizadores. Nesta situação o método mais utilizado é o de instalar uma polinizadora no meio de um quadrado ou um quincôncio de seis árvores da variedade a polinizar. KEULEMANS (1981) por exemplo, refere que a eficácia de uma polinizadora decresce muito para além de 15m.

As abelhas raramente visitam mais do que duas árvores em cada viagem, passando sempre para a que está mais próxima (MORSE e HOOPER, 1986). Convêm pois que em cada viagem a abelha visite a polinizadora e a variedade a polinizar, o que só é possivel com uma boa proximidade das polinizadoras.

Embora a instalação das variedades polinizadoras deva ser efectuada sempre na mesma altura da variedade principal, de modo a conseguir uma boa uniformidade do pomar e haver produção de pólen o mais rápido possivel, situações há em que, ou por desconhecimento do agricultor ou por informação bibliográfica errada, surge a necessidade de instalar árvores polinizadoras num pomar já adulto. Esta situação pode ter várias soluções possiveis, envolvendo no entanto qualquer delas sérios inconvenientes.

O arranque de algumas árvores e plantação das polinizadoras no seu lugar, tem o problema inerente a qualquer retancha, em que o crescimento da nova árvore é muito lento como resultado da concorrência das outras já instaladas.

Desta forma a produção de flores e portanto do pólen necessário, demora alguns anos.

A enxertia da variedade em ramos da variedade principal é outra solução possivel e mesmo aconselhada por alguns autores (NAVARRO, 1987). Além da dificuldade na condução da árvore posteriormente, esta técnica tem ainda o inconveniente de exigir alguns cuidados na colheita dos frutos para evitar misturas de variedades.

O método que parece susceptivel de causar menos inconvenientes, e ao mesmo tempo proporcionar uma entrada em floração rápida da variedade polinizadora, é a enxertia total de algumas árvores (GRIGGS e HESSE, 1969). O desenvolvimento inicial do enxerto é rápido devido ao sistema radicular já instalado e a nova árvore depressa atinge a maturidade fisiológica, entrando em floração. Condição essencial no entanto, é não decepar toda a árvore na altura da enxertia, tendo o cuidado de deixar durante um ou dois anos parte da antiga árvore, de modo a manter funcional o sistema radicular.

Uma técnica que pode também servir para a disseminação de pólen compativel num pomar, mas apenas como recurso temporário, é a colocação de ramos da variedade polinizdora dispersos pelo pomar. Os ramos devem ser recolhidos imediatamente antes da antese, durante o estado de botão branco e imediatamente colocados dentro de recipientes com àgua, que se espalham por todo o pomar. BERNHARD (1949) estudou precisamente a eficácia desta técnica como resolução do problema de polinização sobre 'Rainha Claudia' e verificou que com o aumento da distância à árvore portadora do ramo, a percentagem de frutificação diminui consideravelmente. Práticamente só a árvore na qual se colocou o ramo aumentou significativamente a sua produção. Também BRIGGS, THORP e KLUNGNESS (1983) estudando esta técnica em amendoeira, referem que a eficiência dos ramos decresce rápidamente com a distância, aconselhando mesmo a colocação de vários ramos por árvore.

Uma outra possibilidade, utilizada em algumas regiões dos EUA, é a aplicação directa do pólen sobre as árvores em plena floração, com a ajuda de polvilhadores ou até mesmo recorrendo a meios aéreos. Em geral o pólen é misturado com outros produtos inertes para proporcionar uma melhor dis-

tribuição, necessitando-se de cerca de 15 a 20 g de pólen por ha (HUGARD, 1975).

3.5.3 - Utilização de agentes polinizadores

Em todos os casos de plantas alogâmicas e sobretudo na maioria dos pomares em que a polinização cruzada é fundamental, o transporte do pólen das anteras até aos estigmas é decisivo para a eficiência da polinização. Nas Rosáceas o efeito do vento como agente polinizador é muito reduzido, sendo necessária a presença de insectos para efectuar esse transporte (DORSEY, 1919a; WILLIAMS, 1970; DE GREEF, DE WAEL e LAERE, 1983). No caso das ameixeiras, essa necessidade é ainda mais marcada em virtude do pólen ser pesado (CHAUVIN, 1985) e da deiscência só ocorrer algum tempo depois da antese, impossibilitando a auto-polinização pelo contacto entre os estamess e estigma. Nestas espécies a polinização é pois sobretudo entomófila.

Em observações sobre a variedade 'Quetsche de Italia', THOMPSON e LIU (1972) referem que no caso de auto-fertilidade as abelhas não são necessárias para uma eficiente polinização. Também JEFFERIES (1975) refere que o movimento dos ramos causado pelo vento, pode constituir um importante meio de dispersão do pólen. No entanto este autor observa, que a insuficiência de pólen sobre o estigma, pode constituir uma das causas de fraco vingamento, sobretudo no caso de variedades com uma elevada percentagem de pólen estéril. Além disso a produção de pólen na ameixeira europeia é relativamente fraca comparada com outras Rosáceas, pelo que sem um activo meio de dispersão, a quantidade depositada sobre o estigma será sempre fraca.

Segundo o INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE (1979) e GRIGGS e HESSE (1963), a abelha doméstica (Apis melifica L.) constitui o agente polinizador mais importante do género Prunus. Outros insectos podem ainda intervir na polinização destas Rosáceas de caroço, como por exemplo os Bombus sp. e outros pertencendo às familias dos Andrenidae e Megachildae, mas com muito menor importância. De acordo com o primero daqueles autores, as populações hibridas de abelhas italo-

caucasianas, caucaso-negras e italo-caucaso-negras, são melhores polinizadoras que as populações puras.

A importância da utilização das abelhas como agente de polinização das fruteiras é ainda maior, porque é possivel através de um adequado maneio das colmeias durante o periodo de floração, aumentar ou diminuir a sua eficiência em função das necessidades concretas de polinização em cada pomar. Segundo TORREGROSSA (1987), o nível de frutificação está mais relacionado com o tempo de permanência das abelhas no pomar, do que com o numero de colmeias por ha. Tal permite por exemplo que nos anos em que se espera uma produção demasiado elevada, se diminua o tempo de permanência das abelhas no pomar. Em anos de contra-safra ou de más condições climatéricas durante a floração, deve-se aumentar esse periodo.

A produção de nectares, essencial para atrair as abelhas, é relativamente reduzida na ameixeira, segregando cada flor em média por dia 0.96 a 1.74 mg de nectar segundo o INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE (1979), cerca de três vezes menos que na macieira. Este facto implica um maior cuidado na distribuição das colmeias no pomar.

Segundo RICHARDS (1986), que refere também a produção de nectar como um factor da maior importância na preferência que as abelhas dão às flores, tanto a baixa produção como a excessiva, são contrários à eficiência destes insectos como agentes polinizadores. Considera este autor, que no caso de abundância de nectar, embora a quantidade de pólen recolhido pelas abelhas seja também elevada, a necessidade de visitar muitas flores diminui, o que implica uma diminuição da polinização cruzada.

A abelha doméstica visita em média de 4 a 11 flores por minuto, consoante procura apenas nectar ou também pólen, totalizando 15 a 56 flores respectivamente por cada viagem à colmeia (INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE, 1979). A intensidade de circulação das abelhas está no entanto relacionada de perto com as condições climatéricas, preferindo os dias de sol, e sobretudo os periodos do fim da manhã e inicio da tarde. Segundo MORSE E HOOPER (1986) os carregamentos de pólen tendem a aumentar com a temperatura, o que implica

visitar um maior numero de flores por cada viagem e portanto uma maior dispersão do pólen.

DOYLE e PHILOGENE (1983) referem, que embora as abelhas sejam o agente polinizador mais importante nos pomares comerciais, outros insectos nativos podem também desempenhar um importante papel, sobretudo nos anos em que as condições climáticas durante a floração são más. Também DE GREEF, DE WAEL e LAERE (1986), chamam a atenção que embora as abelhas constituam um poderoso agente de polinização, possuem a grande desvantagem da sua eficácia estar muito dependente das condições ambientais.

Segundo FREE (1970, citado em SOCIAS I COMPANY e FELIPE, 1979), é entre 15 e 26°C que as abelhas desenvolvem mais actividade, cessando-a completamente quando a temperatura desce abaixo dos 10°C. HUGARD (1975) refere a temperatura de 20°C como a óptima. Outros factores como a chuva e o vento prolongado, limitam também bastante a circulação das abelhas, condicionando assim indirectamente a eficiência da polinização (DORSEY, 1919a).

De acordo com os mais recentes estudos sobre a eficiência da forrageação das abelhas, esta é sempre o resultado da optimização para a colmeia, do ganho entre o total de calorias dispendido nas viagens e o total de calorias armazenado em pólen e nectar (RICHARDS, 1986). Assim se explica a sua preferência por flores próximo da colmeia, bem como a redução de actividade em dias frios.

Uma boa dispersão das colmeias pelo pomar é pois essencial, para tirar o melhor partido deste agente polinizador. De acordo com HUGARD (1975), as abelhas transportam o pólen apenas a pequenas distâncias, preferindo mesmo por exemplo deslocar-se ao longo das linhas nos pomares alinhados do que perpendicularmente a elas. Segundo REAL (1983), no caso de existir abundância de flores como sucede durante a floração de um pomar, as abelhas tendem a visitar a mesma área repetidas vezes, deslocando-se o minimo possivel da colmeia de modo a aumentar a eficiência de forrageação. É assim geralmente aconselhado distribuir as colmeias em grupos não superiores a quatro, distantes uns dos outros o máximo de 200 metros. Para a maioria dos autores, cerca de 4 a 6

colmeias por ha são em média suficientes, para se obter um bom nível de polinização cruzada em ameixeira.

Um outro problema a considerar na utilização das abelhas como agente polinizador, é o das plantas concorrentes existentes no pomar, cujas flores podem merecer a sua preferência. Embora SADA (1987) refira que as flores da ameixeira são muito apetecidas pelos insectos, não havendo assim o perigo da flora circundante levar as abelhas, é em geral aconselhado trazer as colmeias imediatamente antes da floração para o pomar, e manter o mesmo sempre limpo de infestantes.

3.5.4 - Polinizadoras da 'Rainha Claudia Verde'. Estudos realizados em outras regiões

Em França, onde a 'Rainha Claudia Verde' representa uma importante parte da produção de ameixas, tem sido o local onde o problema da sua auto-esterilidade tem vindo a ser mais estudado. A polinizadora em geral mais utilizada é a cultivar 'Rainha Claudia d'Althan'. No entanto segundo RENAUD (1978), podem também servir como polinizadoras as cultivares 'R. C. de Bavay', 'R. C. d'Oullins', 'Anna Spath', 'Coes Golden Drop' e alguns tipos de Quetches. BEJON (1986) indica ainda como cultivares potencialmente polinizadoras no Sudoeste da França, devido à boa concordância de floração com a 'Rainha Claudia Verde', as cultivares 'Mirabelle de Nancy','Royale de Montauban' e 'Precoce Léon Hisse'.

Em ensaios realizados em Espanha na região de Saragoza por CAMBRA (1950), tanto a cultivar 'Claudia de Tolosa', como a 'Cascabel' mostraram ser boas polinizadoras, proporcionando 21.85% e 28.75% respectivamente de frutificação final, em ensaios com polinização artificial suplementar, sem isolamento dos ramos.

MADEIRA LOBO (1977) refere como possiveis polinizadoras 'Victoria', 'Jefferson' e 'Quetsche de Itália'.

Tão diversificada informação justifica o que referimos atrás, sobre a importância decisiva das condições climáticas de cada região na eficiência de uma variedade como

polinizadora. Nesta matéria a informação bibliográfica deve apenas servir como indicadora das possibilidades potenciais, não dispensando nunca a realização de estudos regionais.

4 — MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material vegetal

4.1.1 - Caracterização do pomar de 'Rainha Claudia Verde' na região

Das cerca de 50000 árvores cadastradas em 1986 nos concelhos de Elvas, Estremoz, Borba e Vila Viçosa, apenas cerca de um quinto correspondem a pomares continuos, estando as restantes dispersas, bordejando estradas e ribeiros, ou então amontoadas em pequenas hortas.

A propagação de todo o material actualmente existente, vem sendo feita exclusivamente pelo aproveitamento das pôlas arrancadas às árvores adultas, em geral sem qualquer cuidado de selecção. Na verdade quando procedem ao arranque deste material, os agricultores não se limitam aos ladrões próximo do tronco, acabando por recolher também os mais afastados. Este processo explica o facto de algumas vezes transplantarem não sómente as pôlas, mas também plantas provenientes de semente, aumentando assim a variabilidade genética da população. A prová-lo está a abundância em certos pomares, de muitas jovens plantas cheias de espinhos e com um grande período de juvenilidade.

Apesar dos espinhos sobre os ramos constituir uma das caracteristicas morfológicas da 'Rainha Claudia Verde', a sua abundância nos clones utilizados em cultura é em geral reduzida. Pelas observações efectuadas, pensamos assim que grande parte daquelas plantas com muitos espinhos, terão sido originadas pelo cruzamento natural entre a 'Rainha Claudia' e os abrunheiros expontâneos existentes na região.

A implantação dos novos pomares é feita em geral abrindo uma simples cova onde é colocada a planta, não havendo qualquer preparação do terreno nem fertilização. A situação mais frequente é mesmo a retancha continua, ou seja; o agricultor renova o seu pomar instalando todos os anos novas plantas no lugar onde morreram outras. Por conseguinte a heterogeneidade do material é enorme.

No que diz respeito à condução da copa, podemos concluir que ela pura e simplesmente não existe. Na verdade é norma o agricultor não podar as suas árvores, nem sequer mesmo à transplantação. Como consequência a forma da copa traduz bem as caracteristicas de vegetação da variedade, que é a de um vaso aberto com pernadas cada vez mais pendentes à medida que a idade avança. Nos anos de grande produção, algumas das pernadas mais velhas podem partir-se com o peso dos frutos; então o agricultor aproveita para fazer uma limpeza drástica, cortando muitas dessas pernadas pela base e deixando alguns ramos ladrões do tronco para refazer a copa.

A consequência mais evidente da forma como é feita a condução do pomar de 'Rainha Claudia Verde' nesta região, é o reduzido período de vida económica das árvores, ainda que a sua longevidade seja grande. De facto a entrada em produção é muito tardia, 6º a 7º ano em geral e devido à ausência de poda o envelhecimento é prematuro.

Através de um inquérito feito aos produtores de toda a região, podemos concluir que não está suficientemente divulgada a informação de que esta variedade é auto-estéril, necessitando portanto de ser consociada com outras variedades para produzir. Desta forma, são muito poucos os agricultores que têm a preocupação de instalar variedades polinizadoras nos pomares e mesmo estes fazem-no com variedades pouco eficientes, como veremos adiante.

A explicação para a forma como esta fruteira é cultivada no Alto Alentejo baseia-se em dois factos: por um lado a inexistência de divulgação dos conhecimentos técnicos minimos indispensáveis ao cultivo desta variedade. Nunca nesta região houve qualquer iniciativa no sentido de ajudar os agricultores a tirarem melhor partido desta produção. Assim, estes não se sentem motivados a fazer o minimo investimento na cultura, limitando-se a recolher os frutos nos anos de produção. Por outro lado, o estrangulamento ao nível da comercialização; tratando-se de uma variedade de safra e contra-safra muito marcadas, é díficil conseguir um mercado certo e mantê-lo ao longo dos anos.

4.1.2 - Prospecção dos clones de 'Rainha Claudia Verde' e identificação de outras variedades

De 1986 a 1989 efectuou-se a prospecção em toda a região de cultura correspondente aos quatro concelhos já referidos, com o objectivo de seleccionar não só os clones culturalmente mais interessantes, mas também todos aqueles que poderiam fornecer variabilidade importante para um futuro programa de melhoramento.

Do ponto de vista cultural os critérios de selecção foram: intensidade da alternância de produção, produtividade, calibre do fruto, época de floração, época de maturação, resistência à moniliose, vigor, tipo de ramificação e porte da árvore. Além das observações efectuadas durante os quatro anos do estudo, foram ainda consideradas as informações dos agricultores, nomeadamente no que respeita à alternância de produção e resistência à moniliose, para cuja correcta avaliação é necessário um período de observação mais longo.

Um conjunto de sete clones, conforme se indica no quadro 4.1, passou para a fase de selecção clonal, onde serão comparados com outros clones de 'Rainha Claudia Verde' selecçionados em outras regiões de produção da Europa.

Clones de 'R. C. Verde' com aptidão cultural	Clones para conservação de germoplasma
P UE 4, P UE 7,	P UE 1, P UE 2, P UE 3,
P UE 8, P UE 10,	P UE 6, P UE 9, P UE 13,
P UE 11, P UE 12,	P UE 29, P UE 31, P UE 46,
P UE 45	P UE 53, P UE 54

Quadro 4.1 -Clones selecçionados durante a prospecção. (P UE - Prospecção Universidade de Évora)

Paralelamente identificaram-se ainda mais dez clones morfológicamente diferentes da 'Rainha Claudia Verde', correspondentes a outras Rainhas Claudias introduzidas na região, polinizadoras regionais designadas de 'Beijinhos' e alguns hibridos naturais entre a 'Rainha Claudia Verde' e variedades indígenas.

4.1.3 - Caracterização morfológica

Embora o objectivo principal deste trabalho, não seja a caracterização morfológica do material prospectado, mas sim o estudo da sua biologia floral, pensamos que pelo facto de se tratar de material pela primeira vez estudado, convirá fazer uma caracterização morfológica do mesmo, ainda que breve.

A caracterização morfológica de qualquer material vegetal, envolvendo métodos mais ou menos descritivos, é sempre um trabalho díficil, não só pela quantidade de caracteres a observar, mas sobretudo pela natureza subjectiva da sua avaliação. A existência de variedades padrão, que possam servir de referência ao observador, pode no entanto ajudar bastante.

Não será demais lembrar no entanto, que a caracterização correcta das variedades e cultivares, que possibilite uma denominação correcta das mesmas, sem problemas de sinonimia e mononimia, é a base de qualquer trabalho de selecção.

No caso presente, a caracterização morfológica justifica-se ainda, pela contribuição que pode dar ao esclarecimento da sistemática no grupo das ameixeiras. A população em causa é um caso típico de mistura de Prunus doméstica com Prunus insititia, onde a distinção entre as duas espécies é práticamente impossivel de estabelecer, mesmo morfológicamente.

Particular atenção deve merecer a escolha dos elementos morfológicos para caracterização. CAILLAVET (1955), autor da mais exaustiva obra de caracterização de variedades de

ameixeira, elaborou uma ficha de caracterização com cerca de 200 caracteres, muitos deles avaliados quantitativamente, através dos quais descreveu cerca de cem variedades. Nesta altura, este trabalho possibilitou o esclarecimento sobre a identificação de muitas variedades, permitindo reagrupar clones perfeitamente sinónimos, que possuiam nomes diferentes (BERNHARD, 1973). Para um trabalho de tão grande detalhe, aquele autor pôde contar porém com uma colecção instalada em condições de meio perfeitamente homogéneas, no tocante a clima, solo, porta-enxerto, etc., que permitiram estudar pequenas diferenças na expressão de certos caracteres.

A UPOV (1977), prevê uma ficha de 108 caracteres morfológicos, indicando variedades padrão para cada nivel de expressão, que embora mais simplificada que a utilizada por CAILLAVET, nos parece ainda demasiado detalhada para o nosso caso.

Considerando o caso particular deste trabalho, em que o material se encontra instalado em condições culturais muito diversas, optámos por elaborar uma ficha própria, apresentada no anexo 1, com 60 caracteres apenas, selecçionados a partir das duas já citadas e que nos parecem suficientes para a caracterização dos clones prospectados. Procurámos de acordo com DERMINE e LIARD (1953), eleger caracteres relativamente estáveis que não variassem nem com as condições de meio, nem com o ano de observação.

A caracterização dos clones iniciou-se em 1986 e prolongou-se até 1989. Para todos eles houve pelo menos 3 anos de observações, excluindo-se os caracteres que mostravam grande variação de ano para ano. Finalmente procedeu-se a uma análise em componentes principais, com o objectivo de verificar quais são os caracteres com mais interesse para a identificação clonal da variedade 'Rainha Claudia Verde', bem como de estabelecer o agrupamento de clones semelhantes.

4.1.4 - Caracterização fisiológica

Em relação à caracterização fisiológica dos clones prospeccionados, sem duvida de grande interessse para o conhecimento do seu valor cultural, não se pôde ser muito

exaustivo devido às diferentes condições culturais em que cada clone se encontra instalado.

Mesmo assim, refere-se o comportamento de todos os clones estudados em relação a nove caracteristicas; -época de floração; -época de maturação; -vigor; -porte, -produtividade; -sensibilidade à monilia; alternância de produção; -tipo de ramificação da copa; -tipo de fecundação.

Os resultados respeitantes à época de floração por constituirem matéria de abordagem especifica deste trabalho, não aparecerão na ficha de caracterização fisiológica.

4.2 - Caracterização climática da região

4.2.1 - Horas de frio

A dormência dos gomos é uma caracteristica fisiológica bem conhecida nas fruteiras de zonas temperadas, responsável pela interrupção do seu ciclo de crescimento. Nas regiões de clima temperado, a interrupção do estado de dormência acontece na natureza como resultado das temperaturas baixas durante o Inverno, sendo a quantidade de frio necessária para tal, muito diferente segundo as espécies e as variedades (TABUENCA, 1967).

As necessidades de frio de cada variedade, expressas em geral pelo somatório de horas em que a temperatura se mantêm abaixo de 7,2º C, é uma característica das mais importantes a ter em conta na cultura de fruteiras. De facto, o período de dormência é algo mais que o simples responsável pelo crescimento ritmico das plantas. Ele corresponde segundo CHAMPAGNAT (1987), à ultima etapa de uma série de inibições correlativas ao nivel dos gomos, fazendo parte do próprio ciclo vegetativo. A cultura de uma variedade numa região de clima diferente daquela para a que o seu ciclo vegetativo se encontra adaptado, pode implicar alterações importantes ao nível dos mecanismos fisiológicos da planta.

São bastante conhecidos os casos de fruteiras com necessidades de frio elevadas, que quando cultivadas em regiões meridionais de Inverno suave, apresentam diversas irregulari-

dades de comportamento: abrolhamento tardio e irregular, queda de gomos florais, floração prolongada, fraco vingamento de frutos, etc.

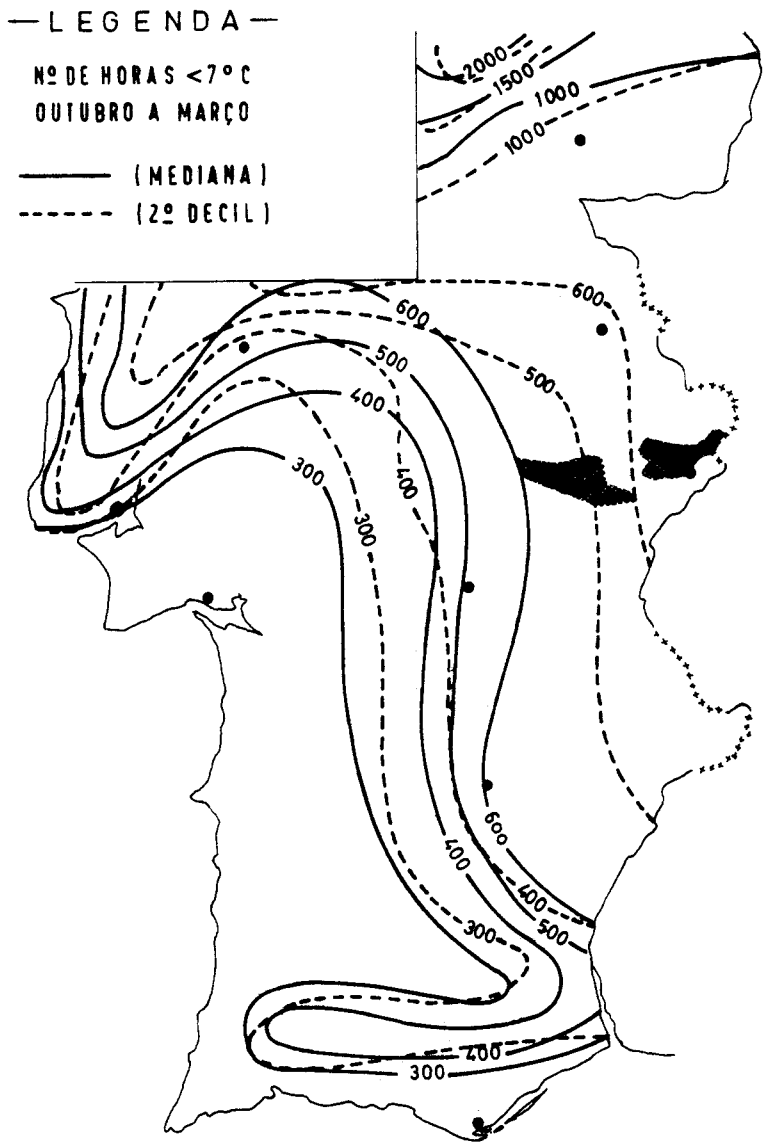


Fig.4.1 -Isopletas da mediana e 2º decil referentes ao somatório de horas de frio entre 1 de Outubro e 30 de Março, durante o periodo 1941-69. Segundo MENDES (1983).

Em geral as variedades de ameixeira europeias caracterizam-se por uma necessidade de frio invernal mais elevada que as variedades do grupo Japonês (TABUENCA, 1983). Há no entanto grandes diferenças entre as diversas variedades de *P. doméstica*, que podem situar-se entre 600 e 1200 horas abaixo de 7,2º C.

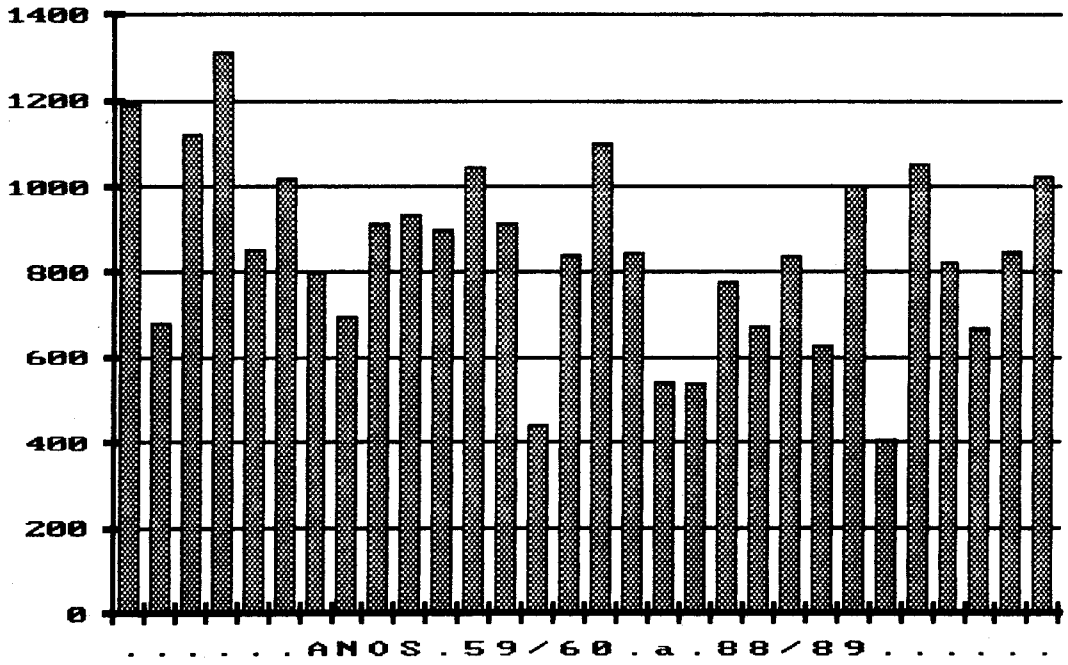


Fig.4.2 -Numero de horas com temperatura abaixo de 7.2°C calculadas de 1 de Outubro a 30 de Fevereiro.(a partir de registos obtidos na estação meteorológica de Elvas- ENMP). Anos 59/60 a 88/89.

De acordo com TABUENCA (1980), o grupo das "Rainhas Claudias" está entre as mais exigentes em frio. Em observações efectuadas na região de Zaragoza, este autor registou para a 'Rainha Claudia Verde' necessidades médias entre 1000 e 1250 horas de frio.

Por se tratar de uma variedade muito exigente em frio, tentámos reunir os registos referentes àquele elemento na região do Alto Alentejo, com o objectivo de, por um lado encontrar uma razão para a localização da sua cultura naquela região e por outro, caracterizar os anos da realização dos estudos da biologia floral (Fig. 4.1, 4.2 e 4.3).

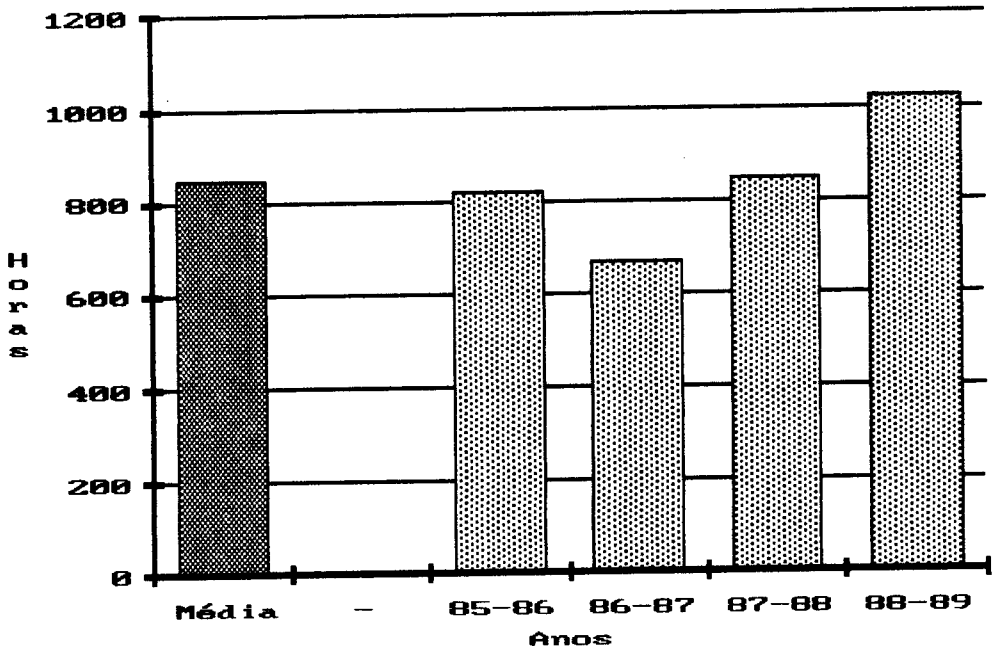


Fig.4.3 -Comparação do numero de horas com temperatura abaixo de 7,2° C na estação de Elvas (1 de Out.-30 Fev.). Média dos ultimos 30 anos e os da realização dos estudos.

Não se dispondo do registo contínuo da temperatura do ar na estação de Elvas, como de resto na maioria das estações meteorológicas, todos os valores de horas de frio apresentados do país, foram calculados com base na expressão usada por CROSSA RAYNAUD citado em MENDES (1983):

$$n = (7,2-Tmin \ / \ Tmax-Tmin) \times 24$$

onde n é a estimativa diária do numero de horas com temperatura do ar inferior a 7,2° C; Tmin e Tmax são respectivamente a temperatura mínima e máxima do ar no dia considerado.

De acordo com MENDES (1983) que testou este método de cálculo para três locais; Lisboa, Porto e Faro; o mesmo tem rigor suficiente, não apresentando um erro geralmente superior a 10% em relação ao valor real observado. Ainda segundo o autor referido, a fórmula empirica subestima os valores calculados excepto quando o numero de horas total é inferior a 130.

4.2.2 - Temperatura do ar

Se por um lado as temperaturas baixas são indispensáveis para quebrar a dormência dos gomos, por outro há necessidade de temperaturas acima do zero de vegetação, para facilitar o abrolhamento e iniciar-se um novo ciclo vegetativo. Esta segunda condição é tão importante como a primeira. De facto mesmo depois de terminado o período de dormência, os gomos só saiem do repouso a partir do momento em que as temperaturas médias sobem acima do zero de vegetação para determinada espécie.

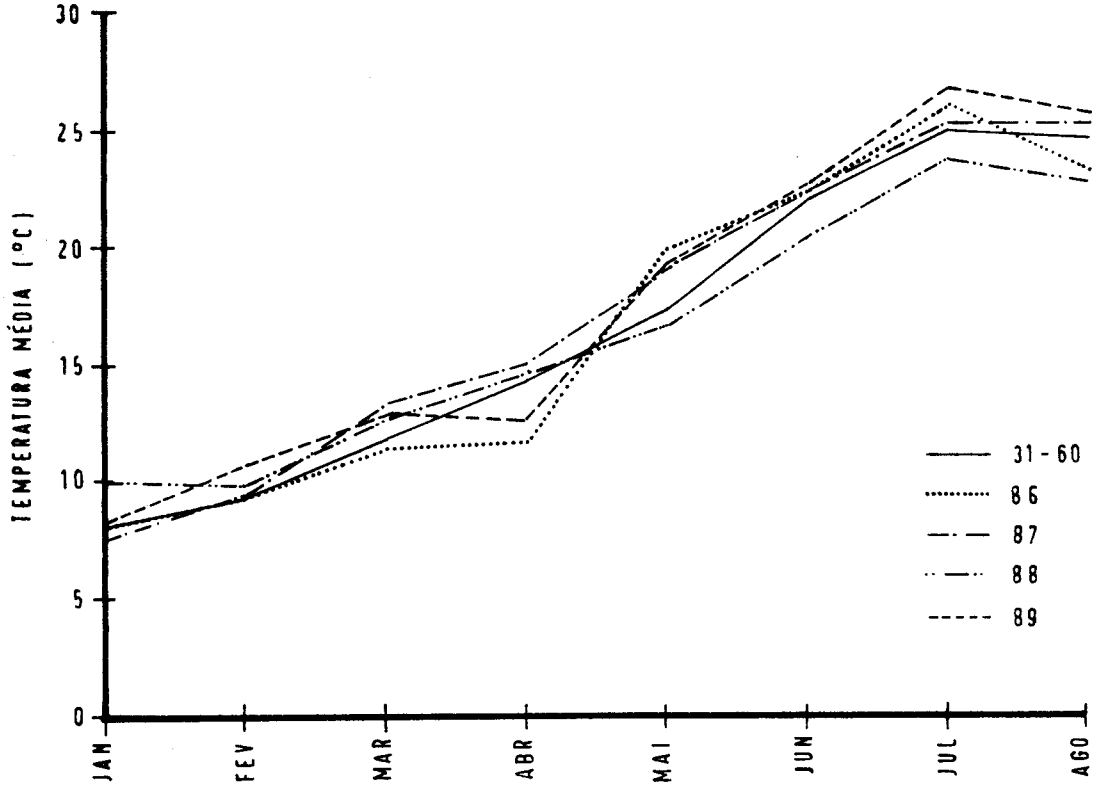


Fig 4.4 -Comparação da temperatura média do ar nos anos em estudo com a média 1931-60. Registos da Estação Meteorológica de Elvas.

Para TABUENCA (1980) o início da floração na ameixeira, primeira manifestação fenológica do abrolhamento, está para além da quebra de dormência, ainda relacionada com as

Estes foram efectuados desde alguns dias antes da floração, até três semanas depois, com a ajuda de termo- higrógrafos instalados em abrigos, colocados ao nível das copas das árvores, 1.5 m de altura do solo (Figs. 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10).

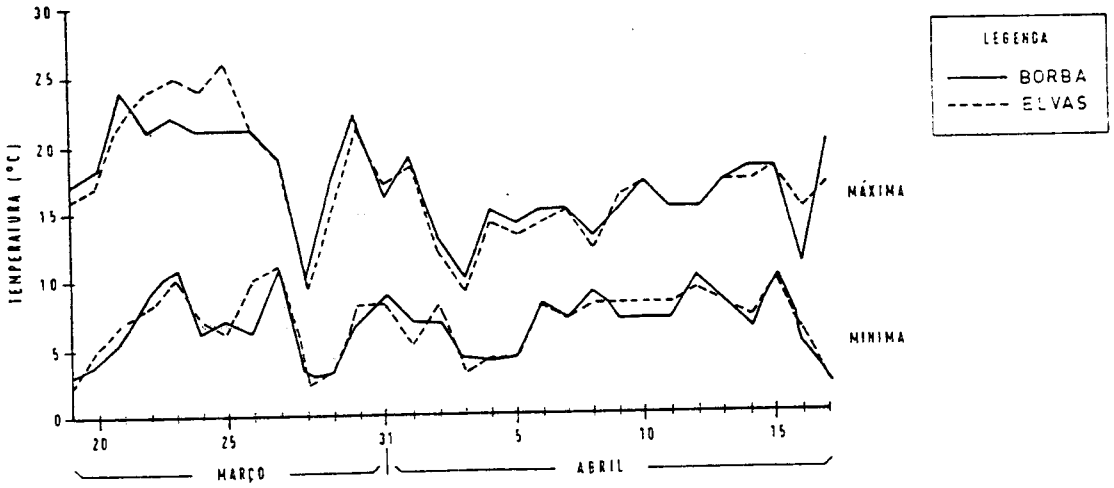


Fig. 4.7 -Temperaturas máximas e minimas diárias registadas ao nível dos pomares, no ano 1988 em Borba e Elvas, a partir do início da floração

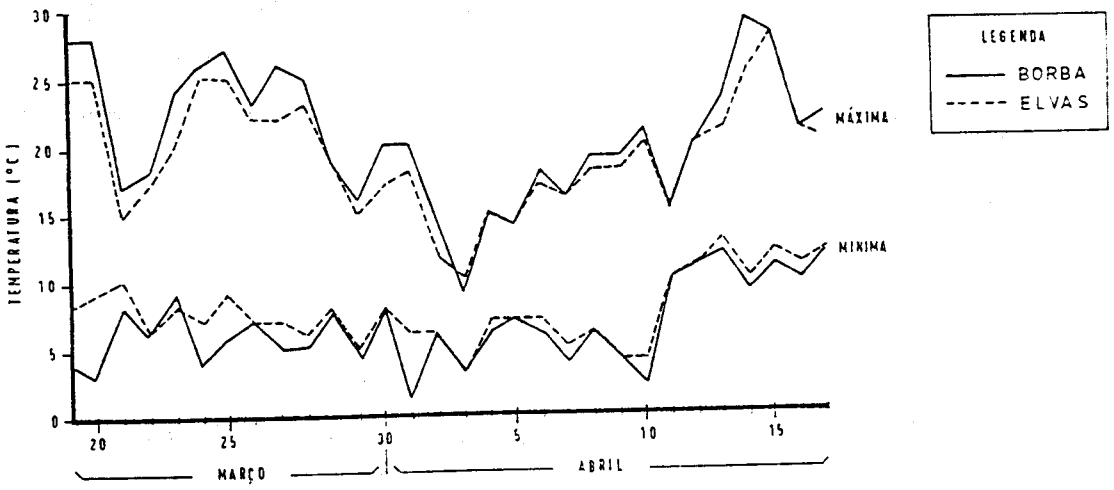


Fig. 4.8 -Temperaturas máximas e minimas diárias registadas ao nível dos pomares, no ano de 1989 em Borba e Elvas a partir do início da floração.

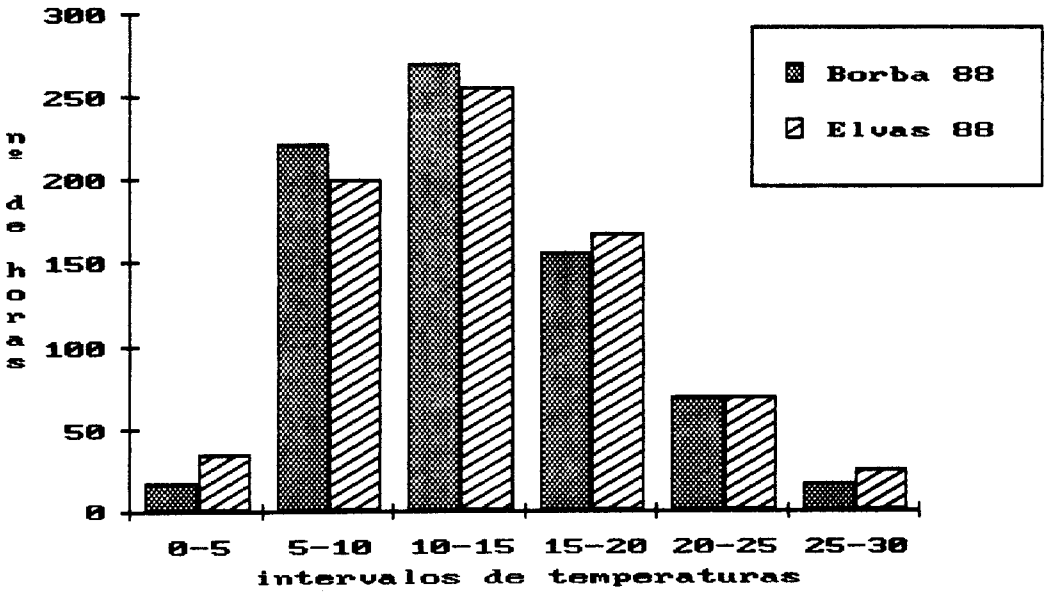


Fig. 4.9 -Numero de horas com temperatura entre intervalos sucessivos, registados de 19 de Março a 19 de Abril de 1988.

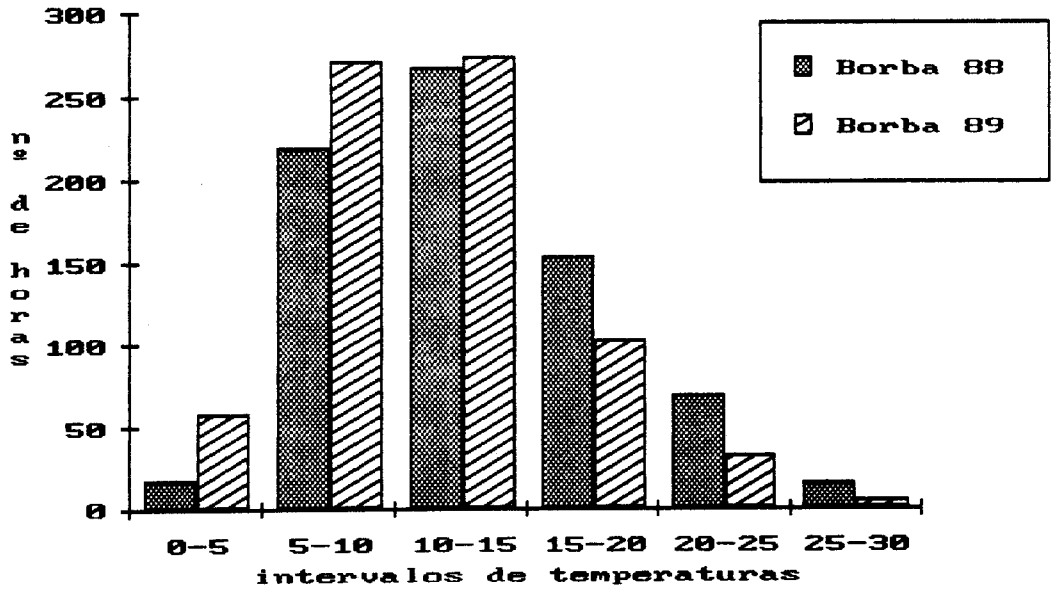


Fig.4.10 -Numero de horas com temperatura entre intervalos sucessivos, registados em Borba. 19 de Março a 19 de Abril de 1988 e 1989.

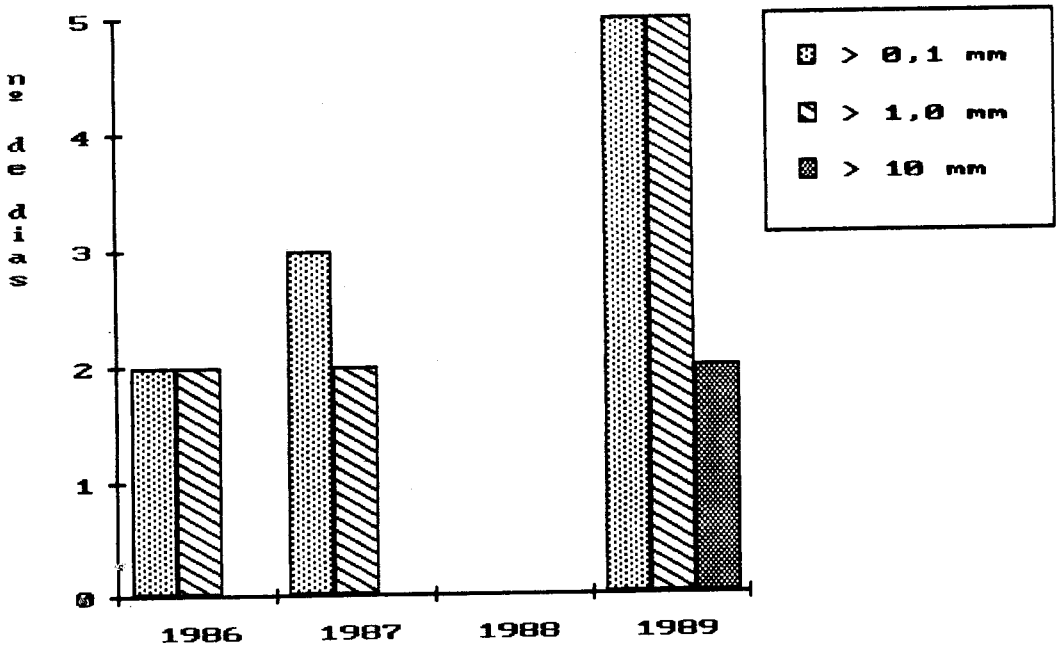


Fig. 4.11 -Numero de dias com chuva durante o período de floração. (Elvas-ENMP)

4.2.3 - Precipitação durante a floração

Por constituir um factor de grande importância ao nível do processo de polinização, resumimos no gráfico da fig. 4.11, os elementos referentes à intensidade e duração da precipitação, durante o período de floração para os vários anos.

O ano de 1988 foi com efeito, o unico em que não se observou queda de chuva durante o período de antese, no entanto tanto em 1986 como em 1987 os dias que apresentaram este meteoro situaram-se já no fim daquele período, não influenciando significativamente a eficiência da poliniza ção. Em 1989 a chuva caida pode considerar-se de facto um elemento importante, pois além de se ter prolongado por bastante tempo, coincidiu com o inicio da floração da maioria dos clones de 'R. Claudia Verde', afectando negativamente não apenas o transporte do pólen pelos insectos, mas também a própria deiscência das anteras.

Como se pode observar pelo quadro 4.2, os 4 anos em que se realizaram os estudos foram anormalmente secos durante o mês de Março, o que foi favorável ao processo de floração e polinização dos pomares.

A precipitação caída durante o crescimento dos frutos, ou seja de Abril a Julho, foi superior à média em 1988 e 1989, sendo excepcionalmente elevada no ano de 1988. A elevada precipitação ocorrida neste ultimo ano, sobretudo nos meses de Junho e Julho, contribuiu de forma significativa para o engrossamento dos frutos, bem como para o desenvolvimento geral de toda a árvore, considerando que a maioria dos pomares são de sequeiro.

anos	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	*
31-60	83.8	63.0	99.2	55.0	39.1	20.1	3.2	6.0	117.4
1986	43.7	106.9	21.7	41.8	12.3	0.4	0.0	0.0	54.5
1987	105.3	67.7	10.0	95.9	2.7	3.5	16.3	0.0	118.4
1988	101.2	23.6	13.8	32.5	58.5	82.3	24.8	0.0	198.1
1989	43.1	25.2	26.8	69.6	97.7	2.1	0.0	0.0	169.4

* - Acumulada de 1 de Abril a 30 de Junho

Quadro 4.2 -Precipitação média ocorrida durante os meses mais importantes no ciclo vegetativo da ameixeira. (Elvas -ENMP).

4.3 - Estudos efectuadas no campo

4.3.1 - Autofecundações sobre ramos isolados

Para realizar as autofecundações nos diversos clones, escolheram-se quatro ou cinco ramos no inicio da floração, onde se procedeu à contagem de 400 flores no estado de botão branco, estado D1/D2. Todas as flores em estado mais avançado ou mais atrasado foram eliminadas. Em seguida os ramos foram

isolados com uma manga de papel cristal ceroso e devidamente identificados. Paralelamente marcaram-se outras 400 flores no mesmo estado, que foram deixadas à livre polinização e que serviram de testemunha.

Dois dias mais tarde, período considerado óptimo para uma boa receptividade dos estigmas, as mangas foram abertas e procedeu-se à polinização com a ajuda de um pincel. De notar que aqui não foi feita a castração das flores, nem utilizado outro pólen além do proveniente das prórias flores, destinando-se aquela operação apenas a assegurar uma boa distribuição do mesmo. Em seguida as mangas foram de novo colocadas, tendo sido definitivamente retiradas apenas depois do período de vingamento, estado H de Bagiollini.

local:	Borba	Borba	Elvas	Elvas	Évora
poliniza.	-	-	-	P UE 6	Stanley
variabilid.	acentuada	pequena	pequena	pequena	nula
idade R. C.	> 20	12 - 15	12	> 15	6
Condução	s/poda	s/poda	em vaso	s/poda	s/poda
irrigação	suplem.	sequeiro	plena	suplem.	sequeiro
compasso	4 x 4	7 x 7	4 x 4	7 x 7	4 x 6
alt. fisio.	reduzida	nula	nula	media	acentuada

Quadro 4.3 - Situação dos pomares em que se registou a taxa de vingamento em 1986 e 1987.

4.3.2 - Avaliação do índice de vingamento de alguns pomares tradicionais

Procurando obter explicação para a grande irregularidade de produção dos vários pomares, efectuou-se durante os quatro anos de estudo, através de amostragem, uma observação sobre o índice de frutificação final de alguns pomares considerados caracteristicos da região. Os pomares escolhidos

tiveram em atenção a presença ou não de polinizadoras regionais, bem como a aparente variabilidade clonal das árvores de 'R. Claudia Verde' (Quadro 4.3).

O índice de frutificação em cada situação foi obtido pela média de 3 a 4 ramos num total de cerca de 400 flores, escolhidos ao acaso de uma árvore caracteristica do pomar. Na altura da contagem eliminaram-se cerca de 10 a 15 % de botões florais, correspondentes aos botões mais atrasados e às flores já abertas.

Paralelamente de todos os pomares observados colheram-se alguns pistilos ao fim de oito dias da plena floração com o objectivo de observar o crescimento do tubo polinico em fluorescência.

4.3.3 - Ensaio de eficácia de polinizadora de algumas variedades

4.3.3.1 - Selecção das variedades utilizadas

A concordância da fase de floração com a variedade a polinizar, é sem duvida o factor mais importante para selecçionar as variedades potenciais polinizadoras. Porém, esta importante informação só é possivel de obter, através de observações efectuadas na própria região. Considerar válida a este respeito, a informação obtida em outras regiões com condições climáticas diferentes, é bastantes vezes só por si, o responsável pelo insucesso na utilização de variedades polinizadoras.

Baseados na informação sobre a época de floração de algumas variedades de ameixeiras Europeias na região e das polinizadoras regionais, escolhemos para este ensaio quatro variedades polinizadoras: duas variedades com aptidão cultural comprovada -'Stanley' e 'Prune d'Ente'; e dois tipos de polinizadoras regionais: 'P UE 6' e 'P UE 13'.

A concordância das épocas de floração foi no entanto um dos factores também estudados durante os quatro anos de ensaio, de modo a contribuir para a futura escolha das melhores polinizadoras. Além das quatro variedades referidas

registaram-se ainda os periodos de floração da 'Rainha Claudia d'Althan', assim como de outras polinizadoras regionais prospecçionadas.

4.3.3.2 - Implantação e condução do ensaio

O ensaio foi realizado em dois locais diferentes - Borba e Elvas e repetido durante quatro anos: 1986 a 1989. Em cada local foi escolhido um pomar característico, onde foi possivel eleger quatro árvores de vigor idêntico e floração concordante.

Sendo a variedade 'R. Claudia Verde' muito alternante e sabendo-se a importância desse fenómeno ao nível de todo o processo de vingamento e crescimento do fruto, houve necessidade de escolher os pomares e as árvores de modo a haver sincronia da safra e contra-safra em Borba e em Elvas. Só assim será possivel analisar posteriormente o factor local.

Ambos os pomares eram regados, e tratados contra as principais pragas da ameixeira, nomeadamente afideos e ácaros. Em relação à moniliose que pode originar graves danos durante a floração e vingamento desta espécie em anos chuvosos, não foi necessário tratar em virtude da 'R. Claudia Verde' ser resistente à doença. A pouca ou nula precipitação ocorrida durante a floração, também ajudou. Apenas em 1989 se registou bastante precipitação, mas mesmo assim não se observaram quaisquer sintomas da doença sobre os ramos.

Algumas condições culturais e a idade das árvores eram no entanto diferentes nos dois pomares. Em Borba tratava-se de um velho pomar com àrvores de mais de 20 anos em média, sem qualquer tipo de poda, sendo a técnica cultural utilizada bastante deficiente, quer ao nivel do control de infestantes, quer de fertilização. A própria rega limitava-se à altura da pré-maturação, sendo posteriormente esquecida. Em Elvas pelo contrário, escolheu-se um pomar novo, com 10 anos de idade, convenientemente instalado num solo fértil e onde toda a técnica cultural utilizada se aproximava bastante da preconizada na moderna fruticultura. Neste pomar, apesar das suas boas condições de cultivo e de as àrvores apresentaram

uma abundante floração todos os anos, é em geral quase nula a sua produção.

Num outro aspecto diferiam ainda os dois pomares: em Borba tratava-se de um pomar onde foram posteriormente identificados vários clones de 'Rainha Claudia Verde' e dois tipos de polinizadoras regionais, o 'P UE 1' e o 'P UE 13'. Em Elvas o material era sensivelmente homogéneo e não existia qualquer variedade polinizadora. Este facto revelou-se importante como veremos adiante, pois a disponibilidade de pólen compativel em Borba, era muito superior à de Elvas, em resultado da promiscuidade do pomar, assegurando um índice de vingamento superior na polinização livre da 'R. Claudia Verde'.

No estado de botão branco, concretamente estado D1 de Bagiolini (Fig.4.13), foram isolados e marcados em cada árvore 10 a 12 ramos de modo a perfazerem um total de 1000 flores naquele estado, utilizando-se mangas de papel cristal ceroso (Fig.4.14). As flores mais adiantadas ou mais atrasadas eram retiradas, assim como alguns gomos ainda por abrir. A escolha das flores no mesmo estado fenológico é da máxima importância, sobretudo nos anos de temperaturas altas durante a floração, para que na altura da polinização todos os estigmas estejam plenamente receptivos e concordantes no que diz respeito à viabilidade dos óvulos. JEFFERIES (1975) refere para algumas variedades cultivadas em Inglaterra, que apenas cerca de 50% das flores registam uma simultâneidade na antese. No nosso caso essa percentagem é superior, conseguindo em geral contar-se cerca de 70 a 80 % de flores no mesmo estado fenológico. Nos anos em que a temperatura sobe muito rápidamente antes do abrolhamento como foi o caso de 1988 essa percentagem pode ir até 90 %.

Embora no primeiro ano do ensaio não se pudesse ter a certeza da auto-esterilidade dos clones de R. Claudia utilizados, não se castraram as flores por duas razões principais: em primeiro lugar porque a castração implicava ter de trabalhar com menos flores, devido ao tempo gasto na operação e o tempo foi sem duvida o factor mais limitante neste estudo. Por outro porque o objectivo final do ensaio era o de estudar a eficiência das várias variedades, como potenciais polinizadoras da R. Claudia e a existir alguma influência do

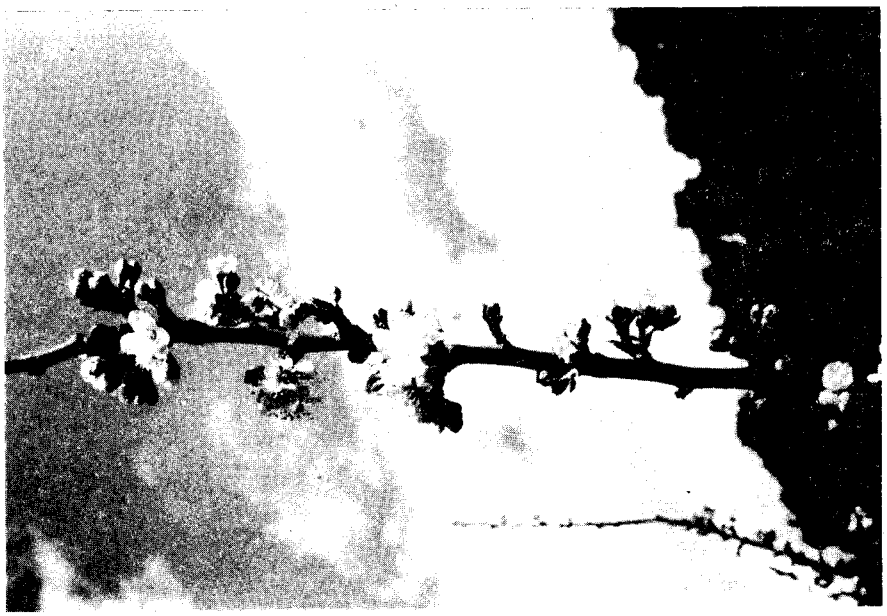


Fig. 4.13 -Ramo na fase de botão branco (estado D de Baggiolini).

Fig. 4.14 -Exemplo de ramo isolado com a manga de papel, para posterior polinização.

próprio pólen nos resultados, ela deverá ser mesmo incluida para os mesmos terem utilidade ao nível do agricultor. Podiam ainda referir-se a favor desta opção, as observações de alguns autores sobre o efeito negativo da castração no vingamento das flores (LUCKA, 1959).

Antes de se proceder à polinização, a receptividade dos estigmas foi comprovada através da observação da exçudação dos mesmos. Em 1986 e 1989 procedeu-se à polinização dos ramos cerca de 48 horas depois de isolados. Nos anos de 1987 e 1988 antecipou-se a polinização para as 36 horas em virtude da temperatura mais elevada ter acelerado o início da receptividade dos estigmas. A operação efectuou-se, passando pelos estigmas com um pincel de pelo suave, préviamente embebido em pólen. Em seguida os ramos foram de novo isolados com as mangas.

Sendo todas as variedades polinizadoras utilizadas, de floração contemporânea da dos clones de 'Rainha Claudia Verde' em estudo, não foi necessário recorrer 'a conservação do pólen no frio. Houve apenas o cuidado de o recolher em locais onde devido à influência do microclima, se dispunha de árvores com a floração ligeiramente adiantada de um a dois dias.

Ainda no mesmo dia o pólen que sobejava das polinizações, era sujeito a um teste de germinação "in vitro", com a finalidade de comprovar a sua viabilidade, segundo a técnica descrita em 4.4.2.2.

O dispositivo experimental deste ensaio, que se apresenta no Quadro 4.4, foi do tipo factorial, correspondendo cada árvore a um bloco-repetição. Os trata mentos do factor polinização foram em numero de cinco, correspondentes às quatro polinizadoras mais uma unidade de polinização livre em que apenas se procedeu à contagem das flores.

Três semanas depois foram retiradas as mangas de papel, procedendo-se a uma primeira contagem dos pequenos frutos em vingamento. Com esta contagem, além de se quantificar a queda pós-floração pretendeu-se também avaliar

4 anos x 2 locais x 5 tratamentos x 4 repet. x 200 flores				
1986 1987 1988 1989	Borba Elvas	Stanley D'Ente P UE 6 P UE 13 Livre	4 árvores	em 4 ramos

Quadro 4.4 -Delineamento experimental do ensaio de eficácia de polinizadoras.

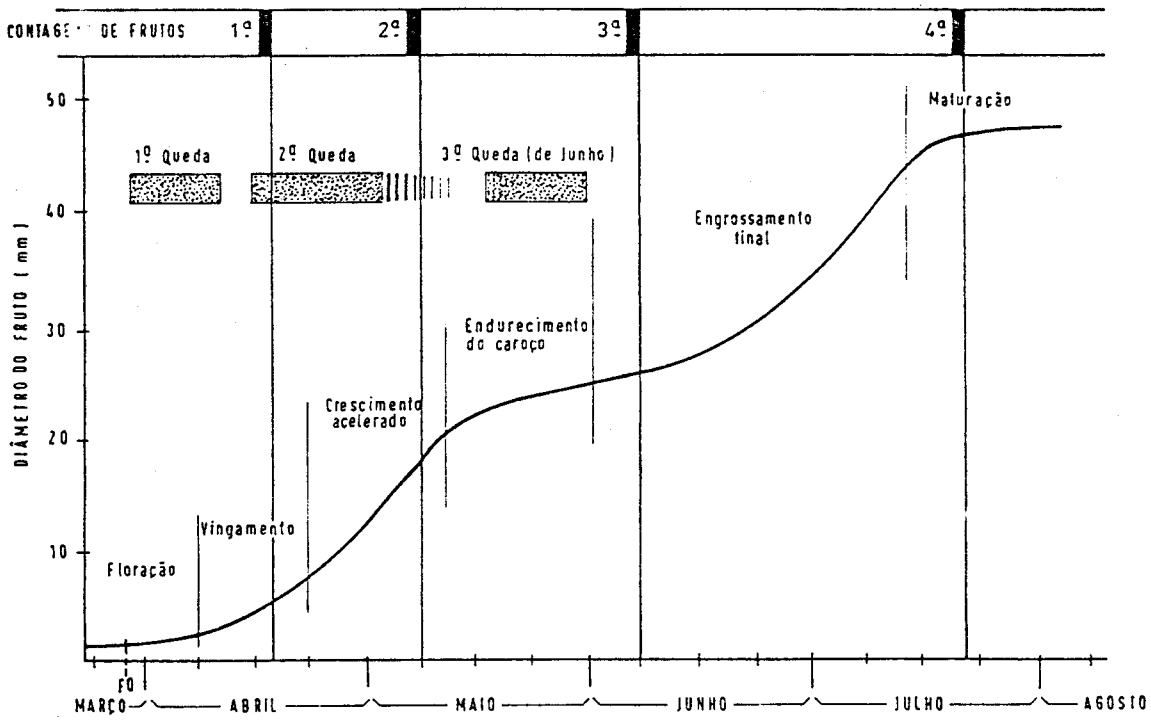


Fig.4.12 -Data das observações efectuadas, em relação ao desenvolvimento do fruto da 'R. C. Verde' na região e às quedas naturais referidas por DORSEY (1919).

a influência das mangas de papel na queda das flores; negativamente pelo maneio dos sacos, positivamente pelo abrigo proporcionado.

As restantes contagens efectuaram-se respectivamente 40 dias depois da floração, depois da queda de Junho e à colheita de acordo com o esquema apresentado na Fig. 4.12.

Como se pode observar na fig 4.12, as contagens dos frutos sobre os ramos do ensaio, foram efectuadas de modo a permitir a quantificação das principais quedas naturais de acordo com as observações de diversos autores, nomeadamente DORSEY (1919b), BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949b), JEFFERIES (1975). No entanto a separação entre a primeira e a segunda queda é impossivel de fazer. Por um lado devido à ocorrência por vezes simultânea de ambas; por outro devido à impossibilidade de retirar o saco mais cedo, ocorrendo a primeira contagem numa altura em que a segunda queda ou de vingamento já se iniciou.

Além das contagens de frutos elaborou-se a curva de crescimento dos mesmos, tendo-se medido uma vez por semana, o diâmetro de uma amostra de 12 frutos seleccionados ao acaso nas árvores em ensaio.

4.3.4 - Tratamento dos resultados

Os resultados referentes ao índice de vingamento de alguns pomares tradicionais, não mereceram qualquer tratamento estatistico, tendo-se apenas calculado as médias dos frutos presentes 40 dias depois da floração, expressando-as em percentagem do numero de flores inicial.

Relativamente ao ensaio de eficácia de polinizadoras, os resultados foram analizados em computador, utilizando o programa estatístico STATGRAPHICS versão 2.0, para o cálculo das médias e variâncias, bem como de algumas correlações entre variáveis. Para a comparação das médias nos factores e interacções com diferenças significativas, utilizou-se o teste Tukey de comparações multiplas, para o que se recorreu ao programa MSTAT versão 3.0 / EM.

4.4 - Estudos realizados no laboratório

4.4.1 - Instalação e condução dos ensaios

4.4.1.1 - Estudo da percentagem de germinação e comprimento do tubo polinico "in vitro"

Ainda que alguns dos autores consultados, REMY (1953) e (LEE (1980), refiram a dificuldade metodológica da germinação do pólen "in vitro" como teste da sua viabilidade efectiva, optámos pela sua realização por ser um método que possibilita o estudo do crescimento do tubo polinico, assim como a influência da temperatura independentemente do efeito do estilete. O objectivo é afinal comparar os resultados da germinação "in vitro" com os do crescimento "in vivo", tentando separar a influência devida aos tecidos do pistilo dos factores internos de qualidade do próprio pólen.

Segundo STANLEY e LINSKENS (1974) a qualidade do pólen expressa pela sua percentagem de germinação "in vitro", permanece sensivelmente igual durante o periodo de deiscência das anteras. Já o mesmo não se passa em relação às diferentes árvores de um pomar, entre as quais pode haver diferenças importantes, devido à influência que as condições ambientais e culturais têm na formação do pólen.

Em relação aos clones de 'R. Claudia Verde' as amostras de pólen foram recolhidas de uma só árvore, a planta-mãe do clone, unica forma de garantir a sua identidade genética. Para evitar incluir clones cuja situação cultural bastante deficiente, provocasse uma grande variação nos resultados optámos por testar apenas três clones de R. Claudia; P UE 10, P UE 11 e P UE 45; uma polinizadora regional: P UE 6 e a variedade 'Stanley'. O estudo foi realizado durante a floração de 1989.

Após a sementeira do pólen sobre a superficie do agar, as placas foram de imediato colocadas em câmaras de crescimento à temperatura desejada de acordo com o disposivo experimental indicado no quadro 4.5. O numero de placas utilizado em cada combinação variedade x temperatura foi em geral de três, o que permitiu realizar todas as contagens previstas, sem utilizar a mesma placa em mais que três obser-

vações. Com efeito durante o tempo de observação ao microscópio, a placa ficou sugeita à temperatura do laboratório, introduzindo assim um pequeno erro no ensaio.

Variedades x temperaturas x tempo de incubação x repetições			
Stanley P UE 6 P UE 10 P UE 11 P UE 45	5°C 10°C 15°C 20°C 25°C 30°C	2 horas 5 « 8 « 12 « 24 « 36 « 48 «	9 campos do microscópio

Quadro 4.5 -Dispositivo experimental e observações efectuadas no ensaio de germinação "in vitro".

A germinação "in vitro" foi ainda o método escolhido, para testar a viabilidade do pólen das várias polinizadoras utilizadas no ensaio de campo e de alguns clones de R. Claudia durante os 4 anos de estudos. Neste caso a incubação das placas realizou-se apenas à temperatura do laboratório (20 ±1°C), sendo no entanto toda a técnica igual à utilizada no estudo anterior.

4.4.1.2. - Influência da temperatura no crescimento do tubo polinico e Período de Polinização Efectivo (PPE).

O estudo referente a este assunto foi iniciado em 1988 com o clone P UE 11 e repetido em 1989 para o mesmo clone, ao qual se acrescentou o P UE 10 e a polinizadora regional P UE 6. Para a instalação deste ensaio, recolheram-se vários ramos de cada um dos clones no estado de botão branco, que permitiram efectuar o dispositivo experimental descrito no quadro 4.6.

1988						1989						
P UE 11						clones	P UE 10 P UE 11 P UE 6					
autopolinização x 'Stanley'						X polinização X	autopolinização x 'Stanley'					
	10°	15°	20°	25°	30°	temperatura	10°	15°	20°	25°	30°	
						X					x	12
19					x					x		19
								x	x	x	x	24
30			x	x	x	tempo após					x	36
48					x	polinização	x	x	x	x	x	48
60	x	x	x	x	x	(horas)			x	x	x	71
112	x	x	x	x				x	x	x		100
144	x	x	x	x			x	x	x			144
190	x	x					x	x				190
							x					250
							x					320
						X						
						repetições 6 pistilos						

Quadro 4.6 -Delineamento experimental e data da recolha e fixação do material, no ensaio de temperaturas realizado em 1988 e 1989.

A entrada no laboratório todos os ramos foram castrados, com a ajuda de uma pinça indicada na fig.4.15 e colocados dentro de frascos com água à temperatura do laboratório (20-21°C).

A castração das flores fez-se em pleno estado D - botão branco, sendo necessário forçar alguns ramos em estufa para conseguir uma concordância do estado fenológico. De acordo com LINSKENS (1963), apenas nos pistilos plenamente desenvolvidos se encontra instalada a barreira fisiológica

responsável pela incompatibilidade. Segundo aquele autor, a castração demasiado precoce dos pistilos, pode provocar disturbios ao nivel das relações metabólicas entre o androceu e o geniceu da flor, enfraquecendo ou até mesmo impedindo o estabelecimento da reacção da incompatibilidade.

Após 24 horas à temperatura do laboratório, os pistilos foram polinizados e colocados em câmaras de crescimento, com temperatura controlada a ± 0,5º C, humidade relativa de ± 50% e um fotoperiodo de 12 horas de luz, proporcionado por lâmpadas frias de luz branca fluorescente (com 100 W/m²).

A altura ideal da polinização foi defenida através da observação da superficie humida dos estigmas. Em geral esse sintoma, que corresponde como já vimos ao período de máxima receptividade do estigma, passa muito rápidamente quando a temperatura é elevada como acontece em laboratório, pelo que se torna necessário um constante acompanhamento dos ramos.

Cada um dos 30 ramos com aproximadamente 40 flores, foi colocado num frasco com água, sendo esta trocada todas as 24 horas, bem como cortado 0,5 cm da base do mesmo.

De cada combinação variedade-polinização-temperatura, fixaram-se 6-7 pistilos nos tempos previstos no Quadro 4.6.

4.4.1.3 - Observação da compatibilidade entre clones

Para estudar o grau de compatibilidade entre os diversos clones de 'Rainha Claudia Verde' prospectados (Quadro 4.7), procedeu-se à recolha de ramos no campo no estado de botão branco, sendo todo o trabalho de castração e polinização efectuado no laboratório idêntico ao já descrito anteriormente. O numero de ramos recolhido por clone, variou de 1988 para 1989, de modo a proporcionar todas as combinações possiveis.

Os ramos com cerca de 25 flores cada um, foram colocados dentro de frascos com água, procedendo-se à substituição da mesma e corte da base do ramo todas as 24 horas. Até à

fixação dos pistilos, os ramos permaneceram sempre à temperatura do laboratório, (20 ±1°C).

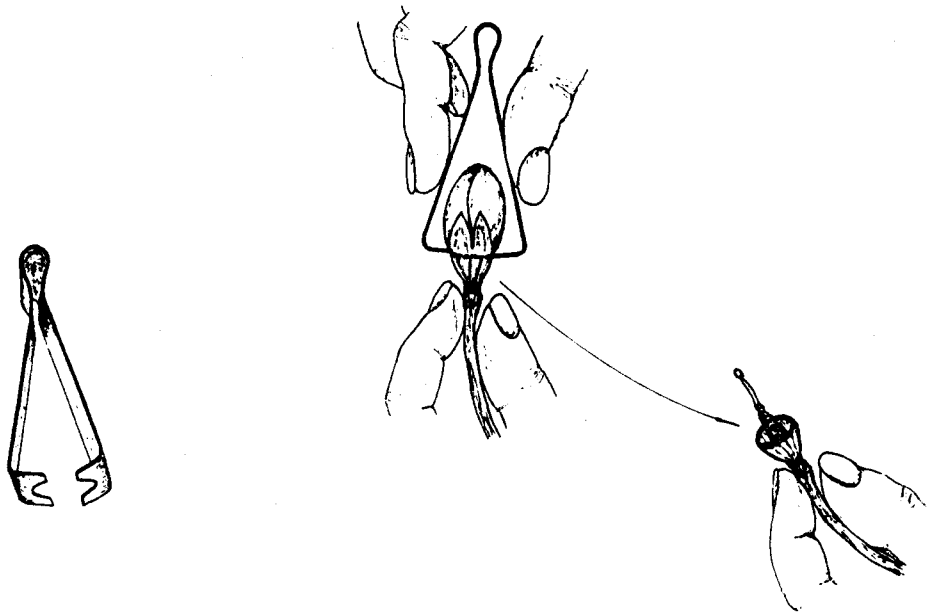


Fig 4.15 - Método de castração e pinça utilizada

anos	clones utilizados (P U E)													
1988		5	10	11	15	32	33	34			39			45
1989	4		10	11	15	32	33		36	37		43	44	45	54

Quadro 4.7 - Clones utilizados no estudo de inter--compatibilidade em 1988 e 1989.

Ao fim de um dia os estigmas encontravam-se perfeitamente receptivos. A polinização efectuada com a ajuda de um pincel por cada clone, realizou-se em salas separadas para evitar a possivel contaminação com pólen estranho.

O pólen de cada clone foi obtido a partir de anteras recolhidas no mesmo dia da recolha dos ramos, em flores já abertas de acordo com a técnica descrita em 4.2.2.2.

Decorridos quatro dias depois da polinização, procedeu-se à fixação dos pistilos de todos os ramos no fixador 'Faa', para posterior observação.

4.4.2 - Técnicas para o estudo da germinação do pólen e crescimento do tubo polínico "in vitro"

4.4.2.1 - Estudo do melhor meio e testagem de algumas condições de germinação

Com o objectivo de escolher o meio de cultura mais adaptado ao material em causa, ensaiaram-se três substratos de germinação: num tratamento A e de acordo KLUNGNESS, THORP e BRIGGS (1983) utilizou-se 10 % de sacarose e 2 % de agar, a que se juntou ainda 0.005% de ácido bórico. No tratamento B utilizou-se 20% de sacarose e 0,6% de agar-agar. Finalmente num meio C preparou-se com 10% de sacarose, 1% de agar-agar, 0,1% de extracto de levedura e 0,01% de ácido bórico de acordo com MASCARENHAS e MACHLIS (1964, referidos por COBIANCHI, FAEDI e BATTELLI, 1978).

A influência positiva do boro na percentagem de germinação do pólen é reconhecida por muitos autores, depois que SCHUMUCKER (1932, referido por STANLEY e LINSKENS, 1974) observou um elevado nível de boro no liquido da secreção estigmática.

A utilização do agar no meio de germinação oferece grandes vantagens para a germinação do pólen daí a sua utilização. Para além de fornecer a humidade necessária ao processo de hidratação do grão, bem como ainda alguns hidratos de carbono (KUBO, 1955, 1960, referido em STANLEY e LINSKENS, 1974) constitue um substracto de consistência ideal. Em todos os estudos efectuados utilizou-se sempre Difco Bacto-agar.

O uso do açúcar destina-se a proporcionar o potencial osmótico necessário, retardando ainda o desenvolvimento de

fungos. Assim a quantidade de açucar a utilizar variará de acordo com as espécies e variedades.

Outro factor referido como de máxima importância na expressão da viabilidade é como já foi referido, a concentração dos grãos no substracto de germinação. Ainda que segundo STANLEY e LINSKENS (1974), este efeito de estimulação mutua dos grãos de pólen, pareça ser menos importante quando se utiliza o agar como substracto, decidimos préviamente fazer um pequeno ensaio para estudar qual a melhor concentração. Utilizando sempre o meio de cultura A, testaram-se quatro densidades de sementeira: A.1 -até 30 grãos por mm^2; A.2 -30 a 70 grãos; A.3 - 70 a 120; A4 -120 a 200.

4.4.2.2 - Colheita das anteras e tratamento do pólen

Para obtenção do pólen a utilizar, quer nos estudos de germinação "in vitro" quer na polinização dos ensaios, foi recolhida uma boa quantidade de anteras ainda não deiscentes, mas de flores já abertas e colocadas à temperatura do laboratório dentro de excicadores com silica-gel, onde permaneceram cerca de 48 horas. Ao fim deste período, os sacos polinicos já tinham libertado a maior parte do pólen, que era assim recolhido para pequenos tubos de ensaio e colocado no frigorifico.

Em todas as utilizações não foi necessário conservar o pólen mais que três dias no frigorifico. Em geral quer nas polinizações, quer na germinação "in vitro" optou-se sempre por aplicar o pólen o mais rápido possivel, de modo a diminuir ao máximo a influência do factor conservação. Antes porém da sua utilização e porque à saida do excicador o pólen se apresenta demasiado seco, dificultando a sua germinação, deixou-se hidratar à temperatura do laboratório durante 30 minutos.

4.4.2.3 - Sementeira e germinação

Para a germinação do pólen utilizou-se um substracto sólido, constituido pelo meio (A) referido em 4.4.2.1, preparado com 10 % de sacarose, 2% de agar-agar e 0.005% de

ácido bórico, colocado em caixas de petri. Distribuiu-se o pólen sobre o meio com a ajuda de um crivo 0.25 mesh e um pincel, de modo a conseguir uma densidade média de 80 a 100 grãos por mm^2. Posteriormente as caixas de petri foram colocadas horizontalmente em câmaras de crescimento.

4.4.2.4 - Observação ao microscópio óptico

A observação efectuou-se ao microscópio óptico à ampliação de 10 x 6.3, colocando a lamela directamente sobre o agar na placa de petri, numa gota de água destilada. Em cada lamela escolheram-se três campos ao acaso, contando-se a percentagem de grãos germinados, bem como o comprimento médio do tubo polinico com a ajuda de uma ocular graduada. O resultado de cada observação foi obtido da média de 3 placas x 3 campos do microscópio.

Como a densidade do pólen não é uniforme procurou-se que os campos observados tivessem todos sensivelmente a mesma densidade de 80 a 100 grãos por mm2.

Na observação da percentagem de germinação, considerou-se germinado todo o grão de pólen que tinha emitido um tubo polinico, igual ou superior ao seu diâmetro.

As fotografias do pólen germinado foram efectuadas com a ajuda de uma câmara acoplada ao microscópio, utilizando uma pelicula Fuji de 100 ASA, com um tempo de exposição de aproximadamente 1/8 seg.

4.4.3 - Técnicas para o estudo do crescimento do tubo polinico e viabilidade dos óvulos "in vivo"

4.4.3.1 - Colheita e fixação do material

De cada tratamento recolheram-se com a ajuda de uma pinça, os pistilos em bom estado, incluindo parte do pedunculo de modo a não danificar o ovário, e colocaram-se de imediato num fixador.

O fixador utilizado, o 'Faa' preconizado por MARTIN (1959), é o mais adaptado para as observações em fluorescência e consiste numa mistura de Formol 40%- uma parte, alcool 100% -oito partes, acido acético glacial-uma parte.

Os pistilos devem permanecer mergulhados no fixador durante 24 horas pelo menos, antes de passarem para o amolecimento, no caso de se efectuar logo de seguida a observação. Podem no entanto conservar-se no frigorifico a 4,5ºC durante muitos meses, sem risco de alteração.

4.4.3.2 - Preparação para observação ao microscópio

Antes de efectuar o amolecimento, os pistilos devem ser lavados em água corrente durante quatro horas pelo menos, para eliminar o fixador. No caso presente optou-se por deixá-los durante uma noite debaixo da torneira ligeiramente aberta.

Em todo o processo utilizaram-se pequenos tubos de plástico de 5cm de comprimento por 1.5 cm de diâmetro, onde se colocaram os pistilos, tapados de ambos os lados por uma rede de 0.5 mm. Os pistilos permaneciam assim sempre dentro dos tubos de tratamento para tratamento, colocando-se dentro de copos com as respectivas soluções (MURTY, 1971).

Para efectuar o amolecimento de modo a permitir a penetração do corante nos tecidos, bem como um mais fácil esmagamento durante a observação, mergulharam-se os pistilos numa solução de hidróxido de sódio 8 N, durante 4 dias. Para pistilos mais finos verificou-se serem suficientes três dias, para obter um bom esmagamento. Alguns autores preconizam um aquecimento da solução em banho-maria por exemplo, reduzindo o tempo de tratamento (SOULIE, 1980).

Depois de uma nova lavagem durante 8 horas, sob a àgua corrente da torneira, procede-se à coloração. é essencial para conseguir uma boa coloração que toda a soda seja eliminada, pelo que o tempo de lavagem deverá depender do método adoptado.

Dos corantes possiveis para a calose, optámos por utilizar o mais divulgado em observações em fluoresçência, preconizado por MARTIN (1959); azul de anilina a 0,1% numa solução de fosfato tripotássico (K_3PO_4) 0,1 N.

Os pistilos são mergulhados no corante devendo aí permanecer pelo menos 4 horas, a temperaturas relativamente baixas. Podem mesmo ser conservados durante largas semanas no frigorífico (PREIL, 1970).

Para proceder à observação, os pistilos foram esmagados entre lâmina e lamela numa gota de corante, a fim de libertar bem os tubos polinicos dos tecidos condutores e dos tecidos corticais que os prendem.

O esmagamento dos pistilos é sem duvida a fase mais delicada de todo o processo, pois o mesmo deve ser suficiente para fazer destacar os tubos polinicos dos tecidos do pistilo, mas não poderá ser demasiado, podendo partilos e rasgar o estigma, não deixando observar os grãos de pólen. A pressão a fazer sobre a lamela depende da espessura do pistilo, variando muito de caso para caso em virtude da fase do amolecimento no hidróxido de sódio ter tido ou não a duração ideal.

4.4.3.3 - Observação ao microscópio em fluorescência

Todas as observações foram feitas num microscópio LEITZ Dialux 20 equipado de uma lâmpada de mercurio HG 50W e de filtros para excitação selectiva na banda do violeta (comprimento de onda: 365 mμ), com uma ampliação de 10 x 6,3.

As fotografias foram realizadas recorrendo a uma câmara WILD MPS 45 montada sobre o microscópio, utilizando um filme 400 ASA.

Nem sempre é fácil distinguir os tubos polinicos de outras estruturas que por vezes também se podem apresentar fluorescentes, sobretudo nas combinações compativeis em que aqueles se apresentam pouco espessos. Só a prática pode ajudar nestas circunstâncias a fazer a distinção.

Outra dificuldade encontrada foi a de saber por vezes onde pára exactamente o crescimento do tubo polinico, pois pode corresponder apenas ao seu desaparecimento sob os tecidos do pistilo. É necessário então proceder a um segundo esmagamento localizado à região a observar. Tal não sucede nas combinações incompativeis, onde o crescimento pára numa mancha de calose, perfeitamente visivel.

No ensaio da influência da temperatura no crescimento dos tubos polinicos, a medição do seu comprimento foi efectuada com a ajuda de uma ocular graduada, sendo registado o comprimento do mais longo tubo observado e de seguida expresso em percentagem do comprimento total desde a superficie do estigma até ao óvulo, de acordo com LEE (1980). O mesmo método foi utilizado no ensaio de inter-compatibilidade clonal de 1988. Nos estudos da compatibilidade interclonal de 1989, optámos por registar a percentagem de pistilos em relação à totalidade da amostra, cujo tubo polinico mais comprido se encontrava respectivamente até 1/3, 1/2 , 2/3 e 4/4 do estilete.

Além dos tubos polinicos observámos também a fluorescência dos óvulos correspondente à sua degenerescência. Com efeito segundo diversos autores, os óvulos que se apresentem fluorescentes não são mais receptivos, nem fecundáveis portanto, ainda que os mesmos se apresentem normais do ponto de vista citológico.

Em relação à fluorescência dos óvulos considerámos 3 classes, tentando assim quantificar o seu grau de degenescência: fase 1 -correspondente aos dois óvulos sem qualquer fluorescência; fase 2 -com pelo menos a base fluorescente num dos dois óvulos; fase 3 -apresentando já os dois óvulos fluoresçência.

4.4.4 - Técnicas utilizadas para a contagem dos cromossomas em mitose

4.4.4.1 - Obtenção e fixação do material

Toda a técnica de contagem dos cromossomas em mitose foi a proposta por SALESSES (1967, 1970), tendo sido especificamente estudada por este autor para o caso das prunoideas.

O material utilizado foi a parte terminal das jovens raizes que se optiveram fácilmente do enraizamento de estacas lenhosas ou semilenhosas. A vantagem deste material em relação à extermidade de jovens rebentos em crescimento ou jovens folhas, é a de se poder obter durante a maior parte do ano, recorrendo às diversas técnicas de enraizamento hoje existentes (SALESSES, 1967).

Antes de proceder à sua fixação as jovens raizes foram mergulhadas num pré-fixador, constituido por uma solução aquosa de a- Bromonaftaleno na proporção de 1:50, durante duas horas a 4°C.Este tratamento destina-se a obter uma contracção dos cromossomas, que facilita posteriormente a sua contagem, sobretudo neste caso de plantas com grande numero de cromossomas.

Depois de muito bem lavadas em água destilada, as raizes foram fixadas numa solução contendo 25% de ácido acético glacial e 75% de alcool, onde podem ser conservadas durante muito tempo a 4°C, mas nunca menos de 20 horas.

4.4.4.2 - Preparação para observação

Lavadas de novo em alcool a 70% e posteriormente em água destilada, procedeu-se a uma hidrólise das raizes em ácido cloridrico normal no banho -maria a 60°C.O tempo de hidrolise determina a intensidade de coloração que se obtem posteriormente. Os melhores resultados obtiveram-se com um período de 10 minutos. A coloração foi efectuada deixando as raizes durante 4 horas no reagente de Schift.

Com o objectivo de diminuir a densidade do citoplasma, que dificulta uma boa coloração dos cromossomas

(SALESSES 1967), procedeu-se antes de efectuar a preparação, a uma maceração do material colocando-o numa solução de pectinase a 1%. O tempo de utilização depende da temperatura e pH da água, devendo ser ajustado a cada situação. No caso presente obteve-se uma boa coloração com 45 minutos a 60°C.

As raizes depois de passarem pela pectinase devem ser colocadas de novo em água destilada e conservadas no frigorifico a 4°C, onde podem permanecer durante um dia. A observação foi efectuada ao microscópio óptico, esmagando o ápice da raiz entre lâmina e lamela numa gota de carmim acético, com ampliação de 10x100 e 10x250 em imersão.

4.4.5 - Expressão e tratamento dos resultados obtidos no laboratório

Para o estudo da germinação do pólen "in vitro" e crescimento do tubo polinico "in vitro" e "in vivo", recorremos ao cálculo das equações não lineares em função do tempo de incubação, que melhor se ajustassem às médias dos valores observados. Para tal utilizámos o programa estatistico STAT-PACK-FMSAS versão 2.01.

No estudo de germinação "in vitro" efectuámos ainda uma análise de variância para os valores registados na ultima observação, 48 horas depois da colocação do pólen no meio de cultura. A separação das médias significativamente diferentes, foi feita para o teste Tukey para 95%, com a ajuda do programa MSTAT-3.0.

Efectuado o ajustamento linear para a fase inicial de crescimento do tubo polinico, pretendemos verificar se a taxa de crescimento durante esse período, era significativamente diferente entre clones e temperaturas. Para tal, depois de calculada a variância conjunta das diversas rectas, comparámos o respectivo coeficiente de regressão através do teste T. O intervalo de confiança para 95% foi calculado através da fórmula [bi ± 1/2 Q k,v) Sbi], em que Q (k,v) é o valor de q para p=0.05, k numero de regressões a comparar e v graus de liberdade e Sbi é o erro padrão calculado para cada coeficiente bi (SOKAL e ROHLF, 1981).

Os resultados do estudo da compatibilidade entre clones, constituiram entre todos, os de mais díficil análise. A observação do maior comprimento atingido pelo tubo polinico, efectuada em 1988, não nos pareceu suficiente para tirar conclusões quanto ao nivel de compatibilidade das diversas combinações. Embora tenha sido suficiente para a abordagem inicial do problema, não representa suficientemente bem a amostra de pistilos observada, não permitindo também uma conveniente abordagem estatistica.

A metodologia seguida em 1989 permitiu-nos a interpretação estatistica dos resultados, utilizando-se para tal um teste não paramétrico, em que as frequências observadas nas classes consideradas de 1/3, 1/2, 2/3 e 4/4 do comprimento do pistilo, foram comparadas com as frequências esperadas da hipótese de incompatibilidade total. Como o comprimento do tubo polinico pode ser considerado uma variável continua, optámos por seguir o teste de KOLMOGOROV SMIRNOV, em alternativa ao x^2. Este teste permite comparar y para os diversos níveis de significância, se os valores observados diferem ou não dos esperados, através da máxima distância vertical das duas funções, construidas com os valores acumulados das diversas frequências (CONOVER, 1980).

Como valores esperados da situação de incompatibilidade plena, considerámos os registados na autopolinização dos respectivos clones. Comparámos assim a combinação em que cada clone foi polinizado com o próprio pólen, com as restantes em que para esse mesmo clone se utilizou pólen dos outros clones.

Com o objectivo de comparar os clones em relação às suas diferenças com todos os restantes, voltámos a utilizar o mesmo teste para as frequências médias observadas de cada clone, excluindo a autopolinização, enquanto macho e fêmea. Neste caso considerou-se a maior distância em relação à média de todas as combinações de autopolinização.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização do material vegetal prospectado

5.1.1 - Caracterização morfológica

Como já referimos, não foi nosso objectivo elaborar uma exaustiva caracterização do material prospectado, mas apenas recolher alguns elementos de morfologia e de fisiologia que permitam identificar os clones estudados para posterior referenciação.

A caracterização morfológica de todos os clones de 'R. Claudia Verde', polinizadoras regionais e hibridos naturais, efectuada de acordo com a ficha já discutida atrás, apresenta-se nos anexos 2, 3, 4 e 5.

Mesmo bastante simplificada, qualquer ficha de caracterização morfológica resulta sempre num trabalho dificil, pela natureza mais ou menos subjectiva do mesmo, sobretudo quando se trata de tentar separar entre clones da mesma cultivar. No entanto é conhecida a importância que a caracterização pomológica tem para os trabalhos de selecção e melhoramento.

A dificuldade de caracterização das variedades de ameixeira é bem evidente nas enormes confusões que existem sobre a denominação das mesmas (DERMINE e LIARD, 1953). No grupo das R. Claudias o problema é ainda maior, devido aos frequentes casos de sinonimia e mononimia que aparecem.

Para que uma caracterização morfológica permita identificar correctamente uma cultivar é essencial que as caracteristicas a observar sejam estáveis e ao mesmo tempo reveladoras das diferenças genéticas existentes ao nível dos individuos. Daí que os caracteres não tenham todos o mesmo valor.

Na situação presente, a escolha dos caracteres teria de ser ainda mais restritiva, pois que as condições culturais são diferentes e o unico material de observação disponivel é a própria planta 'cabeça de clone', não se dispondo de

repetições no espaço. A unica prova disponivel são os anos de observação.

Tanto o ramo do ano observado durante o Inverno, como a parte terminal folhosa, mostraram ser um elemento de caracterização pouco importante, não apresentando diferenças evidentes entre os clones de 'R. Claudia Verde'. Já em relação às polinizadoras é possivel verificar alguma variação relativamente ao indumento, porém sem grande importância.

Ao nível da folha os caracteres apontados como mais estáveis são a forma, aspecto e pilosidade da página inferior. Excluindo a polinizadora P UE 53, a forma geral da folha é muito uniforme entre os clones. é no entanto sempre evidente um indumento mais intenso na página inferior e peciolo das polinizadoras regionais e hibridos. A pilosidade dos diversos orgãos é, de acordo com DERMINE e LIARD (1953), uma caracteristica bastante estável, sendo mesmo apontada como das mais importantes nas descrições morfológicas.

A flor que nas descrições de CAILLAVET (1935), constitui um dos orgãos de grande interesse para a caracterização das ameixeiras, não mostrou ser neste caso de grande valor. De facto, além de ser muito uniforme entre os clones, é um orgão relativamente pouco estável de ano para ano. O comprimento do pedunculo e o diâmetro da corola, são de todas as caracteristicas florais as menos estáveis. Esta variabilidade da flor poderá estar relacionada em alguns casos, com as deficientes condições culturais da cultivar na região, sendo alguns dos caracteres deste orgão determinados pelas condições ambientais, que interferem ao nível da diferenciação floral.

SURANYI (1971, 1974, 1976) encontrou uma correlação negativa entre o comprimento do pistilo e o numero de estames. Nas nossas observações, embora o numero de variedades seja bastante reduzido, não se verifica nenhuma correlação significativa entre os dois parâmetros. Também o índice do numero de estames pelo comprimento total do pistilo expresso em mm, que segundo aquele autor caracteriza a auto-fertilidade no género *Prunus* quando se encontra entre 1,7 e 1,9, não aparece neste caso associado com todos os clones auto-férteis. A relação entre a auto-fertilidade e estas caracte-

risticas da flor, nomeadamente o comprimento do pistilo que segundo FAUST (1989) é decisivo no vingamento, parece apenas de interesse ao nivel inter-especifico, tendo pouco significado quando se comparam variedades da mesma espécie como é o caso.

Da caracterização da flor, apenas dois pormenores parecem ser significativos: o facto da P UE 3 apresentar forte pilosidade no ovário e o da P UE 10 possuir um grande numero de pétalas suplementares. Na descrição de CAILLAVET (1935) a unica R. Claudia que aparece com alguma pilosidade no ovário é a 'R. Claudia d'Oullins'. No entanto, a grande diferença na época de maturação entre esta e o clone por nós prospectado, não permite pensar que se trate da mesma cultivar. Também DERMINE e LIARD (1953) referem que cultivares como a 'Jefferson' podem apresentar pilosidade sobre o ovário.

As caracteristicas do fruto, apesar de serem muitas vezes a fonte de denominações erradas em cultivares, devido à sua pouca estabilidade, parecem ser neste caso um precioso elemento de caracterização.

Entre todos os tipos de polinizadoras estudados, há dois grupos distintos: as que se assemelham mais à 'R. Claudia Verde' como os P UE 29 e 31 e todas os restantes de fruto mais pequeno e aparentemente mais perto das formas expontâneas de *P insititia* da região. No entanto alguns clones deste ultimo grupo, como o P UE 53 e o P UE 54 poderão não ter a origem referida. De facto, tanto pelo tipo de fruto como pelo tipo de folha, lembram mais a 'Prune d'Ente' que a 'R. Claudia Verde'. é assim possivel que aquela variedade tenha estado na sua origem, uma vez que a sua presença na região é referida por alguns agricultores mais idosos.

Um facto interessante é o de as polinizadoras de fruto azul existirem quase exclusivamente na região de Elvas, enquanto que as de fruto esverdeado estão mais associadas à região de Borba e Estremoz. Embora de dificil explicação, devido à proximidade das duas regiões, este facto poderia significar progenitores diferentes do lado da *P. insititia* em cada uma das regiões.

Ao nível do fruto dos clones de 'R. Claudia', as unicas diferenças surgem na P UE 10 que apresenta uma forma menos achatada que a tipica 'R. Claudia Verde' de epiderme mais verde. A polpa é também menos suculenta e mais consistente que a dos clones mais divulgados daquela cultivar.

Já PEREIRA (1969), durante o seu estudo da zonagem da ameixeira na região, referia que a 'R. Claudia' tardia dava melhor conserva doce que a precoce. De facto, uma das exigências de base do processo tradicional de confitagem é uma elevada consistência da polpa, que a 'R. Claudia Verde' possue, quando é recolhida na pré-maturação, mas que é ainda mais evidente no clone tardio P UE 10.

Nos clones P UE 3 e P UE 9, embora o fruto lembre respectivamente a 'R. Claudia d'Oullins' e a 'R Claudia d'Althan', é dificil de acreditar que se trate das mesmas cultivares, devido à época de maturação ser muito mais tardia.

A cultivar P UE 2, cujo fruto bastante alongado exclue a hipótese de ser um hibrido de 'R. Claudia Verde', parece ter tido origem em Espanha, pois que é mesmo conhecida na região como ameixa 'Espanhola'. Ainda que apresentando um calibre relativamente pequeno, é utilizada também para confitar, em virtude de apresentar uma boa consistência da polpa.

De todos os orgãos da árvore adulta, o caroço é sem duvida o que melhor material de caracterização fornece (DERMINE e LIARD, 1953; CAILLAVET, 1955). Além disso, os seus tecidos são pouco alteráveis e pode constituir um óptimo catálogo, em virtude da sua boa conservação.

A importância do caroço como elemento de caracterização pode ser por nós confirmada, apesar de se tratar de uma caracterização clonal. Mesmo nos clones de 'R. Claudia Verde' muito próximos entre si, o caroço apresenta sempre pequenas diferenças, quer na forma quer no tamanho. é disso exemplo a P UE 4, que apenas pelo porte e pelo caroço se distingue dos restantes clones.

Com o objectivo de tornar mais evidentes as distâncias entre clones, ao nível das suas principais caracteristicas morfológicas, elaborámos uma análise pelo método das componentes principais, cujo gráfico para as duas primeiras componentes se apresenta na Fig. 5.1. As 20 variáveis escolhidas foram as que apresentaram uma variação mais nitida entre os clones e que representam caracteristicas mais estáveis.

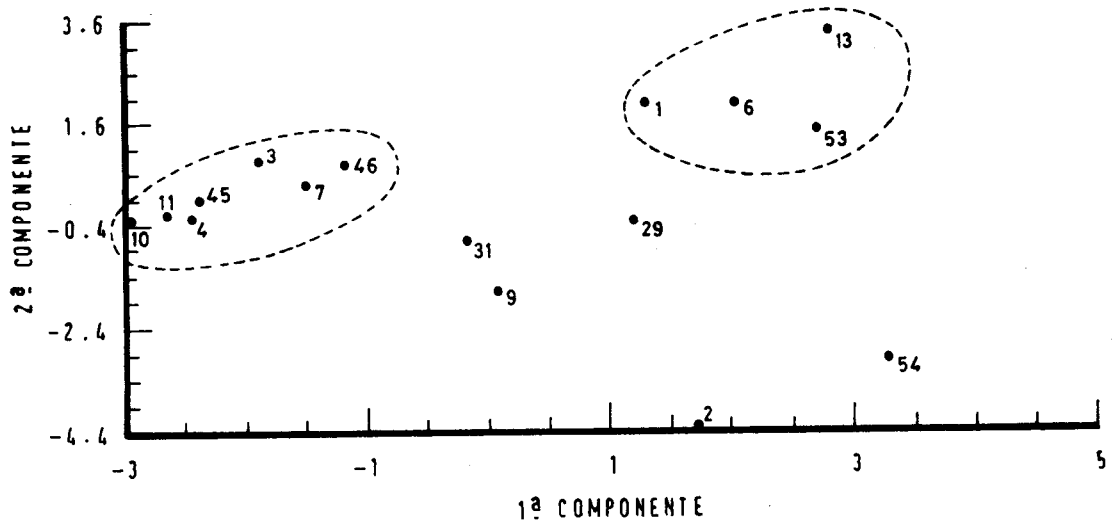


Fig. 5.1 -Gráfico representando a dispersão dos vários clones e variedades, segundo os eixos determinados pelas primeiras duas componentes.

Para a quantificação dos diversos niveis de cada caracteristica, utilizou-se um sistema de notas cujo intervalo variou com os caracteres e que se apresenta no anexo 1. O cálculo das componentes foi efectuado para as variáveis iniciais standardizadas.

A análise em componentes principais, cujo primeiro objectivo é o de reunir o máximo de variação entre individuos no menor numero possivel de variáveis (PHILIPPEAU, 1986), resultou de aplicação bastante dificil neste caso, devido ao pequeno numero de individuos a caracterizar e às pequenas diferenças observadas entre a maior parte deles. Assim, as primeiras duas componentes que serviram de base à

elaboração do gráfico da Fig. 5.1, apenas representam cerca de 41% da variação total. O numero de componentes que representam uma percentagem de variação superior a 5% é relativamente grande, como se pode ver no quadro do anexo 6.

Apesar das limitações da análise efectuada, é possivel estabelecer grupos de individuos semelhantes, assim como detectar quais os caracteres que melhor refletem as diferenças interclonais.

Os clones de 'R. Claudia Verde' formam um grupo bem distinto, sendo os clones 7 e 46 os que se afastam mais. Também as principais polinizadoras formam outro grupo, mas onde não se incluem alguns dos clones prospectados. Enquanto os clones 31 e 29 apresentam uma posição intermédia entre os dois grupos atrás referidos, a P UE 2 e a P UE 54 afastam-se bastante, reflectindo a sua origem em outras variedades que não a 'R. Claudia Verde'. Parece também confirmar-se o facto da P UE 54 não ter provávelmente a sua origem no cruzamento com a 'R. Claudia Verde'.

Como se pode observar no anexo 6, a primeira componente que representa 23.6% da variação total, correlaciona principalmente as caracteristicas do fruto. A segunda componente complementar à primeira, baseia-se em algumas caracteristicas do caroço e na relação comprimento-largura da folha. é pois sobretudo da variação destas caracteristicas que resulta o gráfico da fig. 5.1.

A análise em componentes principais permite para além de analisar as distâncias entre individuos, escolher de entre as variáveis inicialmente analisadas, aquelas que melhor caracterizam a população em causa, que correspondem respectivamente às que explicam uma maior percentagem da variação existente. Permite ainda ver como as mesmas se encontram correlacionadas entre si dentro de cada componente.

No material vegetal estudado, as caracteristicas do fruto apareceram como as mais importantes, logo seguidas das relativas ao caroço. Esta importância do fruto como elemento de caracterização, que não é referida por outros autores, poderá ser explicada pelo tipo de individuos observados: um grupo muito homógeneo respeitante aos clones de 'R. Claudia

Verde' e outro mais heterógeneo que corresponde às polinizadoras regionais e restantes hibridos.

Com algum interesse se apresentam ainda as correlações entre algumas variáveis. A mais importante é a que se regista entre o tamanho do fruto, a consistência da polpa e a sua suculência. A associação destas três importantes caracteristicas pomológicas da ameixeira, constitui um precioso elemento para o melhoramento da espécie, pois pode significar uma proximidade do controle genético das mesmas.

Outras correlações entre variáveis são por exemplo as que se verificam: entre o alongamento do caroço e a profundidade do sulco dorsal, de sinal negativo; entre o tamanho do fruto e do caroço, de sinal positivo; entre a posição do estigma relativamente às anteras e a forma das sépalas, de sinal negativo; e entre o aspecto da folha e a pubescência da sua página inferior, de sinal negativo.

5.1.2 - Caracterização fisiológica

Considerando as muito diversificadas e geralmente más condições culturais em que a ameixeira vegeta na região, é muito dificil eleger algumas caracteristicas fisiológicas que possam servir de comparação entre individuos. Mesmo assim elegemos 7 caracteres, excluindo a data de floração que será tratada em separado, cuja expressão qualitativa se apresenta no anexo 7.

A data de maturação é, com a excepção da P UE 10, muito semelhante em todos os clones de 'R. Claudia Verde'. As polinizadoras regionais apresentam em geral uma maturação intermédia entre aquela cultivar e as ameixeiras espontâneas. No entanto os clones P UE 53 e P UE 54 apresentando uma época de maturação mais tardia que a 'R. Claudia Verde', parecem confirmar a suspeita de não terem esta cultivar como progenitor.

A maturação mais tardia da P UE 3 e da P UE 9 relativamente à 'Rainha Claudia Verde' constitui o elemento mais significativo, que suporta a hipótese já referida, de não se tratar da 'R. Claudia d'Oullins' e da 'R. Claudia

D'Althan' respectivamente, apesar da semelhança morfológica com estas cultivares.

Todos os tipos de polinizadoras regionais apresentam um vigor em geral inferior aos clones de 'R. Claudia Verde', assim como um porte menos aberto, que resulta de uma basitonia menos acentuada. Comportamento particular apresenta o clone de R. Claudia P UE 4, que parece ter um vigor mais fraco que os restantes. No entanto, só em condições culturais bem homogéneas se poderá confirmar este facto.

Comparativamente aos tipos de 'R. Claudia Verde' selecçionados em França, os clones prospectados na região do Alentejo, apresentam em geral uma mais abundante ramificação. Constitue excepção o clone tardio P UE 10, que se assemelha mais ao material françês. Considerando que a insuficiente ramificação, é uma das caracteristicas que dificulta a condução da 'R. Claudia Verde' em compasssos mais apertados, poderá concluir-se da importância da variabilidade portuguesa para o melhoramento futuro desta cultivar.

A alternância fisiológica, apontada como uma caracteristica da 'R. Claudia Verde', não é tão acentuada como em outras regiões. A explicação reside no baixo nivel de frutificação que a cultivar tem na região, como consequência da deficiente polinização, impedindo as árvores de entrar em alternância. A floração é assim sempre muito abundante embora não haja posteriormente relação com a produção. Observações recentes sobre os mesmos clones instalados perto de polinizadoras, permitiram observar já uma alternância fisiológica bem mais acentuada.

A resistência à moniliose é uma das poucas vantagens culturais da 'R. Claudia Verde', que pôde ser confirmada para a generalidade dos clones, apesar das condições climáticas da região em causa não serem particularmente favoráveis ao desenvolvimento deste fungo.

5.1.3 - Caracterização cariológica

As observações sobre os cromossomas de alguns clones, teve apenas como objectivo o de contribuir para esclarecer se

outra espécie para além da *P. doméstica* e *P. insititia*, estaria envolvida na origem de algumas das polinizadoras regionais.

A contagem dos cromossomas durante a metafase da mitose dos clones P UE 1, P UE 6, P UE 13, P UE 53 e P UE 54, forneceu para todos eles o numero de 48, afastando assim aquela hipótese e confirmando que apenas formas hexaploides, tanto da *P. insititia* como da *P. domestica* estiveram na origem daqueles clones.

Para além de idêntico numero de cromossomas, tanto as polinizadoras regionais como os dois tipos de abrunheiros expontâneos em que se procedeu ao estudo do seu cariotipo, revelaram uma grande semelhança ao nivel da morfologia cromossomica. As nossas observações estão de acordo com os estudos mais detalhados de SALESSES (1970, 1973), que revelaram de facto um comportamento perfeitamente idêntico da *P domestica* e *P. insititia* ao nivel dos cromosssomas, mesmo durante a meiose.

5.1.4 -época de floração

A época de floração é de acordo com TABUENCA (1965, 1980), o resultado da satisfação das necessidades de frio durante o Inverno e posteriormente das exigências em calor das variedades para abrolharem. Sendo estas caracteristicas diferentes entre variedades, é de esperar um comportamento relativo distinto de ano para ano.

Assim podemos observar que em 1987 e 1988 o inicio de floração ocorreu alguns dias mais cedo que nos restantes anos, como resultado da temperatura média ter subido mais cedo nesses anos (anexos 8, 9, 10 e 11). Não há no entanto qualquer relação com o numero de horas de frio acumuladas até essa data. Pelo contrário, a floração mais precoce aconteceu precisamente nos anos de menores somatórios de horas com temperatura inferior a 7.2°C. Este facto levanos a concluir que, ou as exigências de frio da 'R. Claudia Verde' são inferiores à referida por alguns autores, ou este parâmetro não tem uma decisiva importância para a quebra de dormência da cultivar.

Ao nível dos clones de 'R. Claudia Verde' dois factores estão na origem das diferenças observadas no período de floração: o factor genético e o local onde se encontram instalados. De facto, embora as diferenças climáticas entre Borba e Elvas não pareçam significativas, pode observar-se uma ligeira variação em relação à precocidade de floração das fruteiras. Durante os 4 anos de observações registou-se sempre uma maior precocidade de Borba em relação a Elvas. Também em évora, onde se prospecçionou um dos clones de R. Claudia, a floração parece ser um pouco mais tardia que em Borba.

É pois difícil de concluir para a maioria dos clones, se a diferença observada no período de floração corresponde a uma característica genética, ou se é apenas o resultado de diferentes localizações. Mesmo no caso da P UE 7, que apresenta um nítido e constante atraso relativamente a outros clones geográficamente próximos, não é seguro tomar como certa esta característica, em face da sua localização numa zona um pouco particular.

A duração do período de floração é um factor de extrema importância nas possibilidades de polinização efectiva. Segundo FLECKINGER (1954, referido por TABUENCA, 1965), a duração deste período estaria inversamente correlacionada com as horas de frio registadas durante o Inverno. No entanto, é sabido que a temperatura média durante a floração é também um dos factores responsáveis pela duração deste estado fenológico. De facto, nas nossas observações registámos um menor período de floração em 1988 e uma maior duração em 1989, estando directamente relacionados com as temperaturas que se registaram a seguir à antese, como se pode ver nos gráficos das figs. 4.6 e 4.7.

A informação mais importante a retirar da análise da época de floração nos diversos clones e variedades, diz no entanto respeito à maior ou menor concordância das potenciais polinizadoras da 'R. Claudia Verde' durante os vários anos com esta cultivar.

Retomando referências de RENAUD (1976), segundo as quais e no que se refere à época de floração, a descendência do cruzamento entre duas variedades, possui em geral carac-

teristicas intermédias entre os seus progenitores, podemos considerar significativo o facto de grande parte das variedades polinizadoras regionais prospectadas, possuirem uma época de floração intermédia entre a 'R. C. Verde' e os tipos de *P. insititia* da região à semelhança do que se passa para o calibre do fruto e para a sua coloração.

De todas as polinizadoras regionais a P UE 6 é a unica que apresenta uma floração relativamente concordante com a 'R. Claudia Verde', ainda que uns dias mais precoce. Todas as restantes têm uma floração bastante mais precoce, havendo apenas alguns dias de concordância no final da floração. A P UE 1 é a mais precoce de todas, estando em geral jà sem pétalas quando a 'R. Claudia' inicia a antese.

A concordância da floração das potenciais polinizadoras da 'R. Claudia Verde' na região, será no entanto tratada mais à frente, quando se abordar o tema da eficácia de polinizadoras destas mesmas cultivares.

5.1.5 -Índice de frutificação em alguns pomares tradicionais

Como já referimos, este estudo foi efectuado em pequena escala e sem repetições, tendo servido apenas como indicador de algumas pistas para o delineamento dos estudos de laboratório.

Os resultados apresentados no quadro 5.1, indicam claramente que os baixos valores de vingamento e frutificação observados em alguns pomares, se deve a uma deficiente polinização.

A produção residual observada em alguns pomares, parece atingir valores anormalmente altos, considerando a auto-esterilidade da cultivar. Desde o primeiro ano de estudos que este facto mereceu a nossa atenção, pois que a hipótese de tal se dever apenas a pólen proveniente de outras variedades parecia improvável. Por um lado, pela sua fraca representação nos pomares e por outro pela escassa concordância da sua floração, sobretudo na região de Borba.

local	situação	% de ving.	% de frut.
Borba	vários clones de R. Claudia	4.6	2.1
Borba	pomar homogéneo s/ polinizadora	3.4	0.8
Elvas	pomar homogéneo s/ polinizadora	2.2	0.6
Elvas	pomar homogéneo c/ polinizadora	12.3	9.5
Évora	pomar clonal c/ Stanley	15.8	12.4

Quadro 5.1- Percentagem de vingamento e de frutificação final observados em vários pomares da região com polinização livre (valores médios de 1986 e 1987).

Duas hipóteses foram adiantadas, como já se referiu na introdução deste trabalho: uma possivel inter-polinização dos clones de 'R. Claudia Verde'; ou a influência determinante das condições ambientais na manifestação do fenómeno da incompatibilidade. A primeira das hipóteses parece à primeira vista reforçada, pelo facto da percentagem de frutificação ser mais elevada nos pomares em que a promiscuidade do material de R. Claudia é maior. No entanto a interpolinização entre clones desta cultivar é referida na bibliografia como não sendo eficaz, sendo apenas as falsas 'R. Claudias' apontadas como potenciais polinizadoras.

Nos dois pomares onde a presença de polinizadoras de floração concordante foi detectada, os valores de vingamento e frutificação foram, como se observa pelo quadro 5.1, muito superiores.

Convêm no entanto referir, que apesar dos baixos indices de frutificação em geral observados, a produção por

árvore pode chegar aos 30-40 Kg. A explicação está na grande quantidade de flores existente, que resulta do facto de não se utilizar em geral qualquer tipo de poda.

Um outro factor que poderá contribuir para a baixa produtividade de alguns pomares é a fraca disseminação de agentes polinizadores. Em geral não existem colmeias na proximidade dos pomares, nem são aí colocadas durante a floração. De facto, nos pistilos recolhidos em alguns pomares e observados à fluorescência, a quantidade de grãos de pólen germinados sobre o estigma era em geral reduzida, denunciando uma insuficiente polinização.

5.2 - Estudo da autocompatibilidade nos clones de 'Rainha Claudia Verde'

5.2.1 - No campo sobre ramos isolados

Nos 12 clones em que se efectuou apenas a auto-polinização, não se registou qualquer vingamento de fruto. Alguns chegaram ao tamanho de um grão de trigo mas acabaram posteriormente por cair, comprovando a não existência de fecundação (Fig.5.2). O engrossamento inicial do fruto, que pode atingir a dimensão de um grão de ervilha é referido também por BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE, 1949) como um fenómeno independente da fecundação.

Nos ramos auto-polinizados, o pseudo-vingamento não proporcionou no entanto um crescimento dos frutos tão elevado como nos que se encontravam em polinização livre, onde os frutos chegavam por vezes a atingir o tamanho de um grão de ervilha. Parece pois que também ao nível da influência da polinização como factor estimulativo do crescimento inicial do ovário, há uma maior eficácia do pólem estranho que do próprio pólem.

Embora o numero de ramos controlados por árvores fosse apenas de 3, a quantidade de flores total parece-nos ter sido suficiente para afastar a hipótese de poder haver compatibilidade parcial em algum dos clones. Também as mais elevadas temperaturas durante a floração em 1987, não mostraram ter qualquer tipo de influência ao nível quer do

vingamento final, quer da dimensão dos frutos quando da sua queda.

CRANE e LAWRENCE (1929) incluiram na sua lista de variedades de ameixeiras auto-incompativeis a cultivar 'R. Claudia Verde', não tendo registado também nenhum vingamento de fruto quando em autopolinização. No entanto, alguns autores referem percentagens de frutos vingados da ordem dos 0.1% (FACCIOLI e MARANGONI, 1978), 0 a 1% (BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE, 1949)), que embora do ponto de vista cultural não seja significativo, poderia com a ajuda de condições ambientais mais favoráveis, traduzir-se numa possibilidade real de haver auto-fecundação.

A 'Rainha Claudia Verde' aparece ainda referida por alguns autores como sendo auto-fértil ou parcialmente auto-fértil (SURANYI, 1980). Também a variedade conhecida nos EUA com o nome de Green Gage é referida como sendo auto-fértil. Neste caso porém, é de prever que se trate provávelmente de cultivares do tipo R. Claudia, mas já genéticamente afastadas da verdadeira 'R. Claudia Verde'.

5.2.2 - No laboratório sobre pistilos observados à fluorescência

Com o objectivo de confirmar os estudos efectuados no campo e de observar qual a zona do estilete onde os tubos polinicos param, efectuaram-se em 1988 e 1989 algumas auto-polinizações no laboratório, na sequência do ensaio de polinização entre clones.

Como se pode observar pelo quadro 5.2 e 5.3, embora o tubo polinico nunca chegue à região do ovário, há alguma variação entre clones na expressão da incompatibilidade, havendo mesmo alguns casos em que o tubo polinico ultrapassa claramente o primeiro terço do estilete, zona onde a reacção de incompatibilidade geralmente ocorre.

Estas observações estão de acordo com as referências da maioria dos autores, que referem o facto da reacção de incompatibilidade se produzir nos hexaploides de forma menos evidente que em espécies diploides. É de prever também, que a

Fig. 5.2 -Aspecto de frutos nao fecundados, num ramo com auto-polinização controlada, ao fim de 21 dias depois da antese.

temperatura relativamente alta do laboratório onde se efectuou o estudo, tenha tido uma contribuição positiva para o crescimento dos tubos polinicos.

Clones	Comp. médio do tubo
P UE 5	75
P UE 10	30
P UE 11	45
P UE 15	33
P UE 32	40
P UE 33	30
P UE 34	30
P UE 39	40
P UE 45	55

Quadro 5.2- Expressão da auto-incompatibilidade em alguns dos clones regionais de 'Rainha Claudia Verde' em 1988, ao fim de 80 horas de incubação. (comprimento do maior tubo polinico observado em % do comprimento do estilete).

clone	a 1/3	a 1/2	a 2/3	a 4/4
P UE 4	90.0	10.0		
P UE 10	100.0			
P UE 11	85.0	15.0		
P UE 15	90.0	10.0		
P UE 32	100.0			
P UE 33	95.0	5.0		
P UE 36	90.0	10.0		
P UE 37	85.0	15.0		
P UE 43	100.0			
P UE 44	90.0	10.0		
P UE 45	80.0	15.0	5.0	
P UE 54	100.0			

Quadro 5.3 -Crescimento do tubo polinico em autopolinização ao fim de 100 horas de incubação. (expresso em % de pistilos cujo maior tubo polinico se situa respectivamente a 1/3, 1/2 e 2/3 do estilete) -1989.

O comportamento de alguns clones é sensivelmente idêntico nos dois anos de observações, o que poderá significar uma ligação estreita entre a forma mais ou menos rápida com que a reacção de incompatibilidade se dá e a complexidade do géne S. De notar também, que a maior duração do período de incubação em 1989, favoreceu os clones em que os tubos polínicos ultrapassam 1/3 do estilete, nomeadamente o P UE 11 e P UE 45, enquanto nos restantes não produziu qualquer alteração.

Infelizmente não pudémos repetir o estudo relativamente ao clone P UE 5, por o mesmo ter desaparecido do pomar onde se encontrava instalado. Contamos fazê-lo dentro em breve na colecção entretanto instalada.

De acordo com a hipótese de MULCAHI e MULCAHI (1983, referido por GAUDE e DUMAS, 1987) e sendo a incompatibilidade nos hexaploides comandada pelo menos por 6 factores, poderá admitir-se a existência de mutações ao nível de um ou mais alelos S, como as responsáveis pelo retardamento na paragem do tubo. Assim, grãos de polen S1 S2 S3' poderiam emitir um tubo polínico que embora incompatível, só é parado numa região mais afastada do estigma. Entretanto no mesmo indivíduo haverá polen por exemplo S1 S2 S4 que mantém o seu comportamento de incompatibilidade plena. Esta hipótese é aliás confirmada pelo facto de na observação à fluorescência dessas combinações, apenas alguns tubos manifestarem o espessamento de calose na parte terminal do seu percurso.

5.3 -Estudos sobre a germinação do pólen "in vitro"

5.3.1 -Testagem de algumas condições de germinação

Segundo KLUNGNESS, THORP e BRIGGS (1983), embora o índice de germinação "in vitro" reflicta a viabilidade do pólen, é impossível fazer a associação entre esta viabilidade e a verdadeira qualidade do mesmo. Para estes autores a comparação entre germinação "in vitro" e qualidade não poderá ser feita senão especulativamente.

Porém HERRERO e JOHNSON (1980), embora trabalhando a temperaturas acima do óptimo, referem que os grãos não germinados "in vitro", se podem considerar não viáveis e por isso incapazes de fertilização.

De acordo com LEE (1980), quando se trabalha dentro da mesma espécie o erro será pequeno e sempre por defeito, pois segundo este autor a germinação "in vitro" é em geral sempre inferior à observada "in vivo".

O teste de germinação "in vitro" constitui como já vimos em 2.3.4, uma fonte de variação em si mesmo, devido ao grande numero de factores que são de dificil controle.

De acordo com POLITO e LUZA (1988), a não germinação do pólen pode ser devida a dois motivos base: porque o grão é inviável devido a razões de ordem genética ou ambiental na altura da sua formação; ou porque as condições necessárias à sua germinação não existem. A dificuldade dos testes de germinação "in vitro" está sobretudo em conseguir eliminar o mais possivel este segundo factor, o que equivale à determinação dessas condições ideais para cada espécie e variedade.

Os dois ensaios preliminares sobre a influência da densidade de grãos e do melhor substracto de germinação, serviram precisamente para encontrar uma técnica que possibilitasse a máxima expressão do potencial de germinação de cada cultivar.

Como se pode ver pelo gráfico da fig. 5.3, a percentagem de grãos germinados é muito afectada pela concentração dos mesmos no meio de germinação. No entanto a partir de 60 grãos por mm2 a variação torna-se menos importante, atingindo um óptimo a cerca de 150 a 200. Contráriamente ao referido por STANLEY e LINSKENS (1974), não observámos um efeito negativo da densidade muito elevada na germinação. No entanto, como a contagem dos grãos e medição dos tubos se torna muito dificil para além dos 100 grãos por mm2, optámos por realizar todos os testes com uma densidade próxima deste numero.

Em relação aos meios de cultura testados, o comportamento dos diversos clones e variedades não foi uniforme, permitindo no entanto excluir claramente o meio B como subs-

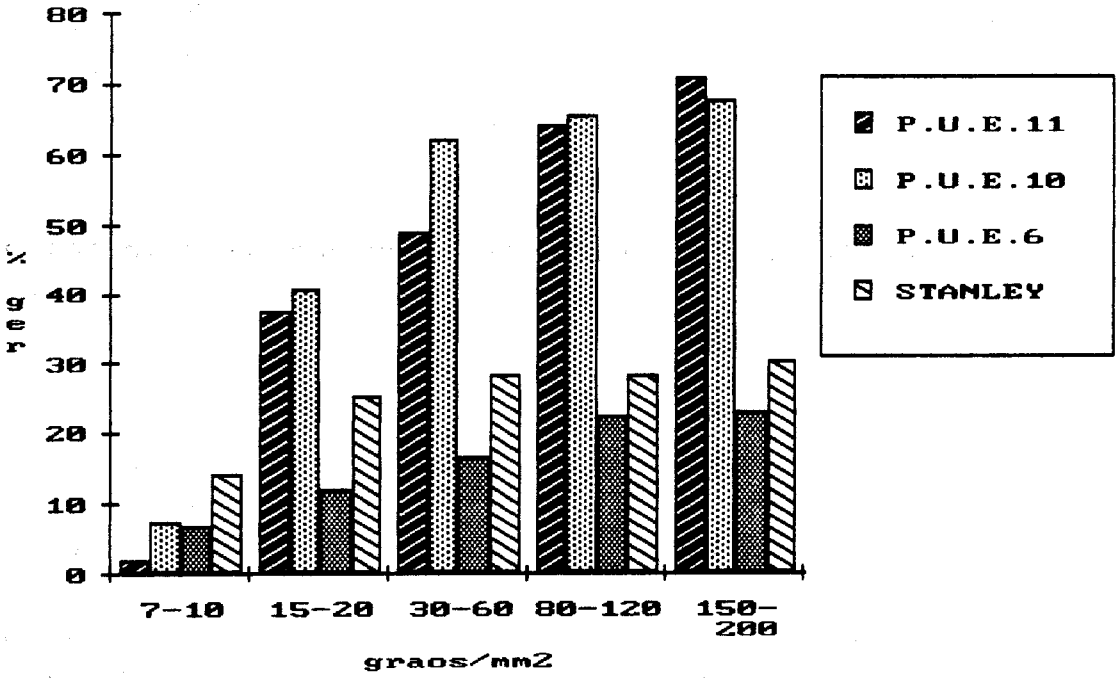


Fig.5.3 -Influência da densidade de grãos de pólem na sua germinação. (Ensaio efectuado com o meio de cultura -A).

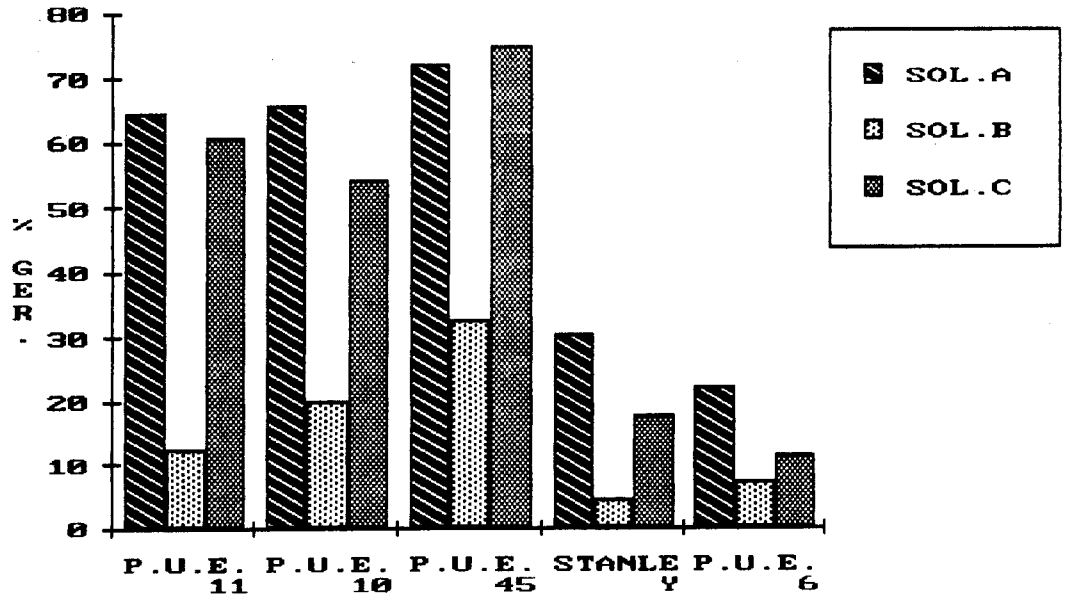


Fig. 5.4 -Influência do meio de germinação sobre a germinação do pólen 'in vitro'

tracto de germinação a utilizar. Os 20% de sacarose utilizados neste meio, estão provávelmente na origem da redução de germinação do pólen, uma vez que a pressão osmótica criada pela sacarose, é apontada como o principal condicionante à germinação. As diferenças devidas à quantidade de agar não parecem ser tão importantes, ainda que o meio com 2% se tenha revelado melhor que o meio com 1%, para a generalidade das cultivares (Fig. 5.4). Também a ausência de ácido bórico no meio B, poderá ser apontada como um dos factores responsáveis pela menor germinação proporcionada. Com efeito, a importância do boro na germinação do pólen é sublinhada pela maioria dos autores como já atrás se viu.

5.3.2 -Viabilidade do pólen nos diversos clones e cultivares

Entre os factores que influem na eficácia da polinização, a qualidade do grão de pólen é considerada como um dos mais importantes, daí que constitua quase sempre um assunto privilegiado em estudos de biologia floral. Este factor de qualidade é determinado em grande parte pela condição genética do individuo, mas não menos importante é também a influência das condições ambientais e culturais em que a planta vegeta.

Segundo JONSSON (1974 e SAPRE, 1973, referidos por KLUNGNESS, THORP e BRIGGS, 1983) a qualidade do pólen é determinada em grande parte pelo seu processo de maturação, onde as condições ambientais tem grande influência.

A forma do grão de pólen, caracteristica de cada espécie, é só por si uma forma de estudo da qualidade do mesmo. De facto, uma proporção variável de grãos anormais aparece em todas as cultivares e é determinada entre outros factores pela constituição genética das mesmas. REMY (1953) assinala uma elevada correlação positiva entre a capacidade de germinação e a percentagem de grãos normais. No entanto este autor não encontrou qualquer relação das condições ambientais com aquele parâmetro. A proporção de grãos normais seria assim sobretudo uma caracteristica varietal.

MARQUES DE ALMEIDA (1945) assinala também, que tanto a origem hibrida como a poliploidia, podem implicar uma rela-

tiva esterilidade do gâmeta masculino. Nestes casos haveria lugar a alterações morfológicas do próprio grão, fácilmente visiveis portanto. Este autor refere ainda, que também muitos dos grãos morfológicamente normais podem não germinar, devido à presença de um factor responsável pela desorganização da meiose.

STANLEY e LINSKENS (1974) referem a este propósito, que a forma do grão de pólen não é sempre uma boa medida da sua viabilidade, podendo grãos aparentemente normais não estarem viáveis devido à existência de más condições climatéricas, sobretudo baixas temperaturas durante a sua formação.

Nas nossas observações, embora a percentagem de grãos anormais não constituisse objectivo de análise, pudemos registar em geral um elevado numero de grãos normais. Já REMY (1953) referia que tanto a *P domestica* como a *P. insititia* se encontravam bem estabelecidas no seu estado hexaploide, tendo uma elevado numero de grãos de pólen normais, em geral superior a 90%.

Como se pode ver pelas figs. 5.7 e 5.8, mesmo os grãos não germinados têm uma morfologia normal, o que está de acordo com a referência de STANLEY e LINSKENS (1974) sobre o facto da aparência externa do grão de pólen ser um mau critério na maioria das espécies para a determinação da sua viabilidade.

Contrariamente ao observado por NATIVIDADE (1932) sobre esta cultivar de ameixeira, o tamanho do grão de pólen é relativamente uniforme. A irregularidade de forma referida por este autor pode assim não estar relacionada com a sua condição genética como o mesmo sugere, mas com condições ambientais limitantes, que esta cultivar observa na região do Oeste. De facto as nossas observações estão mais de acordo com as de outras regiões onde a 'R. Claudia Verde' se desenvolve bem, como é o caso do Sudoeste de França.

Apenas no clone P UE 15 se observou com uma certa frequência o aparecimento de grãos vazios (Fig. 5.5), semelhantes aos de certas cultivares androestéreis como a 'Red Beauty' por exemplo. O facto deste clone ter sido prospectado

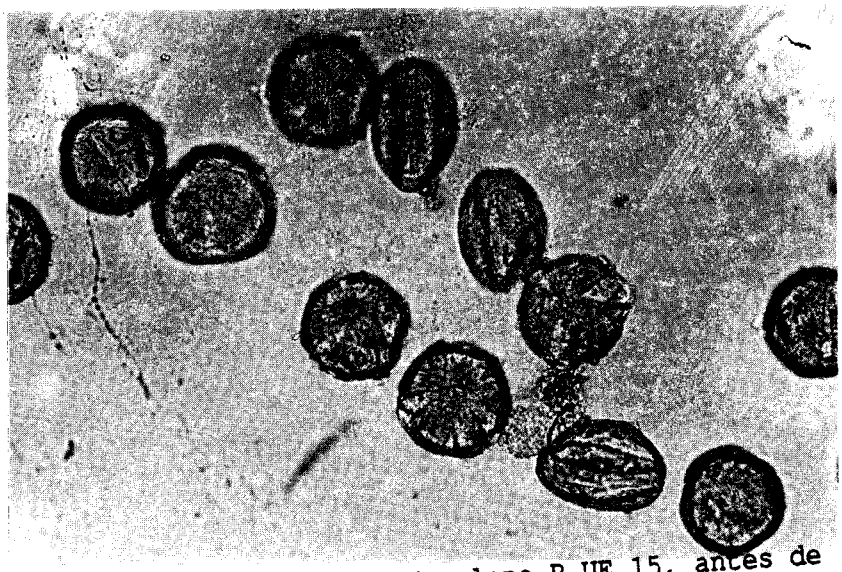


Fig. 5.5 -Grãos de pólen do clone P UE 15, antes de iniciada a germinação (ampliação 300x).

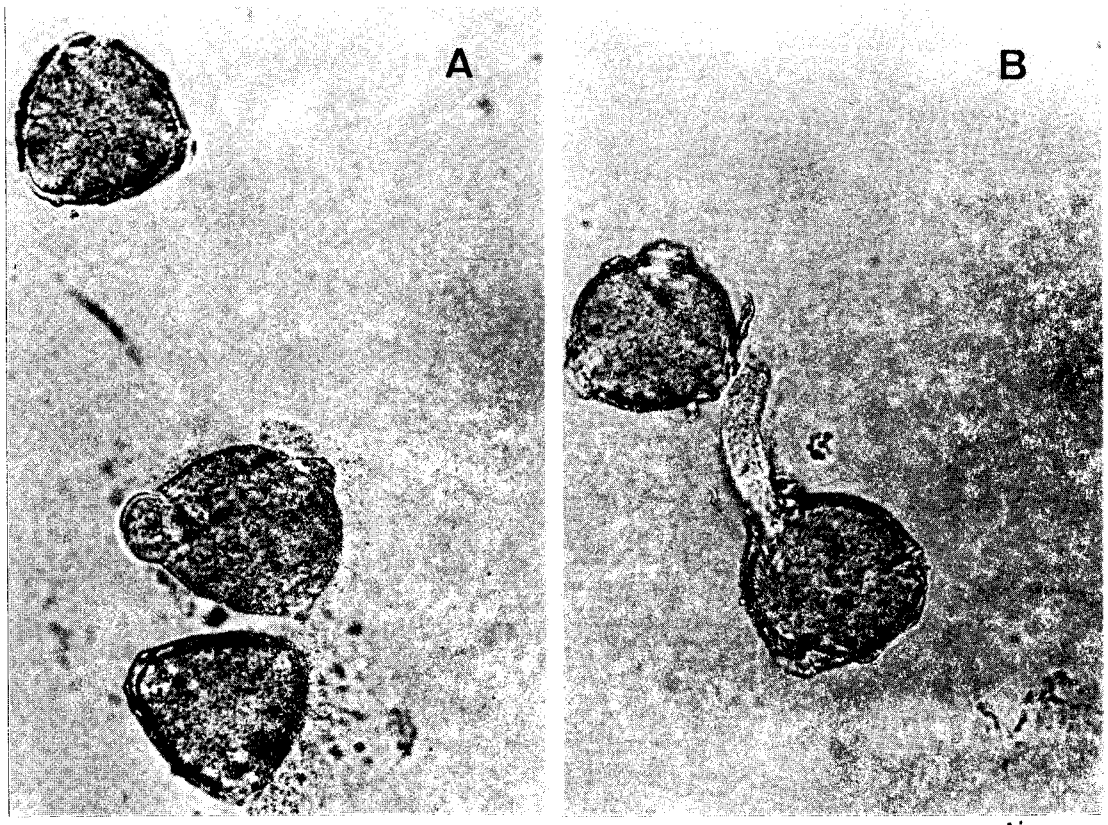


Fig. 5.6 -Ínicio da germinação em pólen de 'R. Claudia Verde', podendo observar-se a emissão do tubo polinico através de um dos poros da exina -A e já em pleno crescimento -B (ampliação 500x)

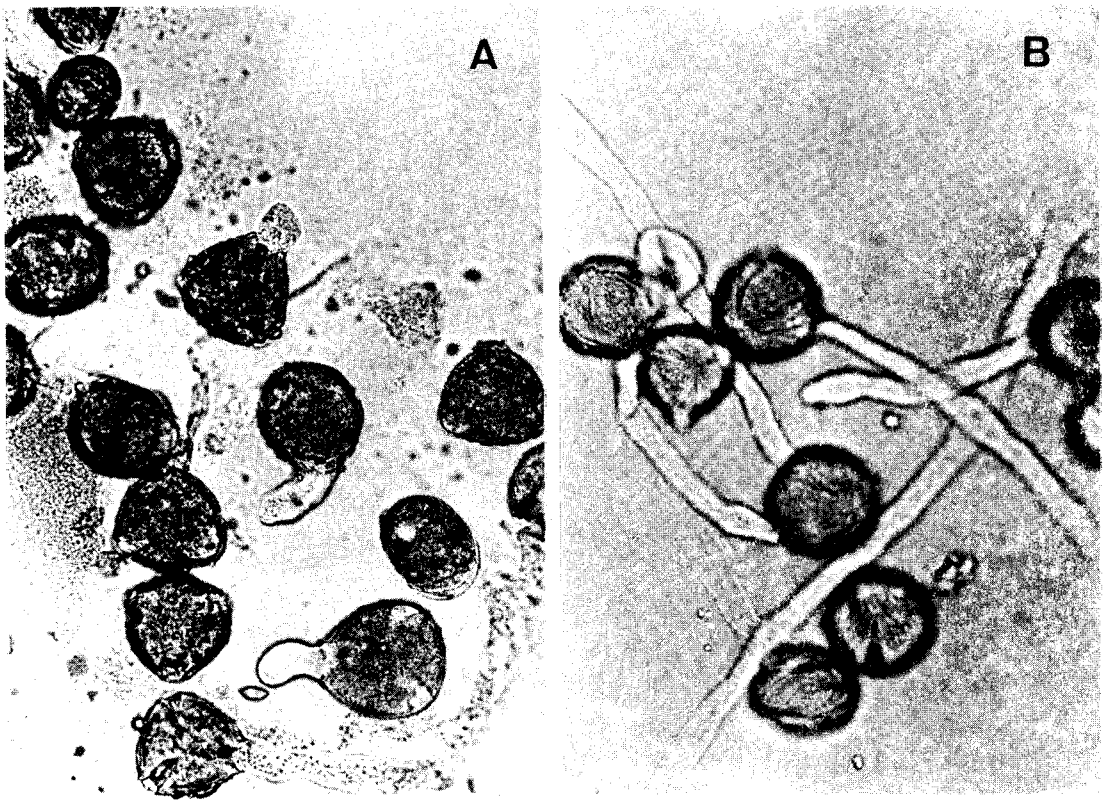


Fig. 5.7 -Pólen de P UE 11 germinado ao fim de 12 h, a 10°C -A e a 20°C -B (ampliação 300x)

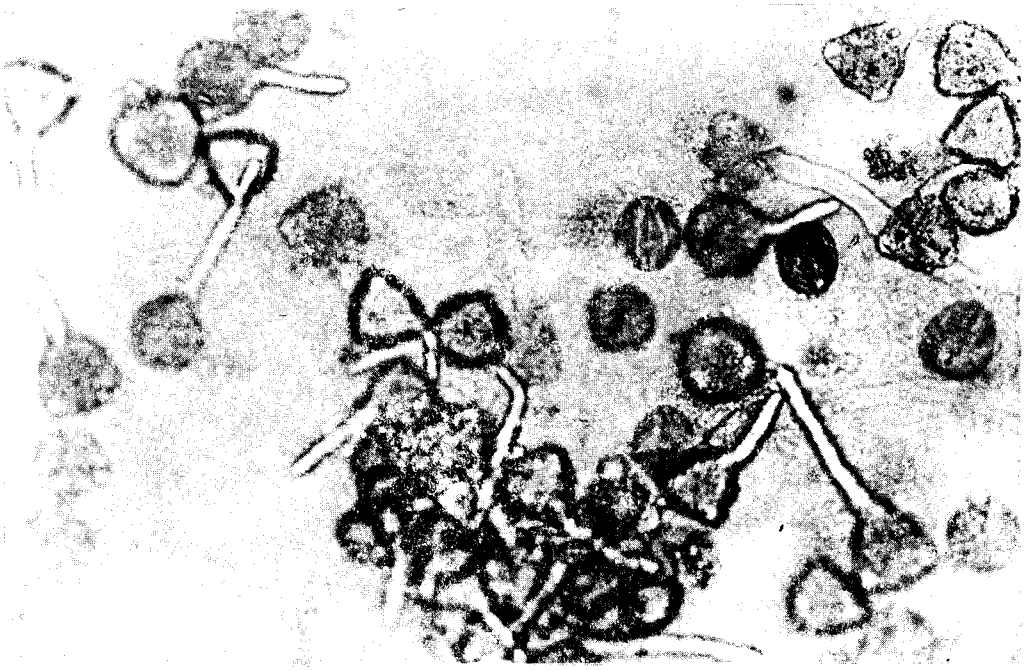


Fig. 5.8 -Pólen de 'Stanley' germinado ao fim de 8h -15°C notando-se a influência positiva da densidade de grãos na taxa de germinação (ampliaçao 220x).

na região de évora, já fora da zona tradicional de cultura da cultivar, pode estar relacionado com aquela observação. Com efeito o numero de horas de frio que se observa em évora, parece ser insuficiente para a 'R Claudia Verde', podendo estar na origem de anomalias ao nível da organogénese floral.

Também REMY (1953) observou não existir correlação entre a percentagem de grãos normais e a sua germinação 'in vitro', referindo que aquela é mais o reflexo da homogeneidade entre os progenitores do individuo, que uma caracteristica varietal ou ambiental.

A elevada percentagem de grãos normais por nós observada, tal como a referida para muitas outras variedades europeias, parece indicar uma certa estabilidade genética deste grupo, ao contrário do que acontece por exemplo com algumas variedades japonesas hibridos entre a *P. salicina* e algumas espécies do grupo americano.

O tamanho do grão de polén é apontado como um excelente indicador do nível de ploidia da espécie, sendo até por vezes utilizado como caracteristica taxonómica (STANLEY e LINSKENS, 1974). Segundo REMY (1953), o grão de pólen das ameixeiras hexaploides é cerca de 1.5 vezes maior que o das diploides. No entanto sabe-se que uma certa variação existe entre diferentes plantas da mesma cultivar e até entre flores da mesma árvore. Também devido a factores ambientais durante a observação, que permitem por exemplo diferentes graus de turgidez, o tamanho do grão pode aparecer com alguma variação.

Nas nossas observações o tamanho do grão de pólen tanto dos clones de 'R. Claudia Verde' como das variedades polinizadoras, está de acordo com a referência de REMY (1953), ou seja cerca de 45 microns de diâmetro.

Com a germinação "in vitro" do pólen dos clones de 'R. Claudia', pretendemos avaliar a sua capacidade germinativa e o crescimento do tubo polinico, uma vez que "in vivo" essas caracteristicas são muito afectadas não só pelo fenómeno de incompatibilidade que se manifesta ao nível do pistilo, mas também pela influência da superficie do estigma e posteriormente dos tecidos do próprio estilete.

Os resultados da percentagem de germinação apresentam como se pode ver pelo quadro 5.4, uma grande variabilidade. No entanto esta variação não é superior à referida por STANLEY e LINSKENS (1974) que aponta um nível de ± 8% como sendo normal neste tipo de testes.

Ao nível dos clones de 'R. Claudia Verde', os valores da percentagem de germinação são bastante elevados, contráriamente ao referido por NATIVIDADE (1932) e estão de acordo com os observados por KEULEMANS (1980) que refere 68% para a 'R. Claudia Crottée', sinónimo belga da 'R. Claudia Verde', em condições climáticas bem diferentes das nossas. Considerando as deficientes condições culturais em que a maioria dos clones estudados vegeta e o facto da disponibilidade de nutrientes ao nível da planta condicionar através do processo de maturação do grão de pólen a sua posterior viabilidade, podemos mesmo considerar de bastante elevada a capacidade de germinação do pólen destes clones.

Apesar de serem grandes os intervalos de confiança de cada média, surgem mesmo assim algumas diferenças significativas, sobretudo entre anos. Em 1987 registam-se para todos os clones os mais baixos valores, apesar de só nos P UE 11, P UE 45 e P UE 46 serem significativamente inferiores. A explicação poderá estar no baixo somatório de horas de frio registadas no Inverno de 86/87. Como já vimos a região do Alto Alentejo está no limite de exigências de horas de frio para as variedades Europeias, havendo mesmo alguns anos em que as necessidades não são satisfeitas.

Ao nível clonal é possivel observar que quanto mais elevado é o potencial de germinação, maior é também a sensibilidade às más condições do ano de 1987. O clone P UE 7 por exemplo, sendo o que tem um mais baixo pico de germinação é também o que se revela menos afectado em 1987.

Conforme KLUNGNESS, THORP e BRIGGS (1983) observaram em pólen de amendoeira, o tempo humido e o avançado estado de deiscência das flores está associado com a baixa germinação do pólen. Em relação ao primeiro factor, que pode segundo os autores referidos, provocar uma redução da viabilidade devido à aceleração da actividade respiratória no pólen quando

humido, não parece ter sido importante neste caso, pois os anos de 1986 e 1989 em que o tempo durante o inicio da floração decorreu chuvoso, não registam diferenças significativas relativamente aos restantes. Em relação ao segundo, também apontado por FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ-VALLEDOR e RALLO (1981), como responsável na oliveira pela perda de viabilidade do pólen, não o pudemos analisar pois que todas as amostras foram recolhidas no mesmo estado fenológico -botão branco (estado fenológico D).

clones	nº de obs.	médias (%)	intervalo de conf. para p=95%
P UE 7			
1986	9	38.97	32.21 - 45.73
1987	9	33.33	26.52 - 40.15
1988	9	48.33	40.72 - 55.94
1989	9	45.10	38.06 - 52.14
P UE 10			
1986	9	53.77	42.72 - 64.81
1987	8	25.63	19.03 - 32.22
1988	8	32.70	26.64 - 38.76
1989	9	33.11	25.55 - 40.68
P UE 11			
1986	9	56.17	45.84 - 66.50
1987	8	24.69	16.80 - 32.58
1988	9	44.02	34.68 - 53.36
1989	9	48.60	35.84 - 61.37
P UE 45			
1986	7	60.61	43.52 - 77.71
1987	7	20.24	16.61 - 23.88
1988	7	51.13	40.15 - 62.11
1989	7	38.33	32.67 - 43.98
P UE 46			
1986	8	39.88	30.90 - 48.87
1987	8	28.96	21.21 - 36.71
1988	8	60.54	51.56 - 69.52
1989	8	44.89	37.06 - 52.71

Quadro 5.4 -Viabilidade do pólen dos vários clones de 'R. Claudia', expressa pela percentagem de germinação "in vitro", ao fim de 12 horas de incubação à temperatura do laboratório (20 ±2°C).

Também o pólen proveniente da cultivar 'Stanley' e 'Prune d'Ente' mostrou uma nitida quebra de viabilidade em 1987 (Quadro 5.4). Curiosamente nas duas polinizadoras regionais P UE 6 e P UE 13 não se registaram diferenças, o que sugere a sua boa adaptação à região.

Vários estudos demonstram uma grande influência do genótipo na viabilidade do pólen, tanto inter-especifica como intra-especifica (STANLEY e LINSKENS, 1974; WEINBAUM, PARFITT e POLITO, 1984; FERNANDEZ-ESCOBAR, GOMEZ-VALLEDOR e RALLO (1981, 1983).

Nas nossas observações as diferenças entre clones são práticamente inexistentes; apenas em 1988 a P UE 10 apresenta uma percentagem significativamente inferior às restantes, mas que não tem correspondência nos outros anos.

Comparando com as outras cultivares testadas, pode-se concluir que a viabilidade do pólen da 'R. Claudia Verde' é bastante alta, não constituindo só por si limitação a uma eficiente polinização.

O pólen da cultivar 'Stanley' tem uma percentagem de germinação significativamente inferior à 'R. Claudia Verde' para a generalidade dos anos, estando os nossos valores no entanto de acordo com os observados por KEULEMANS (1984), que refere uma percentagem de grãos germinados entre 10 e 35 %, conforme as temperaturas de incubação. Mais dificil de explicar é a grande variação entre os anos nos valores observados, que ultrapassa mesmo a dos clones de 'R. Claudia Verde'. Esta grande sensibilidade às variações climáticas entre anos parece não estar de acordo com a sua conhecida boa adaptação em termos climáticos.

Uma explicação possivel pode estar no facto da origem do pólen não ser das mesmas plantas em todos os anos, ao contrário do que aconteceu com os clones regionais por nós prospectados. Um importante factor de erro na utilização do teste de germinação 'in vitro' como uma medida da sua efectiva viabilidade, é segundo STANLEY e LINSKENS (1974), precisamente a variação existente entre plantas. Também POLITO e WEINBAUM (1988), referem ser grande a variabilidade do poten-

cial de germinação entre árvores, sobretudo quando têm idades diferentes.

A mais baixa percentagem de germinação observa-se nas polinizadoras regionais, sobretudo a P UE 13 que em nenhum ano ultrapassa os 30%. Tendo provávelmente origem na hibridação natural entre a 'R. Claudia Verde' e os abrunheiros expontâneos da região, o mais baixo índice de viabilidade destas cultivares, pode reflectir as irregularidades ao nível da meiose que são devidas às diferenças de afinidade entre os cromossomas das espécies progenitoras.

A origem hibrida das variedades, sobretudo quando se trata da geração F1, origina em geral uma elevada percentagem de grãos anormais. No entanto, contráriamente ao observado por REMY (1953) e LAYNE e SHERMAN (1986) em relação a diversos hibridos inter-especificos de ameixeira, nas amostras de pólen por nós recolhidas, não se observou uma redução nitida em relação ao pólen de 'R. Claudia Verde'. Este facto vem mais uma vez confirmar a grande proximidade genética entre a *P domestica* e a *P insititia* (SALESSES, 1973), ou apoiar a ideia de que a 'R. Claudia' faz parte desta ultima espécie.

5.3.3 - Influência da temperatura na percentagem de germinação.

Para além da qualidade intrinseca do pólen, a capacidade germinativa é grandemente influenciada pelas condições ambientais do processo de germinação. De todos esses factores, a temperatura é sem duvida o mais importante, sendo só por si muitas vezes responsável pela falta de frutificação das fruteiras.

Nas prunoideas a tolerância às baixas temperaturas varia de espécie para espécie, sendo em geral maior nas de floração mais precoce.

A diferente sensibilidade à temperatura das espécies não é mais que uma consequência da adaptação às condições ambientais do período de floração. Este é condicionado como sabemos pela satisfação das necessidades de frio durante o

Inverno, bem como pela existência de uma temperatura minima necessária para iniciar o abrolhamento (TABUENCA, 1980). As espécies como a amendoeira e o pessegueiro, geralmente com menos exigências de frio, iniciam o processo de floração mais cedo, o que implica a exposição a temperaturas relativamente baixas durante a floração.

WEINBAUM, PARFITT e POLITO (1984), estudaram a influência da temperatura na germinaçãoo do pólen e no crescimento do tubo polinico em amendoeira e em pessegueiro e concluiram que a primeira inicia a germinação a temperaturas mais baixas que o segundo, apesar de serem espécies muito próximas. De igual modo, o óptimo de germinação observado por aqueles autores, situa-se a 15°C para a amendoeira e a 22°C para o pessegueiro.

No entanto e ainda de acordo com WEINBAUM, PARFITT e POLITO (1984), as diferenças entre espécies parecem ser bem mais importantes que as existentes entre variedades, mesmo quando se trata de cultivares com grandes diferenças no que respeita às exigências de frio. Daí que hoje a incorporação desta caracteristica, por vezes apenas existente em algumas formas selvagens de certas espécies, em cultivares de interesse agronómico, se revista de particular interessse no melhoramento vegetal, pois pode possibilitar um melhor comportamento destas em condições adversas de clima, diminuindo o risco de improdutividade.

Como se observa pelo quadro 5.5 a germinação do pólen a 5°C foi bastante baixa, tanto para os três clones de 'R. Claudia Verde', como para as variedades polinizadoras testadas. No entanto, ainda que sem ser significativo a 'Stanley' é a que melhor se comporta.

Os nossos resultados estão de acordo com os de outros autores, nomeadamente JEFFERIES (1980) e LEE (1980) que também observaram uma muito baixa germinação do pólen de ameixeira europeia a temperaturas de 5°C. KEULEMANS (1984) no entanto, observou em diversas variedades do norte da Europa germinação do pólen a 4°C que chegou aos 15% para a 'Queen Victoria' por exemplo.

	TEMPO	2	5	8	12	24	36 (horas)
5°C	Stanley					0.9	
	P UE 6						
	P UE 10						0.6
	P UE 11						1.4
	P UE 45						0.7
10°C	Stanley		4.2				
	P UE 6			3.3			
	P UE 10		0.9				
	P UE 11		3.1				
	P UE 45		0.9				
15°C	Stanley		18.4				
	P UE 6		5.0				
	P UE 10	2.5					
	P UE 11		16.4				
	P UE 45		4.3				
20°C	Stanley	4.2					
	P UE 6	3.5					
	P UE 10	5.8					
	P UE 11	11.8					
	P UE 45	13.6					

Quadro 5.5 -Primeira observação em que se registou pólen germinado, para as várias temperaturas e clones e respectivas percentagens de germinação.

Se, como sugerem ZAMIR et al (1981 e 1982, referidos por WEINBAUM, PARFITT e POLITO, 1984), os genes responsáveis pela tolerância às baixas temperaturas, presentes no esporófito, se podem expressar também no próprio pólen haploide, através da sua germinação, é de supor que em função da pressão causada pelo clima da região assim se faça a inclusão mais ou menos rápida desta caracteristica no património genético das variedades. Seria assim possivel explicar que nas condições de cultura da 'R. Claudia Verde' no Alentejo e com o método de propagação utilizado, os clones existentes não possuam em elevado grau esta caracteristica, devido ás normalmente boas condições climáticas durante a floração da cultivar nesta região. As diferenças observadas entre a cultivar 'Stanley' que regista o mais elevado valor, a cultivar regional P UE 6 onde não se observou qualquer germinação e o comportamento intermédio da 'R. Claudia Verde' podem também compreender-se à luz desta teoria.

HERRERO e JOHNSON (1980) em trabalho sobre a tolerância às altas temperaturas, referem também que o comportamento do pólen às diferentes temperaturas, tanto baixas como altas, poderá ser controlado genéticamente.

	Stanley	P UE 6	P UE 10	P UE 11	P UE 45	média
5°	6.3 klmno	0.0 o	1.1 no	3.4 lmno	1.3 mno	2.4 e
10°	16.3 hijkl	13.6 jklmn	9.9 jklmno	14.5 ijklm	9.5 jklmno	12.8 d
15°	41.2 bc	21.5 efghij	29.0 cdefgh	40.0 bcd	63.8 a	39.1 a
20°	28.6 cdefgh	27.4 defghi	30.0 cdefg	64.7 a	39.3 bcd	38.0 a
25°	21.4 efghij	35.3 bcd	14.9 ijkl	46.1 b	31.5 cdef	29.9 b
30°	18.1 ghijk	21.5 efghij	12.5 jklmno	33.1 bcde	18.8 fghijk	20.8 c
méd.	22.0 c	19.9 cd	16.2 d	33.64 a	27.4 b	

Quadro 5.6 -Médias da percentagem de germinação do pólen ao fim de 48 h, para variedades x temperaturas - ano de 1989. Os valores seguidos das mesmas letras não diferem significativamente para p< 0.05, segundo o teste de TUKEY.

O inicio de germinação do pólen é acelerado com o aumento da temperatura, assim como o numero de grãos que iniciam essa mesma germinação. Desta forma, enquanto para 5°C são precisas 24 h na 'Stanley' e 36 h na 'R. Claudia Verde' para se iniciar a germinação, a 10°C e 15°C bastam apenas 5 h e a 20°C já ao fim de 2h se observam grãos germinados (Quadro 5.5).

Analisando os valores finais médios da percentagem de germinação registados ao fim de 48 horas de incubação, podemos ver através da análise de variância (Anexo 12), a existência de diferenças significativas tanto entre clones (F=49.6, para p=95%), como entre temperaturas (F=188.9, para

p=95%), sendo no entanto bem mais evidentes as diferenças entre temperaturas do que as observadas entre variedades. A interacção entre os dois factores é também significativa (F=15.8, para p=95%), indicando diferentes comportamentos nos clones para as mesmas temperaturas.

As temperaturas de 5 e 10°C são para todas as variedades as que permitem uma mais baixa germinação. No entanto ainda que sem ser significativo, o pólen de 'Stanley' é o que germina melhor, atingindo valores superiores a 16%.

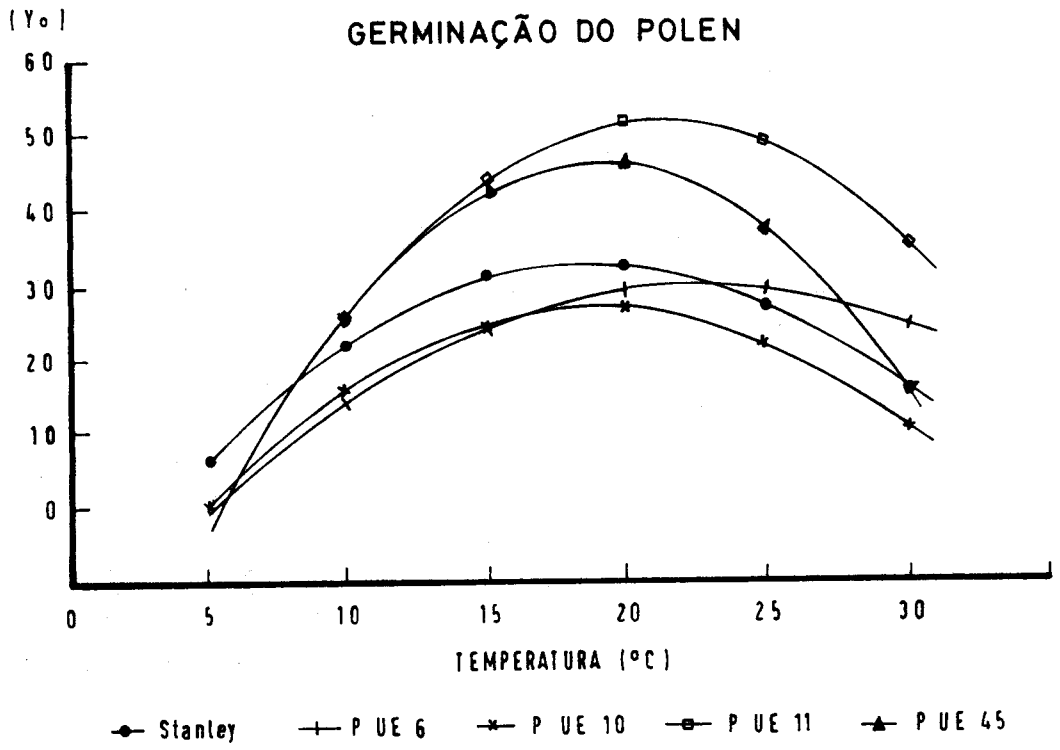


Fig.5.9 -Influência da temperatura na germinação do pólen "in vitro" (curva ajustada para os valores médios observados após 48 horas).

Os óptimos de germinação não variando entre clones de 'R. Claudia Verde', são no entanto diferentes dos observados para as cultivares 'Stanley' e P UE 6. Enquanto que aqueles com excepção do P UE 45, têm o óptimo de germinação a 20°C, a 'Stanley' regista o maior índice de viabilidade a 15° e a P UE 6 a 25°C. O comportamento divergente da P UE 45 é mais aparente do que real, pois como se pode ver pelas curvas ajustadas em função da temperatura (Fig. 5.9), o pico observado pouco difere dos restantes clones.

Tal como o referido por WEINBAUM, PARFITT e POLITO (1984) também se observou que o óptimo de germinação para um determinado clone ou variedade, se situa a uma temperatura tanto mais elevada quanto maior é a temperatura de inicio de germinação. Assim, como se observa pelo gráfico da fig. 5.9, a 'Stanley' é a que atinge o óptimo a temperatura mais baixa, cerca de 18°C, enquanto a P UE 6 apenas o atinge aos 23°C, valores da curva ajustada. Mesmo assim, o óptimo de germinação observado para a 'Stanley' é superior ao referido por KEULEMANS (1984) que observou cerca de 34% de germinação a 15°C.

Os óptimos de germinação situam-se para os clones P UE 10, P UE 11 e P UE 45 e de acordo com as curvas calculadas, respectivamente a 19, 21 e 19°C. Estes resultados podem considerar-se normais, comparando-os com os referidos na bibliografia para o género Prunus (WEINBAUM, PARFITT e POLITO, 1984).

A 30°C a percentagem de germinação reduz-se para todas os clones, embora apenas de forma significativa relativamente a 25°C para o P UE 6. A esta temperatura observa-se em geral uma muito rápida germinação, mas grande parte dos tubos degradam-se ao fim de algumas horas. Note-se que temperaturas de 30°C ocorrem por vezes no Alentejo, durante o período da floração (Gráfico 4.6).

O clone P UE 11 é não só o que regista uma mais elevada percentagem de germinação para a maior parte das temperaturas, como aquele que apresenta uma significativa tendência para uma viabilidade mais elevada, principalmente às temperaturas a partir de 15°C (Fig. 5.9).

O ajustamento dos valores médios de germinação efectuado para as diversas temperaturas, em função do tempo de incubação, permitiu calcular as curvas logisticas que se apresentam nas Figs. 5.10 a 5.14. Embora neste tipo de análise, se procure em geral a equação que melhor explique o mecanismo em causa (LANDSBERG, 1977), sacrificando embora um melhor ajustamento para alguns tratamentos, preferimos escolher neste caso particular, a equação que melhor se ajustasse aos valores realmente observados. De facto, dado o elevado numero de factores que interferem no processo de germinação do pólen "in vitro" e no crescimento do tubo polinico, qualquer tentativa de generalização da equação para todas as temperaturas e clones acabaria por ser tão subjectiva, que dificultaria quanto a nós, ainda mais a análise dos resultados.

Numa abordagem geral das curvas de regressão, verifica-se desde logo que a temperatura de 10°C é claramente limitante à germinação do pólen, enquanto que a 25° e 30° o numero de grãos germinados cresce muito rápidamente, mas acaba depressa por estabilizar. É às temperaturas de 15° e 20°C que o potencial de germinação de cada variedade parece poder expressar-se mais à vontade. É sobretudo a 15° que o declive das curvas é maior, havendo para a maior parte dos clones um constante aumento de grãos germinados até às 36 h de incubação.

Para alguns dos autores consultados (REMY, 1953; NSEIR, 1969), a observação da germinação do pólen "in vitro" 6 horas depois da incubação a 20°C, é suficiente para registar a capacidade definitiva de germinação do pólen. Também MARQUES DE ALMEIDA (1945) refere que a 22°C, os grãos de pólen de amendoeira não germinados ao fim de três horas, são definitivamente estéreis. No ensaio por nós efectuado pudemos observar no entanto que mesmo a 20°C são necessárias pelo menos 12 horas para se atingir um valor de germinação próxima da definitiva. Este retardamento da germinação, pode estar relacionado com a dificuldade de hidratação dos grãos, devido à baixa humidade das câmaras como veremos mais adiante.

O menor tempo de incubação pode assim ter constituido o principal responsável, das diferenças observadas entre o ensaio de temperaturas efectuado nas câmaras de

crescimento e os valores da germinação observados à temperatura do laboratório para o P UE 11 em 1989.

O aumento na percentagem de germinação é sobretudo elevado durante as primeiras doze horas de incubação, em que se verifica um crescimento exponencial, sendo os acréscimos a partir desse período diferentes entre clones e temperaturas.

A temperatura de 10°C apenas a cultivar 'Stanley' apresenta um aumento de germinação exponêncial, tendo todas as outras um aumento mais ou menos constante de pequeno declive, indicando uma clara insuficiência de temperatura. O clone P UE 11 de 'R. Claudia Verde' e a polinizadora regional P UE 6 apresentam um comportamento idêntico.

Tal como NSEIR (1969) observou para a cerejeira, a diferença de germinação de 10 para 15°C é muito acentuada; no entanto a capacidade de germinação a baixas temperaturas é muito mais baixa que a observada por aquele autor para a cerejeira.

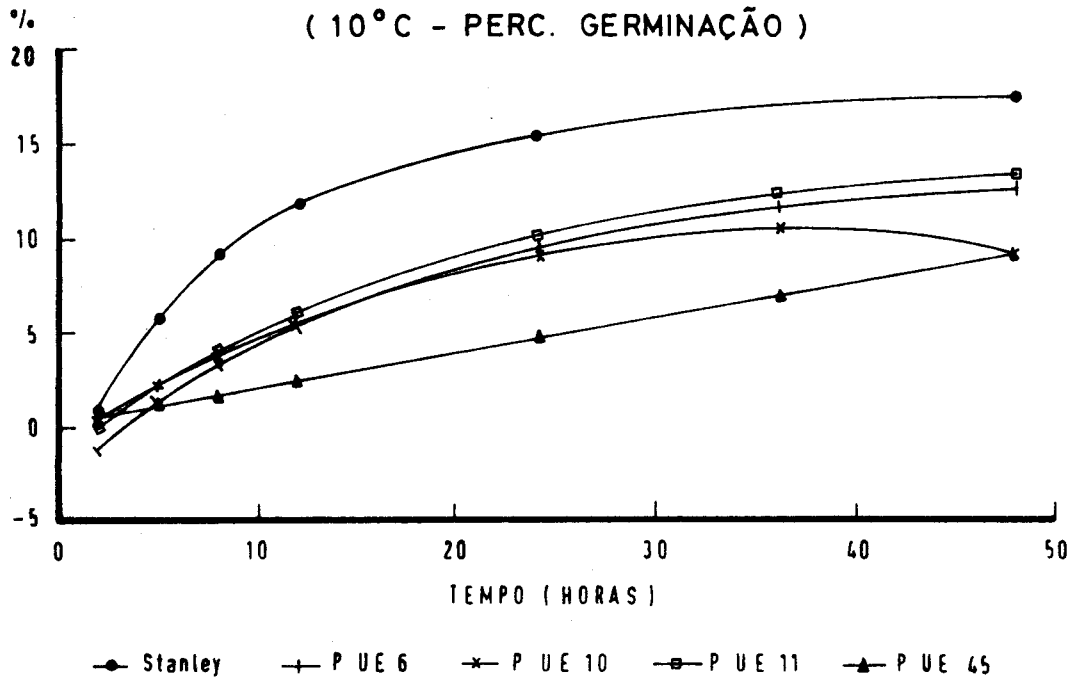


Fig. 5.10 -Curvas de crescimento do pólen "in vitro" ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 10°C.

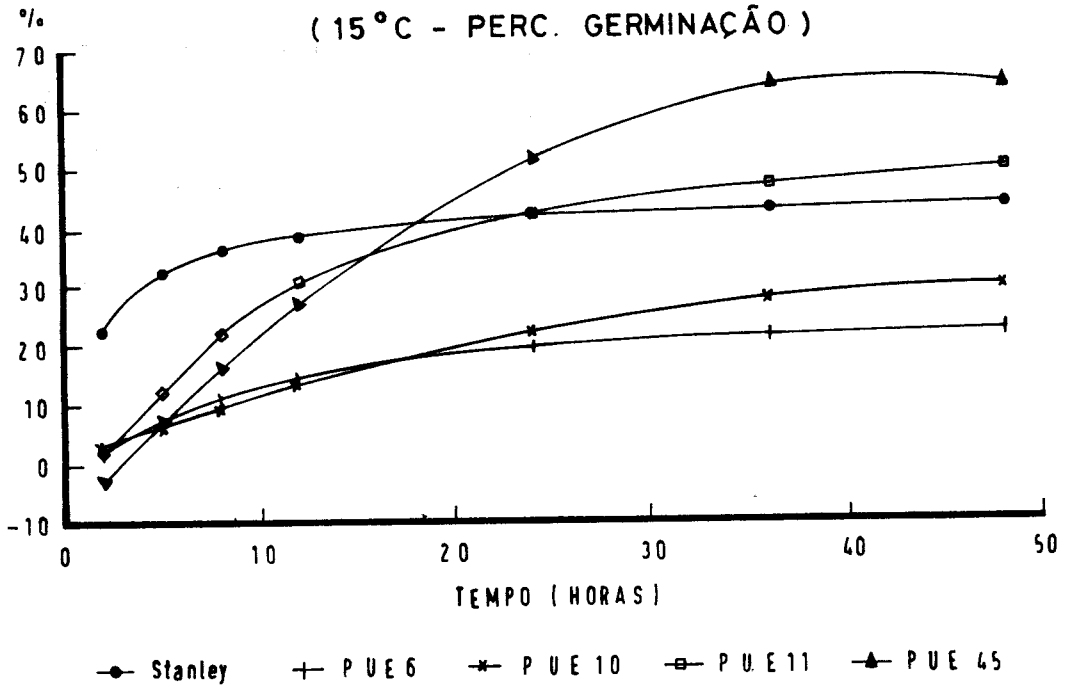


Fig. 5.11 -Curvas de crescimento do pólen "in vitro" ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 15°C.

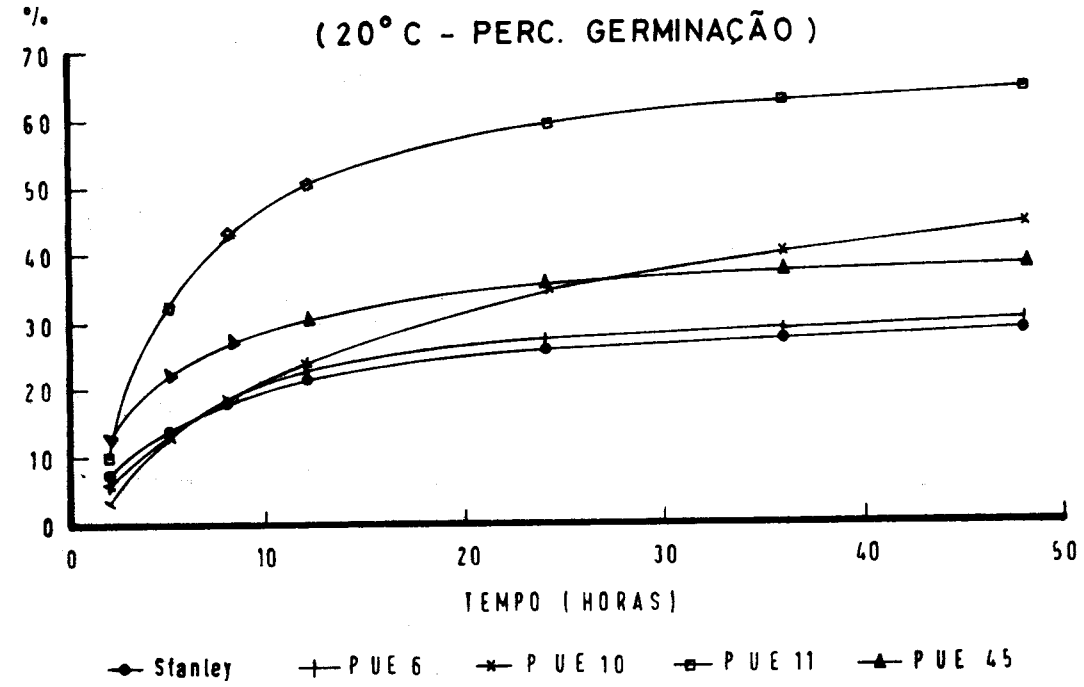


Fig. 5.12 -Curvas de crescimento do pólen "in vitro" ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 20°C.

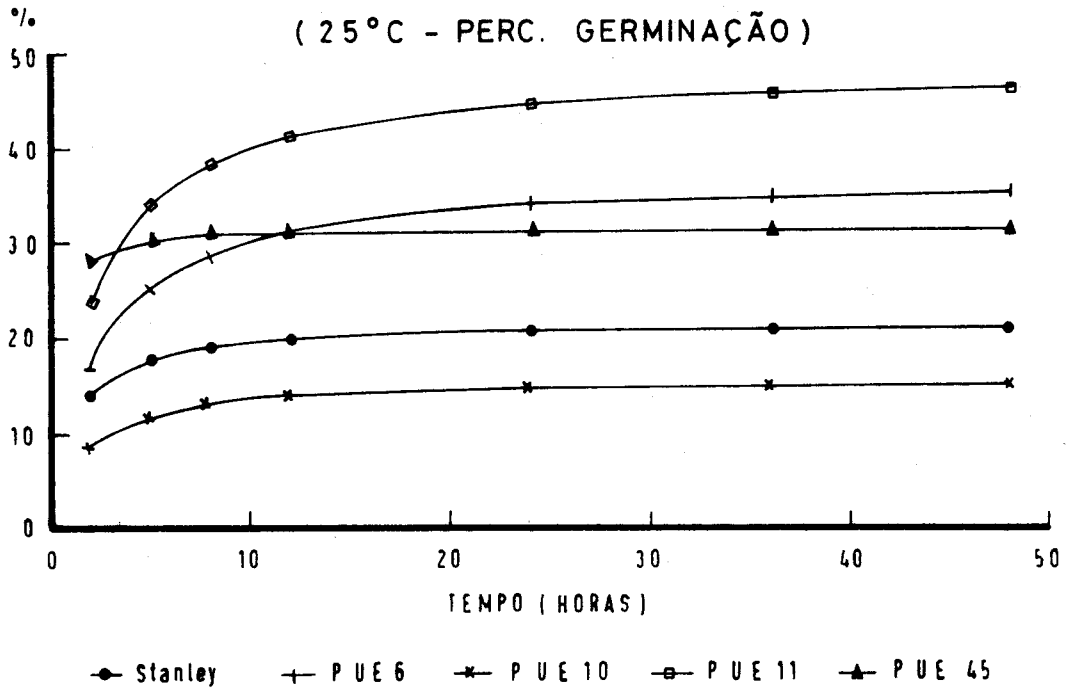


Fig. 5.13 -Curvas de crescimento do pólen "in vitro" ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 25°C.

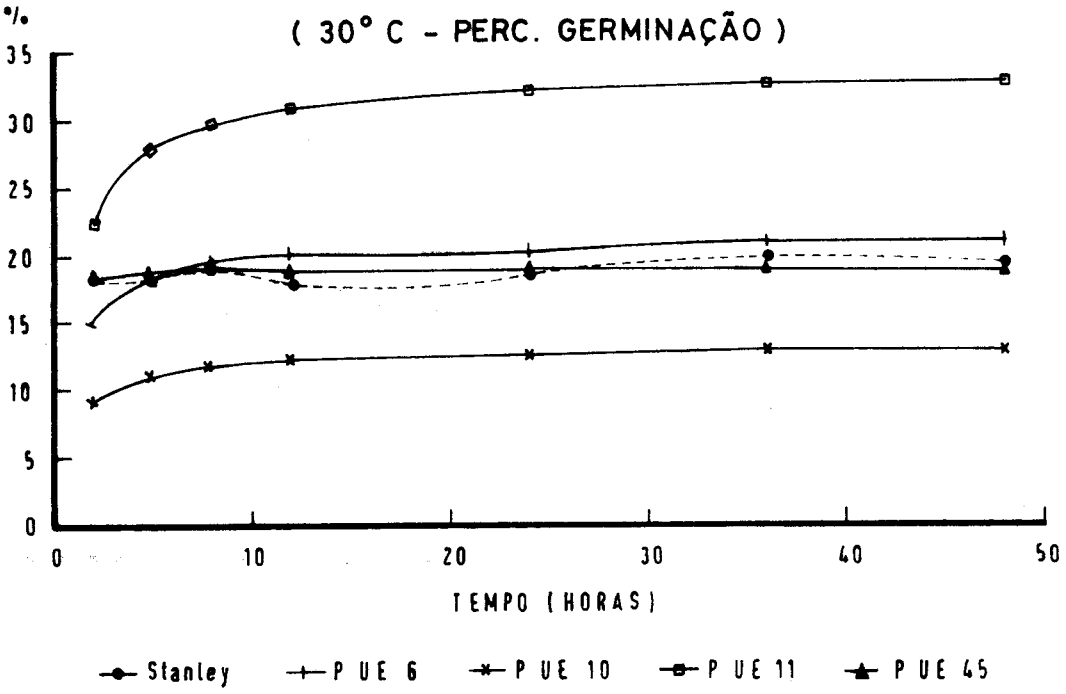


Fig. 5.14 -Curvas de crescimento do pólen "in vitro" ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 30°C. (a curva a tracejado indica apenas a média observada)

A cultivar 'Stanley' apresenta um comportamento bem distinto dos restantes clones. A excepcional capacidade de germinação a temperaturas baixas manifesta-se muito cedo, sendo a unica que apresenta um comportamento exponencial inicial logo a 10 e 15°C. Em contrapartida é a que parece mais negativamente afectada nas temperaturas de 25 e 30°C. Em todas as temperaturas no entanto, o pólen desta cultivar parece atingir rápidamente o seu máximo potencial de germinação, apresentando uma elevada energia germinativa.

Tentando uma explicação em termos de adaptação climática das cultivares, para os óptimos de germinação observados, poderiamos justificar o bom comportamento da 'Stanley' a temperaturas mais baixas em virtude de ser uma cultivar, cujos progenitores ('Prune d'Ente' e 'Grand Duke') são cultivares de regiões mais setentrionais, portanto de Primavera mais fria. Em contrapartida, a polinizadora regional P UE 6, muito provavelmente originada do cruzamento da 'R. Claudia Verde' com a *P. insititia* da região, reflectiria a boa adaptação desta ultima às condições quentes da nossa Primavera.

Os clones de 'R. Claudia Verde' manifestam dois comportamentos bem distintos: às temperaturas mais baixas de 10, 15 e 20°C, verifica-se um aumento de grãos germinados semelhante entre clones nas primeiras doze horas, sendo o diferente potencial de germinação entre eles o resultado do pólen germinado a partir desse período. Quando se observam as curvas nas temperaturas de 25 e 30°C, as diferenças entre cultivares surgem logo de inicio, ainda que no final não sejam tão expressivas. Parece evidente que quanto mais elevada é a temperatura, mais depressa se revelam as diferenças interclonais.

Em contrapartida, observa-se que as diferenças entre clones se atenuam à medida que a temperatura se afasta do óptimo. Também POLITO e WEINBAUM (1988), em pólen de nogueira e Kiwi observaram que tanto as diferenças interclonais como intraclonais se atenuavam, quer abaixo quer acima do óptimo de germinação.

O comportamento das curvas de percentagem de germinação parece indicar para temperaturas até 15°C uma certa

capacidade de novos grãos iniciarem a sua germinação que não se verifica às temperaturas mais altas de 20, 25 e 30°C. Esta incapacidade para elevar o indice de germinação é progressiva com o aumento de temperatura e varia com as cultivares. Por exemplo, a 'Stanley' atinge logo a 15°C essa incapacidade, enquanto que a P UE 11 só a 25°C parece sofrer o mesmo fenómeno.

A explicação está quanto a nós na maior ou menor dificuldade de hidratação do pólen, necessária à sua germinação. Segundo POLITO e LUZA (1988), um importante factor da germinação "in vitro" é a capacidade do meio artificial permitir a rehidratação do grão de pólen. A mais elevada temperatura associada à dificuldade das câmaras utilizadas manterem a mesma humidade relativa, implica um maior dessecamento ao nível da superficie do agar e pode ter contribuido para os resultados observados.

Quando da colocação do grão de pólen no meio de germinação, verifica-se um derrame de nutrientes do grão de pólen. Segundo SIMON (1974, referido por POLITO e WEINBAUM, 1988) a exposição do pólen a temperaturas abaixo ou acima do optimo, podem acentuar essa perda de aminoácidos, acucares e mesmo proteinas, reduzindo a sua viabilidade.

5.3.4 -Influência da temperatura no crescimento do tubo polinico

Segundo STANLEY e LINSKENS (1974) os meios de germinação estão longe de fornecer as óptimas condições para o crescimento do tubo polinico, sendo a sua paragem antecipada uma prova evidente disso. Para NSEIR (1969) o tubo polinico, após um rápido crescimento em que utiliza as reservas do próprio grão, entra numa fase de menor crescimento, mas que ainda é possivel devido à absorção e metabolização do açucar existente no meio de cultura. No entanto, acaba por parar por completo, devido à carência de outras substâncias que existem no estilete, mas que em geral estão ausentes do meio de cultura.

Apesar do meio artificial não permitir um crescimento do tubo durante muito tempo, possibilita no entanto a

observação do vigor inicial do fenómeno independentemente do factor estilete, constituindo a melhor forma de estudar o comportamento de cada cultivar Vs temperatura.

KEULEMANS (1980) entre outros, é de opinião que a influência da temperatura sobre o crescimento do tubo polinico, é muito diferente entre cultivares e pode ser um dos principais responsáveis pela maior sensibilidade de algumas destas a certas condições climáticas.

Analisando o comprimento final do tubo polinico medido ao fim das 48 h de incubação (Quadro 5.7), observámos que em geral para todos os clones, os maiores comprimentos respeitam às temperaturas de 15, 20 e 25°C, que diferem significativamente tanto das temperaturas mais baixas, 5 e 10°C, como das mais altas, 30°C. Registe-se no entanto que no caso da 'Stanley' o óptimo de crescimento é atingido a 15°C, enquanto que na P UE 6 é atingido a 25 e 30°C, situações de excepção em relação a todos os outros clones cujo máximo comprimento do tubo se regista à temperatura de 20°C. O comportamento diferenciado daqueles duas cultivares está positivamente correlacionado com o parâmetro percentagem de germinação, que como já vimos, tendia também a ser mais elevada na 'Stanley' para a temperatura de 15°C e para a P UE 6 a 25°C.

	Stanley	P UE 6	P UE 10	P UE 11	P UE 45	média
5°	182 kln	0 n	93 hn	156 lmn	44 mn	95 e
10°	453 ghi	409 hij	453 ghi	329 ijk	271 jkl	383 d
15°	649 de	551 efgh	618 ef	796 bcd	707 cde	664 b
20°	600 efg	560 efgh	613 efg	1008 a	893 ab	735 a
25°	591 efg	622 ef	484 fghi	840 bc	796 bcd	667 b
30°	569 efgh	627 ef	382 ij	422 hij	422 hij	484 c
méd.	507 bc	461 cd	440 d	592 a	522 b	

Quadro 5.7 -Comprimento do tubo polinico (µm) ao fim de 48h para clones x temperaturas. (Os valores seguidos das mesmas letras não diferem significativamente para $p < 0.05$, segundo o teste de TUKEY.

As curvas ajustadas da fig 5. 15 todas significativas, mostram que apenas a P UE 6 tem o óptimo de crescimento superior a todas as outras, situando-se este em geral nos 20°C.

A correspondência entre os óptimos de temperatura para a germinação do pólen e para o crescimento do tubo polinico por nós observada, não é no entanto fácil de explicar, pois que em principio nenhuma relação directa parece haver entre ambos os fenómenos, sendo as bases fisiológica e celular que os comamdam, bastante distintas. Enquanto os factores responsáveis pela germinação têm mais a ver com a integridade da membrana na altura de hidratação, no crescimento do tubo actuam mais os factores relacionados com o metabolismo no processo de alongamento celular.

Em estudos realizados com pólen de amendoeira e pessegueiro, WEINBAUM, PARFITT e POLITO (1984) concluiram que as diferenças existentes entre as duas espécies ao nível

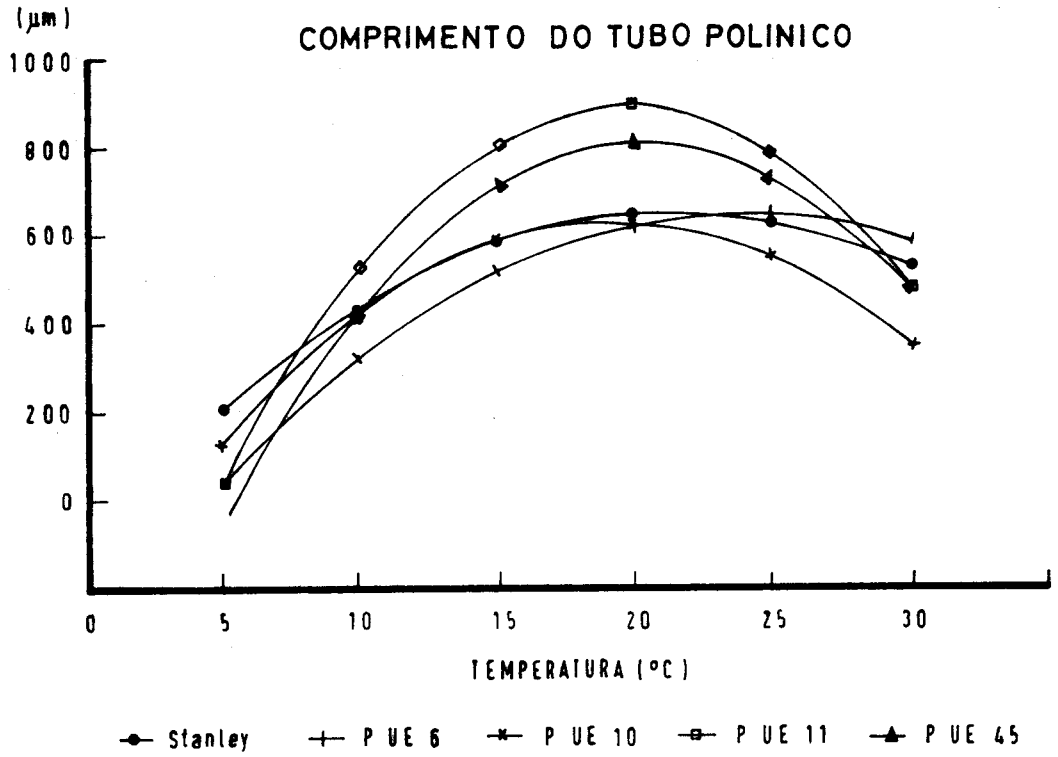


Fig.5.15 -Influência da temperatura no comprimento do tubo polinico "in vitro". (Curvas ajustadas para os valores médios observados após 48 horas.)

da germinação "in vitro" não tinham correspondência ao nivel do crescimento do tubo, sendo mesmo diferentes as temperaturas óptimas para os dois fenómenos: 5 a 8°C superior para o crescimento que para a germinação.

Comparando os valores da percentagem de germinação com os do comprimento do tubo polinico por nós observados, podemos constatar uma elevada e significativa correlação de + 0.76, indicando haver uma relação entre os dois fenómenos. No entanto também BASSI et al (1978) observaram em diversas cultivares de pessegueiro, uma correlação positiva entre a percentagem de germinação e o comprimento do tubo polinico.

Numa primeira análise das curvas que representam o crescimento do tubo polinico, podemos observar dois grupos de cultivares: a 'Stanley' e a P UE 6 cujas curvas embora com gradientes diferentes, tendem a aproximar-se no final, parecendo indicar um certo potencial máximo de crescimento; e os restantes clones, sobretudo o P UE 11 e o P UE 45, em que pelo contrário não é possivel distinguir essa assimptota, para a qual as curvas se aproximam, parecendo que esse máximo é mais determinado pela temperatura do que pela cultivar em si.

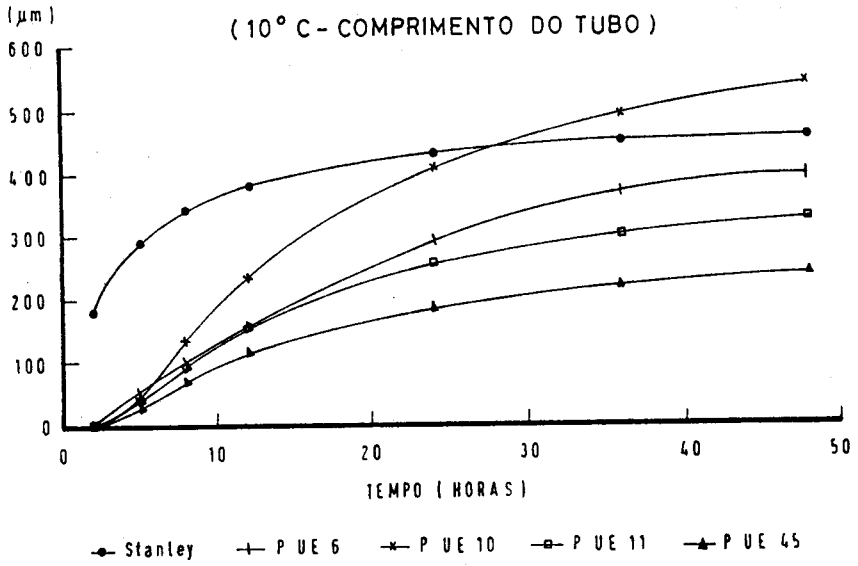


Fig. 5.16 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vitro", ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 10°C.

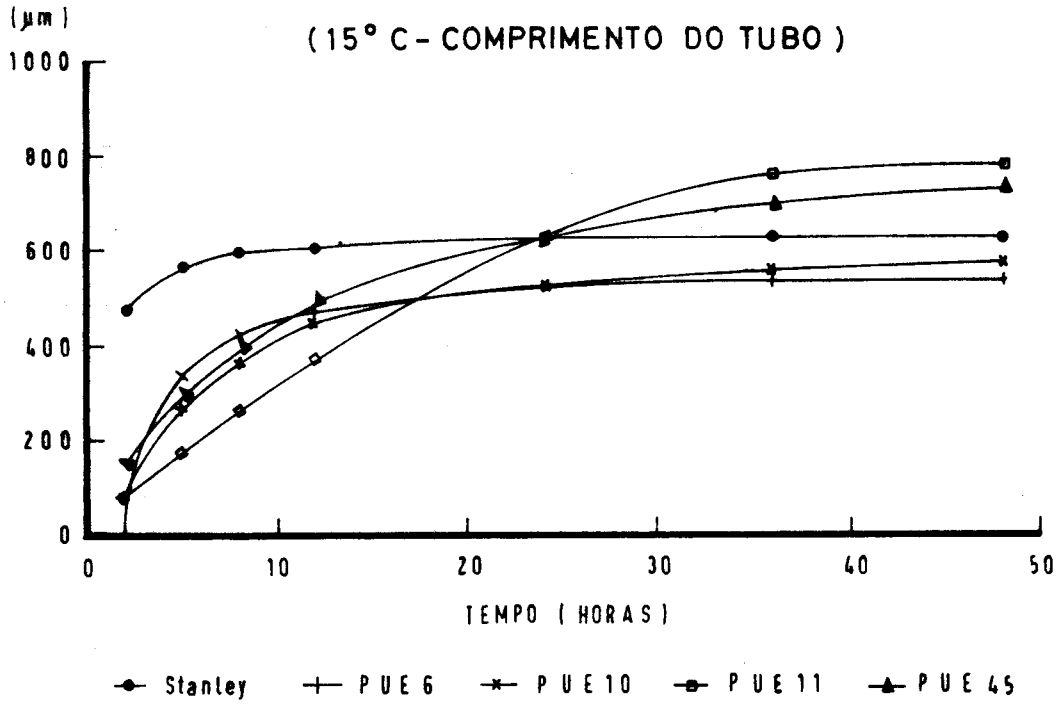


Fig. 5.17 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vitro", ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 15°C.

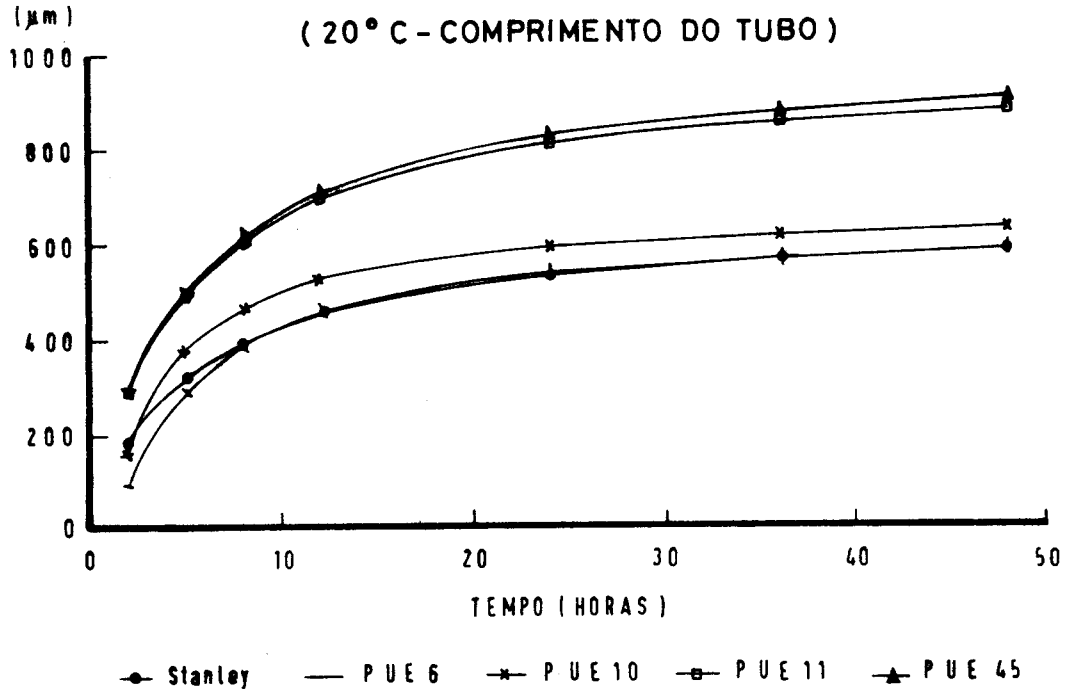


Fig. 5.18 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vitro", ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 20°C.

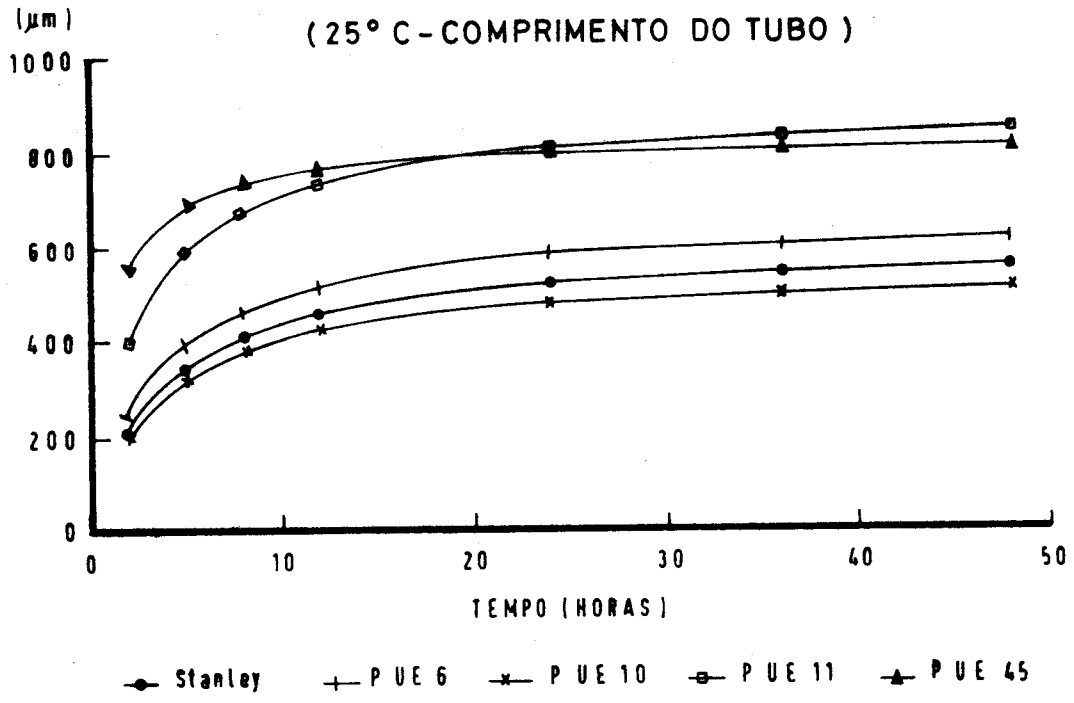


Fig. 5.19 -Curvas de crescimento do tubo polínico "in vitro", ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 25°C.

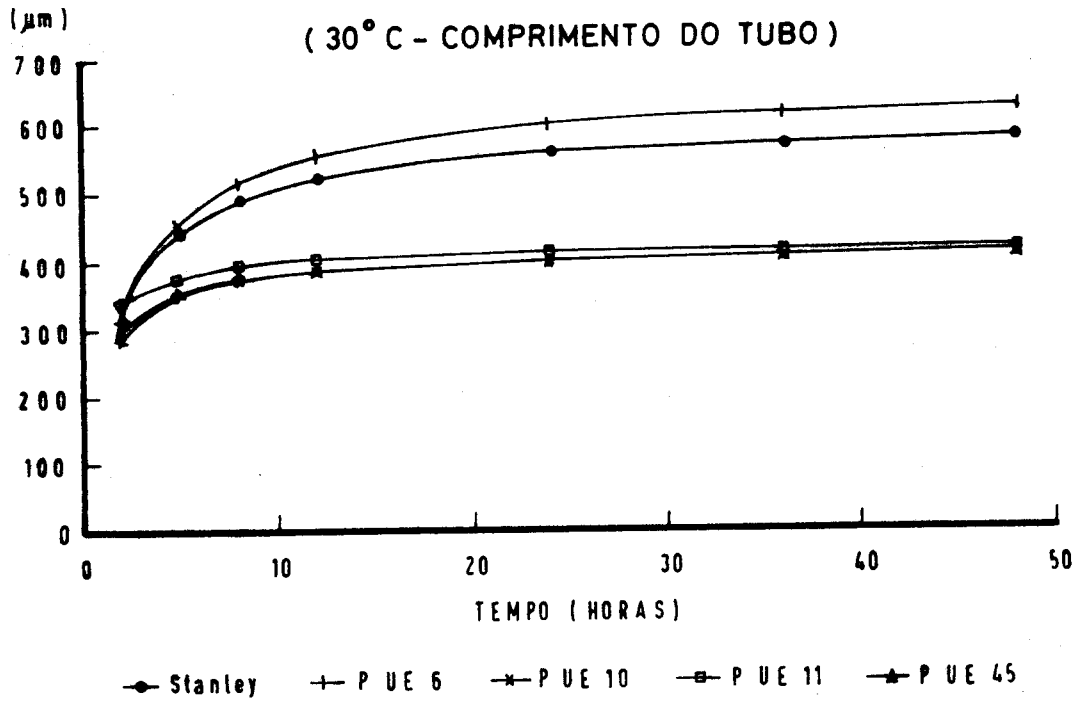


Fig. 5.20 -Curvas de crescimento do tubo polínico "in vitro", ajustadas para as médias dos valores observados nos diversos clones, à temperatura de 30°C.

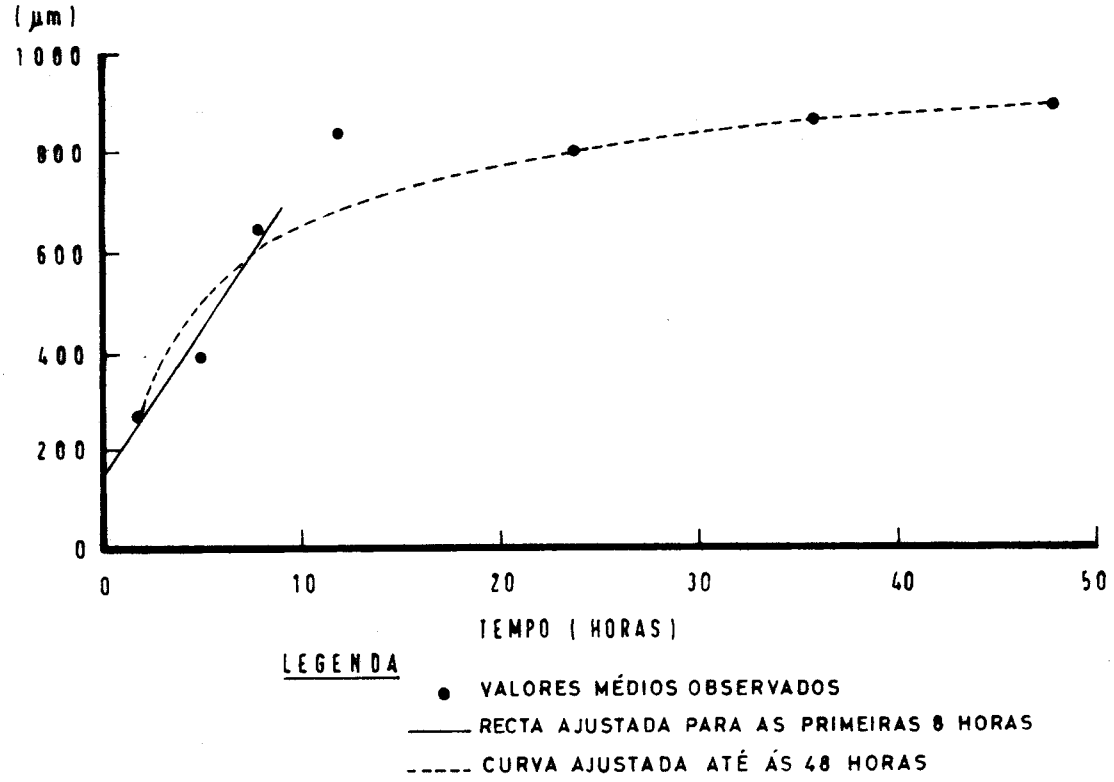


Fig. 5.21 -Exemplo do ajustamento de uma curva para todas as observações e de uma recta para as primeiras 8 horas de crescimento.

Em relação ao crescimento do tubo, durante as horas de incubação, observa-se para as temperaturas superiores a 15°C em geral um rápido crescimento até às 12 horas, seguido de um período de pouco ou nulo crescimento. Constituem excepção a P UE 11 e P UE 45, que a 15°C mantêm um crescimento até às 48 horas o primeiro e até às 36 h o segundo.

Com a finalidade de comparar a taxa de crescimento inicial do tubo polinico, nos diversos clones e cultivares, efectuámos o ajustamento de uma equação linear para as primeiras 8 horas como se indica na fig. 5.21.

Comparando os índices de regressão das equações lineares (Quadro 5. 8) e os respectivos intervalos de confiança, podemos ver que apesar de diferentes sobretudo entre

temperaturas, essas diferenças não se podem considerar mesmo assim significativas.

A temperatura de 10°C todas as cultivares, exceptuando a 'Stanley', têm um crescimento inicial muito lento, aproximando-se as suas curvas de uma sigmoide. As nossas observações, por não terem sido realizadas depois das 48 h, não permitem saber se o crescimento continuaria para além daquele período. No entanto, tudo indica que sim dado o máximo de comprimento não ter sido atingido (Fig. 5.16).

temperat.	variedade	valor de b	dif. signif.	r2
10°C	Stanley	39.18	b c	0.93
	P UE 6	17.00	a b	0.66
	P UE 10	19.86	a b	0.84
	P UE 11	14.29	a b	0.90
	P UE 45	10.61	a	0.94
15°C	Stanley	78.37	b c	0.93
	P UE 6	60.14	b c	0.89
	P UE 10	45.99	b	0.99
	P UE 11	43.81	b c	0.94
	P UE 45	47.07	b c	0.93
20°C	Stanley	62.04	b c	0.98
	P UE 6	52.99	b	0.99
	P UE 10	60.14	b c	0.98
	P UE 11	74.29	b c	0.95
	P UE 45	90.07	b c	0.90
25°C	Stanley	53.61	b c	0.91
	P UE 6	56.18	b c	0.94
	P UE 10	59.32	b c	0.99
	P UE 11	94.97	c	0.96
	P UE 45	90.61	b c	0.89
30°C	Stanley	68.84	b c	0.95
	P UE 6	71.56	b c	0.97
	P UE 10	47.62	b c	0.92
	P UE 11	51.16	a b c	0.81
	P UE 45	47.35	a b c	0.67

Quadro 5.8 -índices de regressão das equações lineares, ajustadas para o crescimento inicial do tubo polinico "in vitro". Valores seguidos das mesmas letras não diferem significativamente para $p < 0.05$, segundo o teste T de Student.

Tal como KEULEMANS (1984) já tinha observado, verifica-se que as maiores diferenças entre cultivares, surgem para as temperaturas mais baixas, sobretudo a 10°C. Nas temperaturas mais altas essa diferenças reduzem-se, registando-se mesmo para 30°C um comportamento dos clones de 'R. Claudia Verde' quase práticamente uniforme.

Sendo a unica cultivar que tem um rápido crescimento logo nas primeiras horas a 10°C, bem como uma das que também mais rápido cresce a 15°C, a cultivar 'Stanley' parece confirmar o facto de se encontar particularmente bem adaptada às temperaturas mais baixas dos climas frios.

Enquanto a 10 e 15°C o crescimento se mantêm até às 36 h para a generalidade dos clones, nas restantes temperaturas o crescimento tende a parar muito cedo, por volta das 12 h, não se registando a partir daí crescimentos significativos.

Na generalidade, verifica-se que de facto o meio artificial constitui um limite ao crescimento do tubo. Esse limite que difere com as cultivares, é atingido tanto mais depressa quanto mais elevada é a temperatura. A temperatura de 30° parece porém uma excepção, não permitindo sequer que o tubo atinga esse limite potencial. A P UE 6 é a cultivar que mais mantem o seu potencial de crescimento em todas as temperaturas, cerca de 600 µm, inclusivé a 30°C.

Um explicação possivel para o comportamento aparentemente anómalo do crescimento do tubo a 30°C é a redução da humidade relativa nas câmaras de crescimento, a esta temperatura. De facto, é referido na bibliografia que a humidade do ambiente à superficie do agar, pode constituir uma séria limitação ao crescimento do tubo.

Segundo alguns autores (VISSER, 1955; NSEIR, 1969) a curva de crescimento do tubo polinico é do tipo sigmoide, caracteristica de grande parte dos fenómenos biológicos, variando a velocidade de crescimento com o tempo. Nas nossas observações a tendência para sigmoide só aparece para as temperaturas de 10 e 15°C e não é para todas as cultivares. Por exemplo a 'Stanley' apresenta logo a 10°C um crescimento inicial do tipo exponencial.

A explicação para este comportamento das curvas pode no entanto ter a ver apenas com a altura das observações. Como a primeira observação foi efectuada apenas passadas duas horas, nas temperaturas mais elevadas o crescimento inicial mais lento pode ter ficado mascarado.

O estudo de germinação do pólen "in vitro" permite-nos concluir que:

a)- a temperatura é de facto um elemento determinante na expressão da viabilidade do pólen, tanto no que respeita à percentagem de germinação, como em relação ao comprimento do tubo polinico emitido, existindo mesmo uma correlação positiva entre os dois parâmetros.

b)- a germinação do pólen dos clones de 'R. Claudia Verde' é relativamente elevada, mesmo acima de outras cultivares conhecidas como bastante férteis, como a 'Stanley' por exemplo, não podendo imputar-se a este factor qualquer parte da responsabilidade do baixo índice de vingamento dos pomares da região.

c)- o comportamento da germinação do pólen parece traduzir um certo grau de adaptação do material vegetal às condições meridionais da região, revelando uma reduzida tolerância às baixas temperaturas, sobretudo abaixo de 10°C.

5.4 -Estudos realizados com os pistilos no laboratório

5.4.1 -Fluorescência da calose. Dificuldades encontradas.

A acumulação de calose ao longo do tubo polinico, assim como nos grãos de pólen e óvulos em degenerescência, constitui hoje a melhor forma de observar estas estruturas, que com as técnicas clássicas, se tornavam de difícil abordagem. A forma e intensidade como esta substância aparece nos orgãos referidos, reflecte o que se passa em fenómenos essenciais como são a incompatibilidade pólen-pistilo, viabilidade do estigma, dos óvulos e do pólen. Mesmo nas combinações compativeis a observação da calose através da sua fluorescência possibilita a quantificação do crescimento do tubo polinico, bem como do numero de tubos presentes aos vários niveis do pistilo (DUMAS e KNOX, 1983).

No entanto, embora a informação disponivel sobre a observação em fluorescência proporcione uma razoável eficácia da sua aplicação, sempre que se trabalha um novo material e com equipamento diferente, surgem algumas dificuldades que é necessário resolver de imediato, de modo a tirar partido do muito tempo que os estudos de biologia floral em geral implicam.

Utilizando o método de MARTIN (1959) adaptado para a ameixeira europeia por SOULIE (1980) e CHAUVIN (1985), a observação do tubo polinico ao longo do estilete constitui um método fácil que pode ser de grande utilidade neste tipo de estudos.

Como já referia CHAUVIN (1985) a maior dificuldade reside na escolha dos tempos de amolecimento e lavagem em função da espessura dos pistilos. Quando se trabalha uma grande quantidade de material como foi o nosso caso, cerca de 500 pistilos cada ano, não é possivel separar dentro de cada amostra os pistilos de diferentes espessuras, para um tempo diferente de hidrólise no hidróxido de sódio. Deste modo, os mais finos ficam excessivamente moles, tornando-se opacos à fluorescência, enquanto os mais grossos, demasiado duros, não permitem um bom esmagamento entre lâmina e lamela. A melhor solução para este problema é, quando da castração e polinização, escolher pistilos o mais semelhantes possivel.

Uma outra dificuldade encontrada diz respeito ao esmagamento uniforme de todo o pistilo. Em geral no ultimo terço do estilete o esmagamento torna-se dificil devido à maior espessura do ovário. Se o esmagamento deste ultimo é forçado, pode fazer rebentar os óvulos. No nosso caso optámos por fazer um pequeno corte longitudinal no tecido do ovário, de modo a facilitar o esmagamento uniforme de todo o pistilo.

SOULIE (1980) refere o facto de ser dificil seguir os tubos polinicos no terço inferior do estilete, mas atribui o facto à confusão com a fluorescencia emitida por outros tecidos do estilete.

A lavagem que se segue ao amolecimento no hidróxido de sódio, torna-se também uma etapa problemática quando há necessidade de trabalhar um elevado numero de amostras de

cada vez. As 5 a 6 horas utilizadas por SOULIE e CHAUVIN foram em geral insuficientes para remover todos os vestigios de hidróxido de sódio dos tecidos, tendo-se utilizado um período de 8 a 10 horas conforme a quantidade de pistilos dentro de cada tubo. A completa remoção da soda é essencial para que o corante impregne posteriormente bem os tecidos.

Embora a conservação se tenha efectuado no fixador, preparando semanalmente uma quantidade de pistilos para observação na semana seguinte, a necessidade de conservação durante algumas semanas dentro do corante e no frigorifico, não levantou qualquer problema, como aliás PREIL (1970) refere.

JEFFERIES e BELCHER (1974) referem que o corante azul de anilina é por vezes insuficiente para fazer fluorescer os tubos polinicos de ameixeira. Pelo contrário, nós mesmo nas situações de plena compatibilidade onde os tubos são mais finos, observámos sempre uma nitida fluorescência dos mesmos.

A principal dificuldade com que deparámos na observação dos pistilos foi a excessiva fluorescência de outros tecidos do estilete além dos tubos polinicos. Este facto é bem evidente por exemplo na fig. 5.22. Também CHAUVIN (1985) refere que certas estruturas do estilete, nomeadamente os vasos condutores e por vezes certos fungos parasitas podem aparecer fluorescentes na preparação, confundindo o observador em relação aos verdadeiros tubos polinicos. Aquele autor aconselha a passar para luz normal onde os vasos condutores são também visiveis, ao passo que os tubos polinicos desaparecem completamente. De qualquer modo, este problema pode ser minimizado, se se fizer o acompanhamento dos tubos desde o estigma.

Segundo SOULIE (1980) a receptividade do estigma na altura da polinização pode ser avaliada posteriormente pela quantidade de grãos que fluorescem à sua superficie. Com efeito os grãos ainda não germinados à altura da fixação dos pistilos são arrastados pelo liquido fixador, não aparecendo posteriormente na observação ao microscópio (DUMAS e KNOX, 1983). Também WEINBAUM, POLITO e KESTER (1986) referem que a retenção dos grãos de pólen no estigma está dependente da sua germinação.

Nas nossas observações distinguimos duas situações: os pistilos em que não se observa qualquer grão de pólen e os pistilos em que a quantidade de grãos é pequena, mas mesmo assim dando origem a tubos polinicos. Em relação aos primeiros, que constituem poucas excepções, a razão está provávelmente ao nível da pouca ou nula receptividade do estigma quando da sua polinização. Estes pistilos foram excluidos da análise dos resultados.

Segundo VAN WENT e WILLEMSE (1984, referidos por MAESTRO e ALVAREZ, 1988) a temperatura elevada pode afectar a hidratação do pólen no estigma, através da redução da humidade relativa na atmosfera circundante. No entanto nas observações efectuadas, os pistilos sem pólen aparecem em todas as temperaturas, não parecendo estar relacionados apenas com as temperaturas altas.

A elevada temperatura do laboratório acelera bastante todo o desenvolvimento da flor, sendo por vezes dificil conseguir-se polinizar todos os pistilos na altura ideal. Em alguns deles a superficie do estigma já estava seca quando o pólen foi aplicado. Desta forma, o processo de germinação que necessita de um potencial de humidade no substracto relativamente alto (GAUDE e DUMAS, 1987), não ocorre.

Relativamente aos pistilos que apresentam apenas alguns grãos de pólen, mas em quantidade muito inferior à que foi realmente depositada sobre o estigma, a razão não pode ser a mesma, pois que alguns germinaram. MARQUES DE ALMEIDA (1945) explica este facto através da diferente permeabilidade da exina ao fluido estigmático, como resultado de alguns grãos serem provenientes de anteras ainda não deiscentes.

Porém nos tratamentos em que esta situação se observou, verficou-se existir uma elevada correlação entre o numero de grãos retidos no estigma e o grau de compatibilidade desse mesmo tratamento, parecendo haver uma prédisposição ao nível do estigma para a fixação dos grãos compativeis.

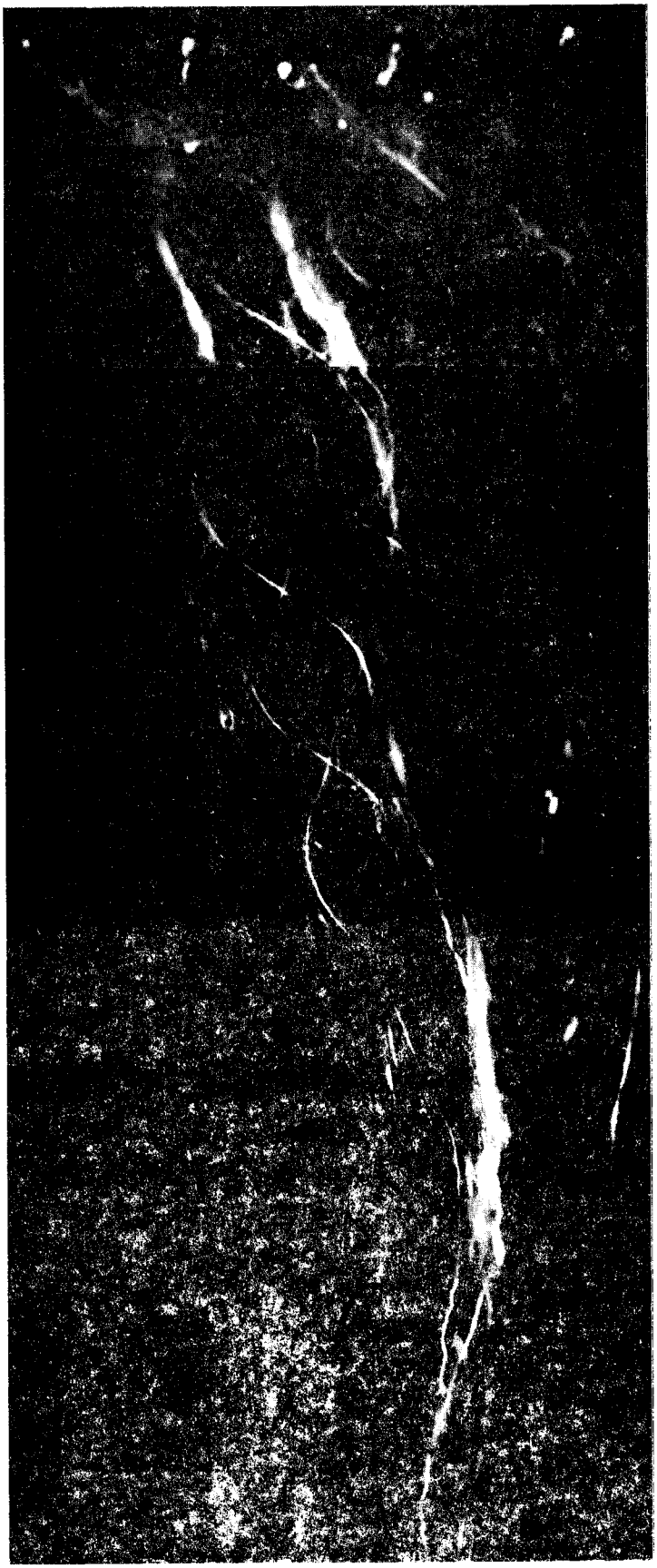


Fig. 5.22 -Observação à fluorescência de um cruzamento compativel de 'R. Claudia Verde' x 'Stanley', verificando-se a fluorescência de outros tecidos do estilete

Esta observação é contraditória com todas as referências da expressão da incompatibilidade gametófitica em ameixeira, que geralmente se expressa apenas pela paragem dos tubos polinicos na primeira metade do estilete. No entanto WEINBAUM, POLITO e KESTER (1986) observaram a mesma situação para algumas variedades de amendoeira auto-incompativeis, e notam o facto de em pessegueiro, que como se sabe é autofértil, a retenção ser muito mais elevada do que na amendoeira, auto-estéril.

Também BUNEMANN e LEE (1980) observaram diferenças entre 5 e 90% de germinação do mesmo pólen, sobre o estigma de diferentes variedades de ameixeiras.

As nossas observações no entanto, não são suficientes para apoiar a afirmação de que a fraca retenção de polén em certos tratamentos, é motivada por aquela razão. De facto, como o principal objectivo foi a observação do tubo polinico, nem sempre a preparação foi conduzida de forma a quantificar com rigor o numero de grãos sobre o estigma.

Não se pode também afastar a hipótese de em alguns pistilos a polinização ter sido deficiente, deixando uma pequena quantidade de grãos sobre o estigma. Embora a aplicação do pólen com o pincel permita deixar uma elevada quantidade de grãos, uma pequena variação nesta, acentuada pelo facto da germinação "in vivo" ser, tal como acontece "in vitro", proporcional à densidade de grãos, pode ser a explicação para alguns dos casos.

Essencial para o bom desempenho de toda a técnica, é a manutenção dos pistilos em boas condições durante o periodo de incubação. NSEIR (1969) refere que em ceregeira as necroses apareciam aos quatro dias a 20°e 27°C, enquanto que a 35°C se observavam logo ao terceiro dia.

Nos ensaios efectuados, registamos alguns problemas com a dessecação dos pistilos, sobretudo nas câmaras de temperaturas mais elevadas. A 20 e 25°C as primeiras necroses começaram a aparecer a partir do quarto dia, sendo possivel ainda conseguir recolher alguns pistilos em boas condições até aos 6 dias de incubação. Porém a partir das 48 horas a

30°C, foi muito difícil dispor de pistilos em boas condições, devido ao rápido necrosamento dos mesmos.

Para além da qualidade, a dificuldade de conservação dos pistilos durante um período mais longo poderá ter a ver com a baixa humidade relativa das câmaras de crescimento. Com efeito, dispondo apenas de controle de temperatura, estas não permitiam conservar a humidade relativa do ar para as temperaturas elevadas.

Ao nível dos tubos polínicos várias situações se observaram:

-Uma mancha de calose fina e regular sem qualquer alargamento na ponta (Fig 5.23a). Nestes casos trata-se geralmente de uma situação de compatibilidade. Mesmo em tubos ainda no início de crescimento, as situações de compatibilidade são em geral fáceis de distinguir das de incompatibilidade, devido ao facto de nestas ultimas os tubos polínicos terem um percurso mais sinuoso (Fig. 5.23b). A separação entre tubos compativeis e incompativeis, independentemente do seu comprimento total é importante, pois por vezes o seu desaparecimento deve-se apenas ao facto dos mesmos mergulharem nos tecidos corticais (SOULIE, 1980), não significando necessáriamente a sua paragem.

-Em alguns casos, a mancha de calose é larga e tortuosa, com alguns alargamentos ao longo do seu percurso. Aqui a incompatibilidade é apenas parcial e o tubo pode mesmo assim chegar até ao ultimo terço do estilete. Porém em nenhuma destas situações se observou qualquer tubo nas proximidades do óvulo. Tal como TUPY (1959), JEFFERIES e BELCHER (1974) e STOTT (1972) referem, a acumulação de calose ao longo do tubo é, nas situações de incompatibilidade, pelo menos duas vezes maior que nas compativeis (Figs. 5 24a e b).

A situação de incompatibilidade extrema está geralmente relacionada com o aparecimento de uma acumulação de calose na ponta do tubo (Figs. 5.23 c e d). Nestas situações o tubo não ultrapassa em geral o primeiro terço do estilete (Fig. 5.28).

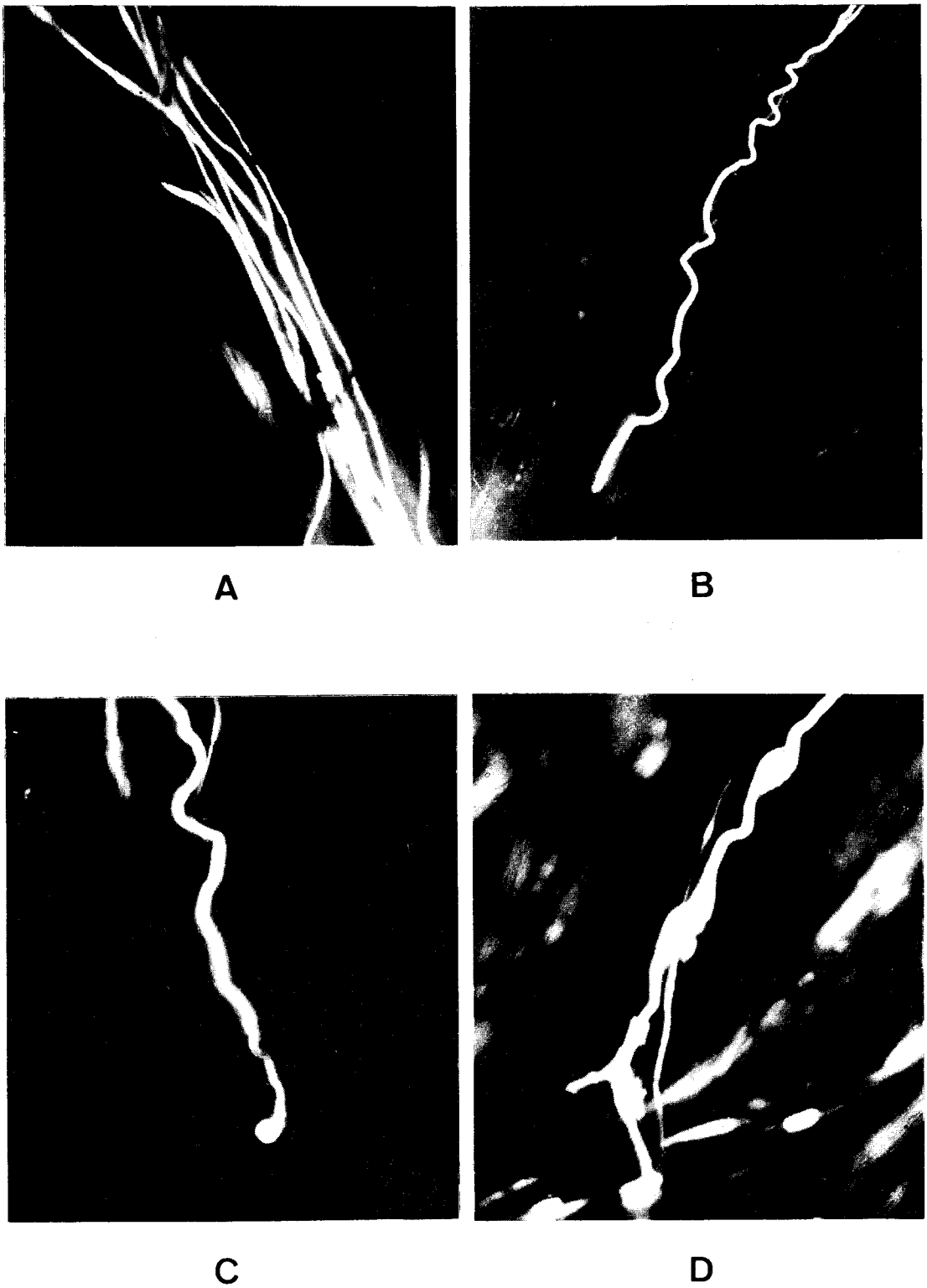
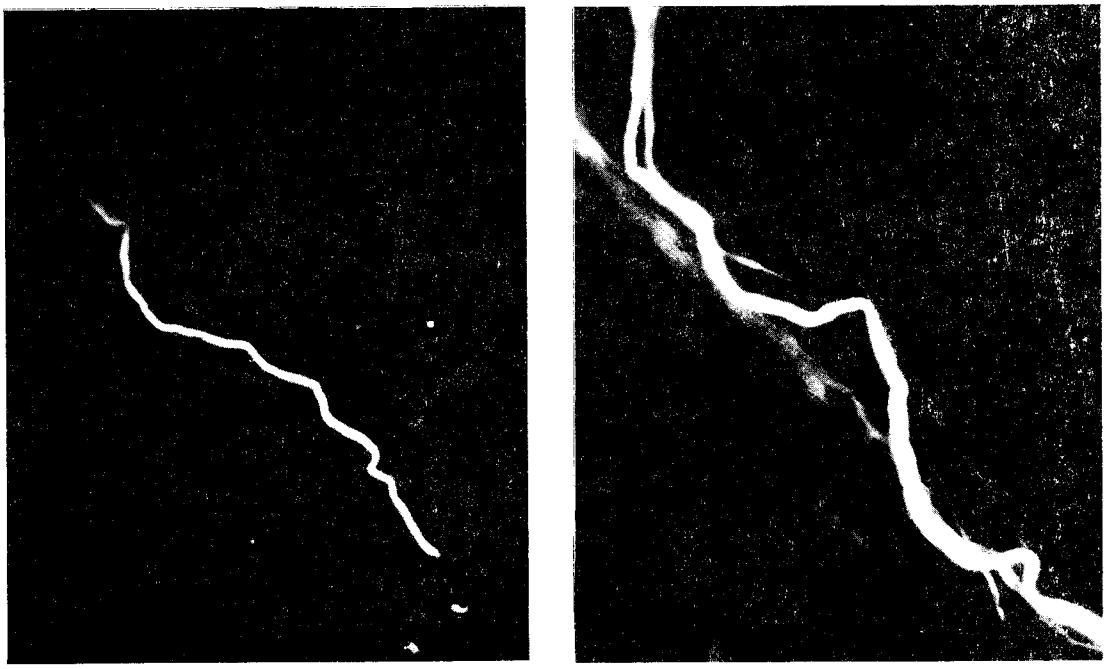


Fig. 5.23 -Acumulação de calose nos tubos polinicos em vários níveis de compatibilidade: A -cruzamento compativel; B- cruzamento incompativel, no inicio do crescimento; C e D -cruzamento incompativel, no fim do crescimento.



A B

Fig. 5.24 -Pormenor da espessura do tubo polinico observado em fluorescência: A -em cruzamento compativel; B -em cruzamento incompativel.

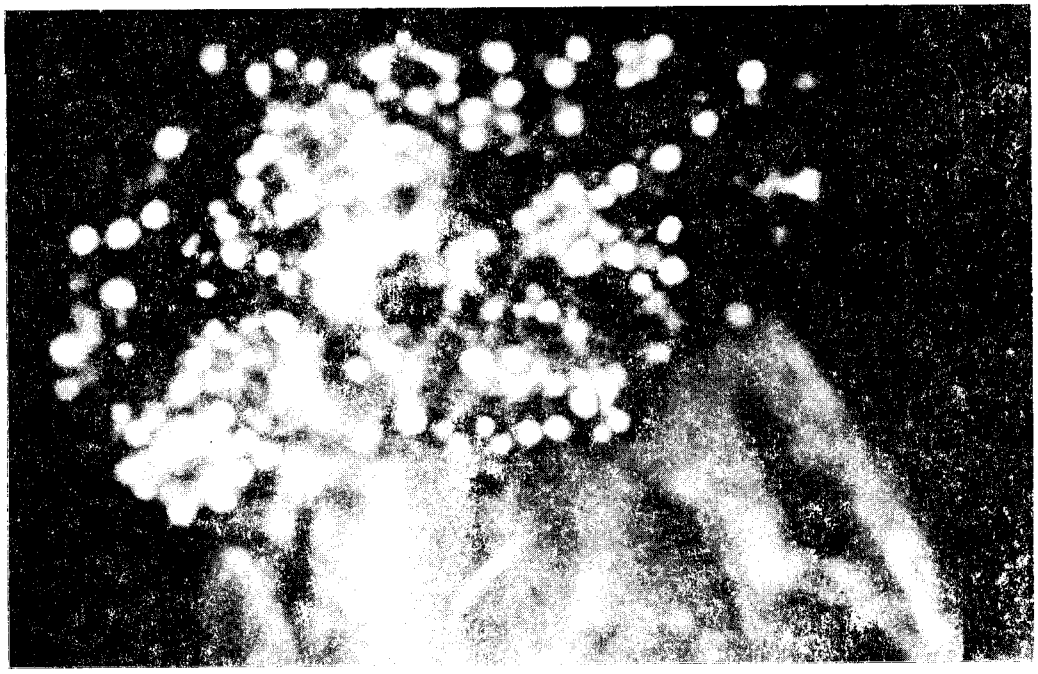


Fig. 5.25 -Grãos de pólen na superficie do estigma observados à fluorescência.

TUPY (1959) refere que a acumulação de calose diminui à medida que as condições de crescimento dos tubos aumentam, o que poderia significar alguma variação entre temperaturas diferentes, pois como veremos a seguir, este factor influencia de forma significativa o crescimento do tubo polinico. Nas nossas observações este facto parece ser verdade apenas para as situações de incompatibilidade. Para as combinações compativeis não se regista qualquer diferença na mancha de calose a diferentes temperaturas. Esta observação vem reforçar no entanto a opinião de TUPY, que considera a acumulação de calose, básicamente como uma consequência secundária resultante da inibição do cresci-mento do tubo polinico.

No entanto, segundo DE NETTANCOURT et al (1973) observaram em *Lycopersicon peruvianum Mill.* a auto-incompatibilidade não é um processo passivo, mas sim uma reacção ao nível das paredes do tubo que provoca a degradação do próprio tubo.

Ao nível do pólen, a sua presença no estigma é fácilmente visivel, como se pode observar pela fig. 5.25. No entanto a quantificação dos grãos de forma precisa, exige uma técnica especifica no esmagamento do estigma sob a lamela, muito morosa e portanto incompativel com a quantidade de observações a fazer neste estudo.

O aparecimento de calose nos óvulos é geralmente associado com a sua degenerescência (ANVARI e STOSSER, 1978; CHAUVIN, 1985; SOULIE, 1980; DUMAS e KNOX, 1983). A fluorescência começa pela região da calaza, acabando por se estender a todo o óvulo (Fig. 5.26 e 5. 27).

Segundo MARTINEZ-TELLEZ e CROSSA-RAYNAUD (1982) desde os primeiros sintomas de fluorescência, o óvulo não é mais receptivo.

Como veremos adiante a quantidade de pistilos com óvulos fluorescentes observada não foi muito grande e em geral raramente aparecem os dois óvulos simultâneamente nesse estado.

5.4.2 -Influência da temperatura no crescimento do tubo polinico

Para além dos problemas de incompatibilidade, a temperatura é o factor mais importante no comportamento do tubo polinico, podendo retardar ou mesmo parar o seu crescimento ao longo do estilete (LEE, 1982).

Embora NSEIR (1969) tenha observado em cerejeira um efeito positivo da temperatura tanto em cruzamentos compativeis como incompativeis, decidimos neste caso estudar separadamente as duas situações, de modo a podermos tirar algumas conclusões em termos de importância deste factor na alteração do Periodo de Polinização Efectivo (PPE).

Com o objectivo de estudar o efeito da temperatura independentemente do factor incompatibilidade, analisaremos neste capitulo apenas as combinações compativeis, ou seja os tratamentos dos clones de 'R. Claudia Verde' P UE 10 e P UE 11 polinizados com 'Stanley' e a cultivar P UE 6. As curvas apresentadas nas figs. 5.29 a 32 e 5.34 resumem os resultados referentes ao crescimentodo do tubo polinico durante o tempo de incubação para as respectivas temperaturas. Nos anexos 16 e 17 referem-se as equações destas curvas e também as calculadas para cada tratamento individualmente.

O crescimento do tubo polinico a 30°C referente ao ensaio de 1989, apresenta-se na fig. 5.33 apenas pelas médias das observações efectuadas. A grande disparidade dos valores observados em grande parte devido ao mau estado dos pistilos, impediu que um ajustamento fosse efectuado.

A curva exponencial já apresentada por JEFFERIES (1982) é a que melhor se ajusta ao crescimento do tubo polinico. Tipica de muitos fenómenos biológicos, esta curva cuja equação base é Y= a. exp (bx) pode tomar várias formas. Em qualquer delas é fundamental a introdução do valor da assimptota, que neste caso consideramos ser o comprimento total do próprio pistilo. Como as observações estão expressas em percentagem do comprimento total do pistilo, o valor máximo de y é portanto 100.

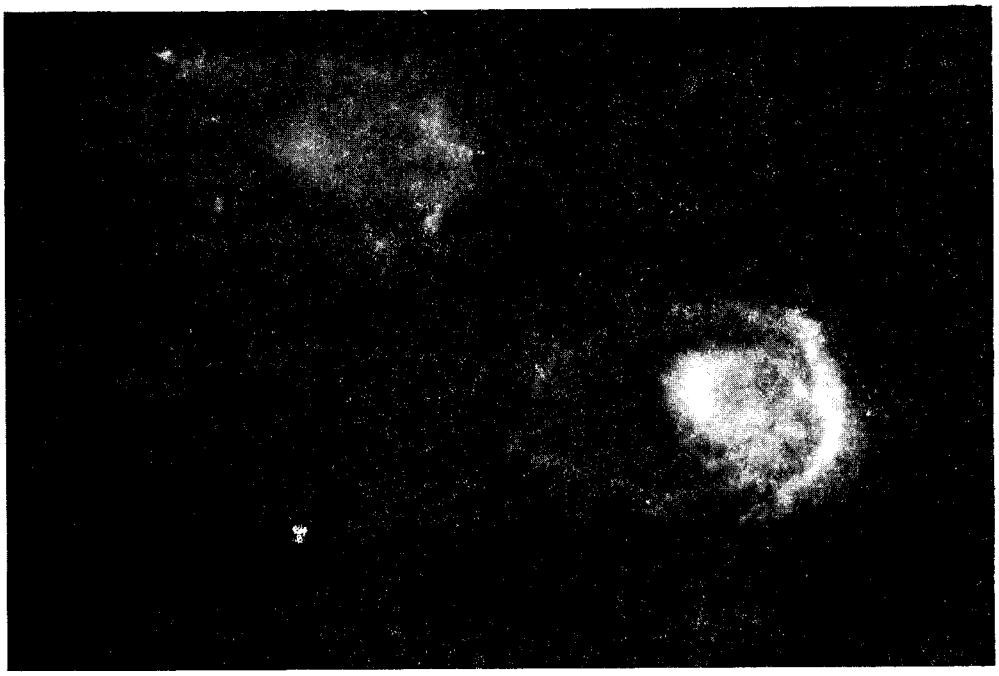


Fig. 5.26 -Óvulos ainda nao degenerados. Apenas uma ligeira fluorescência é visivel ao nível da calaza. P UE 11 -20°C, observado 48 h após a polinização

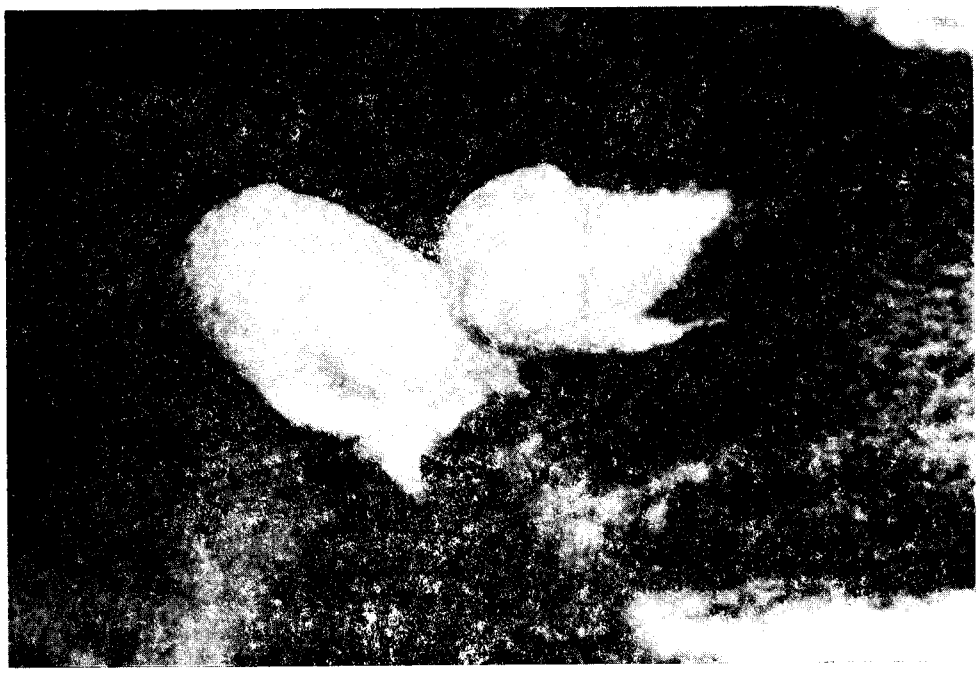


Fig. 5.27 -Óvulos totalmente fluorescentes. P UE 11 -30°C, observado 48 h após a polinização.

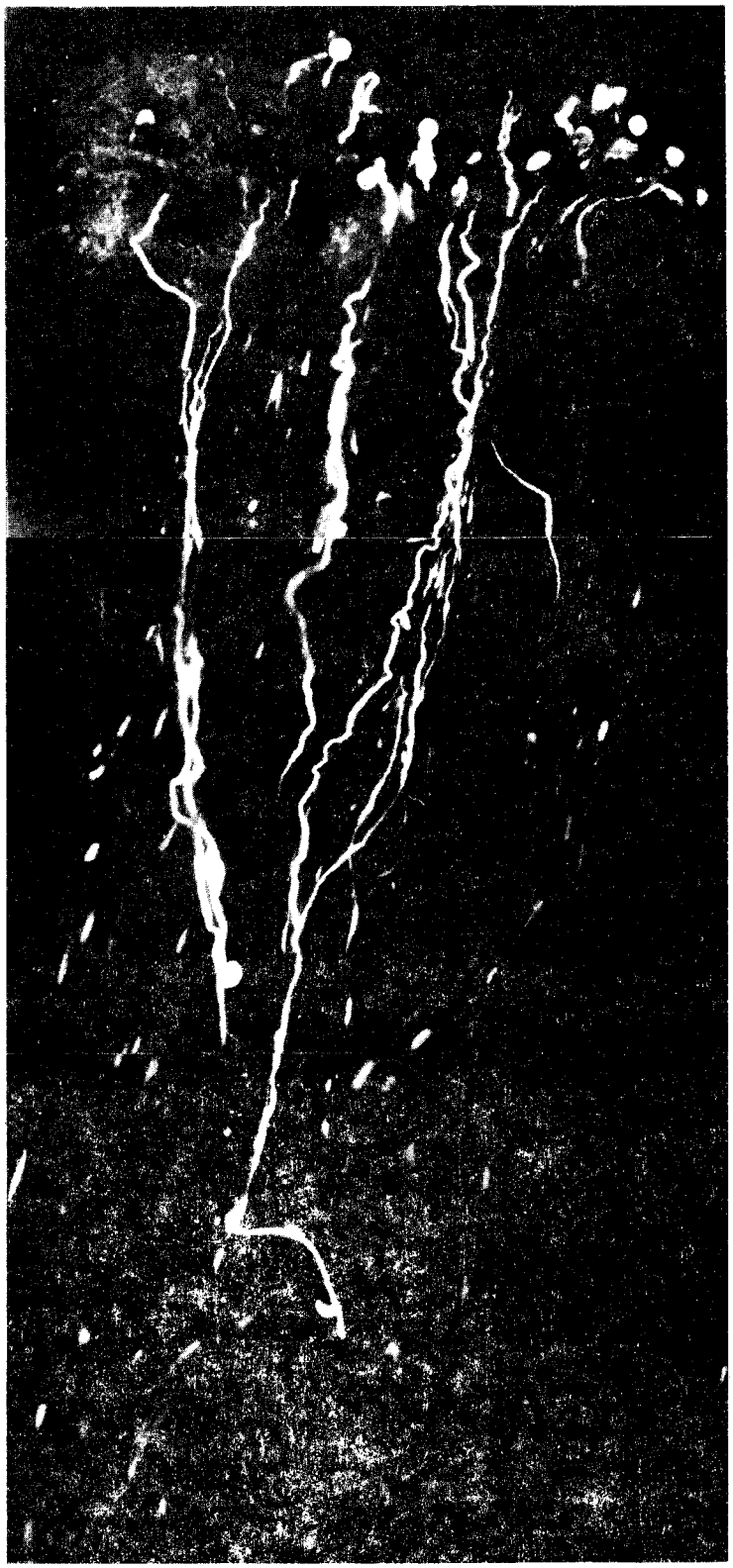


Fig. 5.28 -Observação de pistilo de P UE 11 auto-polinizado. A incompatibilidade manifesta-se pela paragem dos tubos polinicos e engrossamento da extremidade.

O ajustamento das médias das observações do comprimento do tubo polinico, ao longo do estilete em função do tempo de incubação, é também possivel de fazer utilizando algumas equações polinomiais. No entanto torna-se dificil, senão impossivel, explicar em termos biológicos a grande maioria das constantes e coeficientes dessas equações. De acordo com LANDSBERG (1977), a equação ideal para explicar os resultados experimentais deve incluir o minimo de parâmetros, de modo a sugerir uma explicação compreensivel em termos biológicos para o fenómeno.

A curva exponêncial foi utilizada indirectamente fazendo-se antes a transformação 100-Y, que quantifica a percentagem do estilete que ainda falta percorrer pelo tubo polinico. Deste modo, o coeficiente de regressão 'b' é de sinal negativo, em virtude de se tratar de um crescimento negativo. é porém o seu valor absoluto que nos dá a taxa real de crescimento do tubo. A constante 'a' informa do valor teórico da ordenada na origem. Ajustando as escalas no eixo dos x, esta constante pode ser eliminada, facilitando a comparação entre curvas no que respeita à velocidade de crescimento do tubo.

No modelo proposto por JEFFERIES, Y=C/ (1+exp(-B(t-M))), a variável independente x que representa o periodo decorrido após a polinização, é decomposta ainda no tempo em que o tubo polinico atinge os 50% do estilete (M) e na temperatura acumulada em dias-grau ao fim desse periodo (t), acima de 2.5°C. Deste modo, conhecidos os parâmetros B e M para cada conjunto pólen-pistilo, é possivel calcular o tempo que o tubo demora a percorrer todo o estilete, para qualquer temperatura. Alguns autores no entanto, referem que no caso da *P. domestica* o tubo polinico pára de crescer logo a 5°C (LEE, 1980). As nossas observações "in vitro" revelam de facto um crescimento do tubo a 5°C muito reduzido.

Para além da temperatura minima de crescimento do tubo, que varia não só com as espécies mas também com as variedades, uma outra limitação do método proposto por JEFFERIES é o de considerar a primeira metade do crescimento do tubo, representativa de todo o seu crescimento. Com efeito, segundo ROSEN (1975), SANSDRAP (1978) e MULCAHY e MULCAHY (1983, referidos por KNOX, WILLIAMS e DUMAS, 1985) não só por um

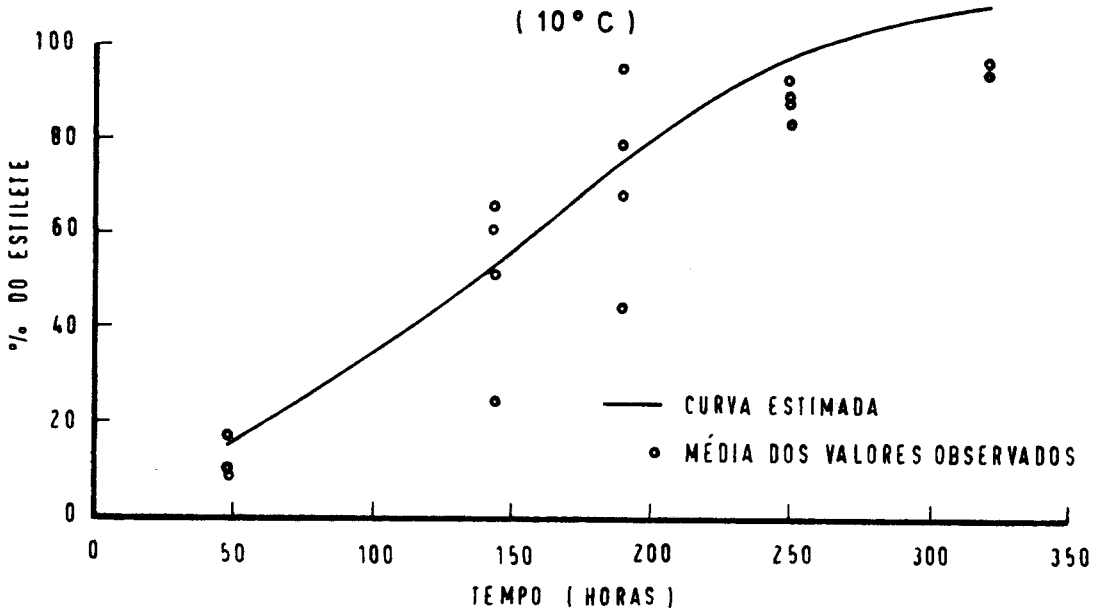


Fig. 5.29-Curva de crescimento do tubo polinico "in vivo",ajustada para os valores médios observados nas combinações compativeis, à temperatura de 10° -1989.

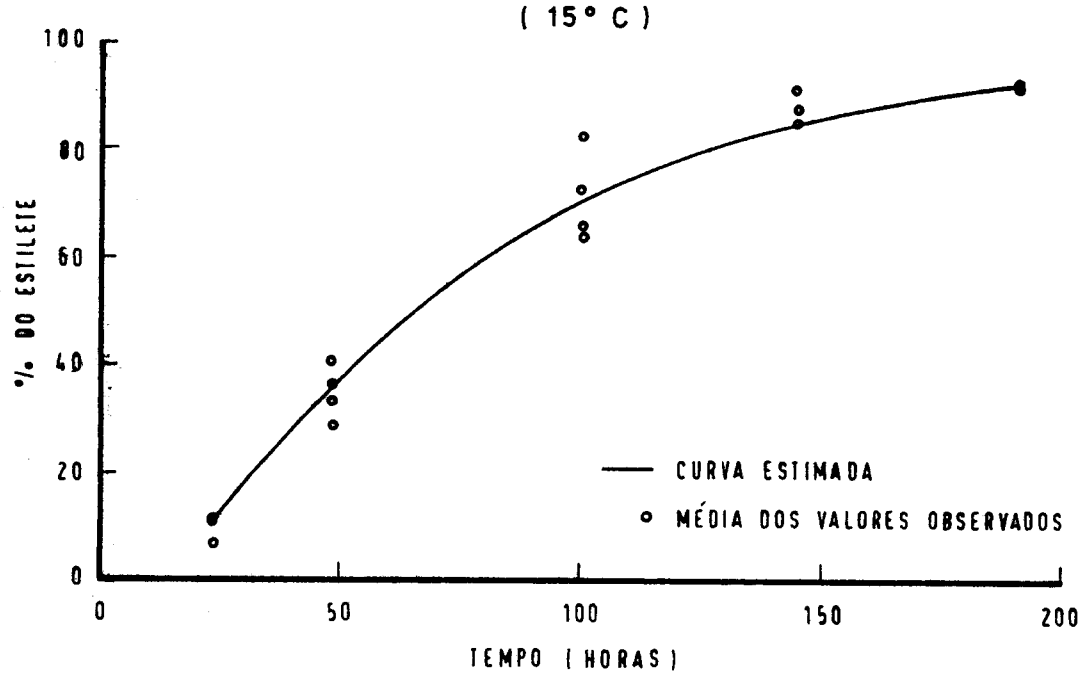


Fig. 5.30-Curva de crescimento do tubo polinico "in vivo" ajustada para os valores médios observados nas combinações compativeis, à temperatura de 15° -1989.

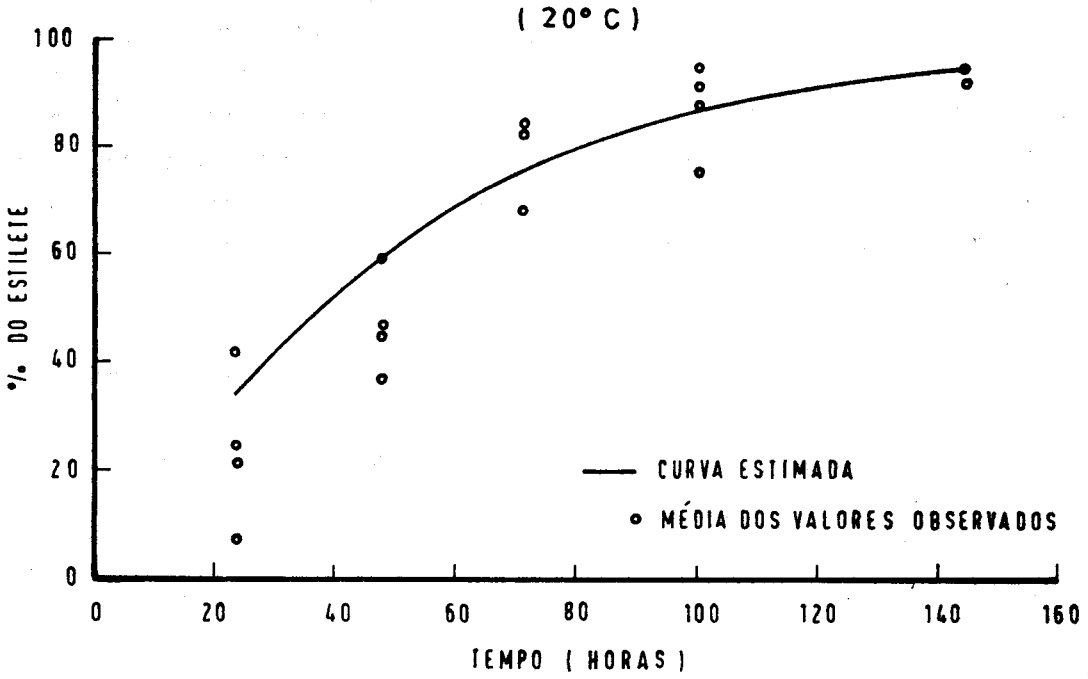


Fig. 5.31-Curva de crescimento do tubo polinico "in vivo" ajustada para os valores médios observados nas combinações compativeis, à temperatura de 20° -1989.

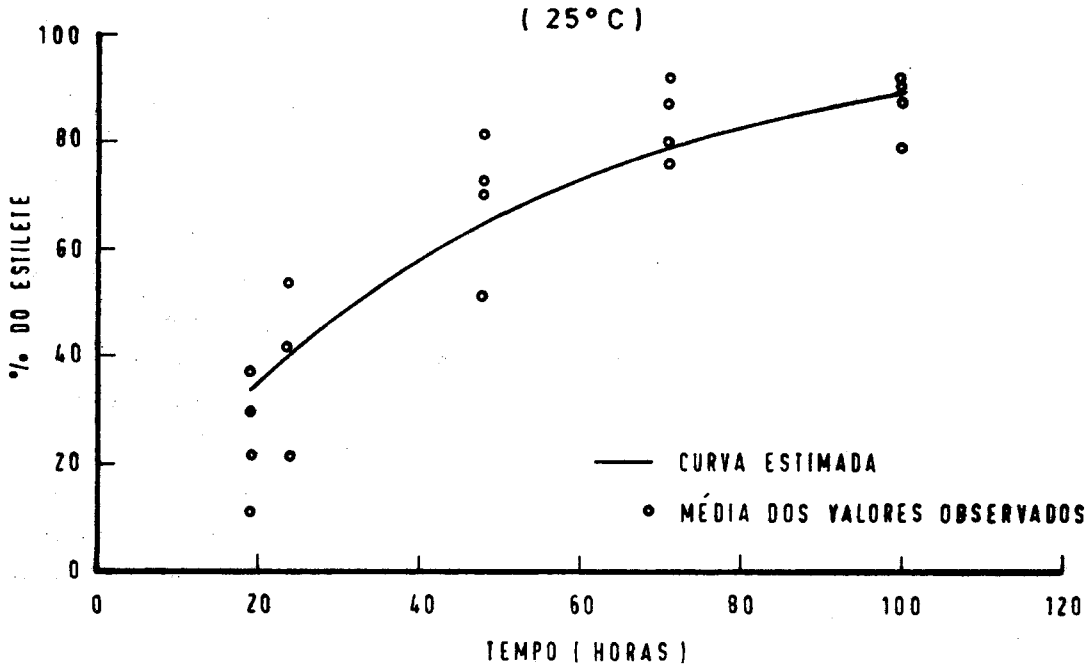


Fig. 5.32-Curva de crescimento do tubo polinico "in vivo" ajustada para os valores médios observados nas combinações compativeis, à temperatura de 25° -1989.

lado o grão de pólen demora algum tempo a germinar e a iniciar o seu crescimento, como por outro, enquanto o periodo inicial de crescimento é essencialmente autotrófico, fazendo-se apenas à custa das reservas contidas no próprio grão e em geral mais lento, no segundo periodo o crescimento é mais rápido, começando o tubo a utilizar substâncias do estilete - fase heterotrófica. Já NATIVIDADE (1932) referia que o crescimento do tubo polinico é determinado em grande parte pelas substâncias que migram do tecido condutor para o mesmo.

No entanto a curva do tipo sigmoide proposta por JEFFERIES é a que, segundo KNOX, WILLIAMS e DUMAS (1985), melhor se ajusta ao crescimento do tubo polinico em duas fases, tipica das espécies de polén binucleado. Numa primeira o crescimento é mais lento, sendo idêntico nas combinações compativeis e incompativeis. Na segunda fase, presente apenas nas situações de compatibilidade o crescimento é mais rápido, tipicamente exponêncial.

Também NSEIR (1969) refere que a velocidade de crescimento do tubo é mais reduzida de inicio, acelerando à medida que o mesmo se aproxima do ovário, atribuindo este facto a um certo quimiotropismo do tubo polinico.

COUTAUD (1954) assinala no entanto que em macieira a velocidade de crescimento do tubo polinico é decrescente com o tempo decorrido depois da polinização.

Procurando através do método da regressão, o tipo de curva que melhor se ajustasse às nossas observações, concluimos que, enquanto o modelo de sigmoide proposto por JEFFERIES (1982) se adaptava bem para a temperatura de 10°, com elevados índices de correlação, o mesmo não acontecia para as outras temperaturas. Optámos assim por utilizar para as temperaturas de 15, 20 e 25°C a exponencial mais simples $Y=100-b.exp(ax)$, que se ajusta melhor à elevada velocidade inicial de crescimento observada.

É provável que no reduzido numero de observações durante o primeiro periodo de crescimento, assim como no grande intervalo entre elas, esteja grande parte da explicação para o comportamento pouco tipico do crescimento por

nós observado. De facto mesmo a 10°C, alguns dos tratamentos revelam um crescimento exponencial logo no inicio. Enquanto JEFFERIES (1982) realizou pelo menos cinco observações nos primeiros cinco dias, nós apenas realizámos a segunda fixação para esta temperatura, 144 horas depois da polinização.

Relativamente às observações de JEFFERIES (1982) sobre a cultivar inglesa 'Vitória' autopolinizada, e em polinização cruzada com 'Giant Prune', o tempo necessário para o tubo polinico atingir o óvulo foi nitidamente superior nas nossas observações. Enquanto aquele autor refere cerca de 7 dias a 10°C e 4 dias a 15°C, nós observámos 10 e 6 dias respectivamente.

Os nossos resultados estão mais de acordo com BUNEMANN e LEE (1980) e LEE (1982) que referem um periodo de quatro dias a 21°C para o tubo percorrer todo o pistilo e LEE (1980) indicando cerca de 8 dias a 10-11°C e 4 dias a 20-21°C.

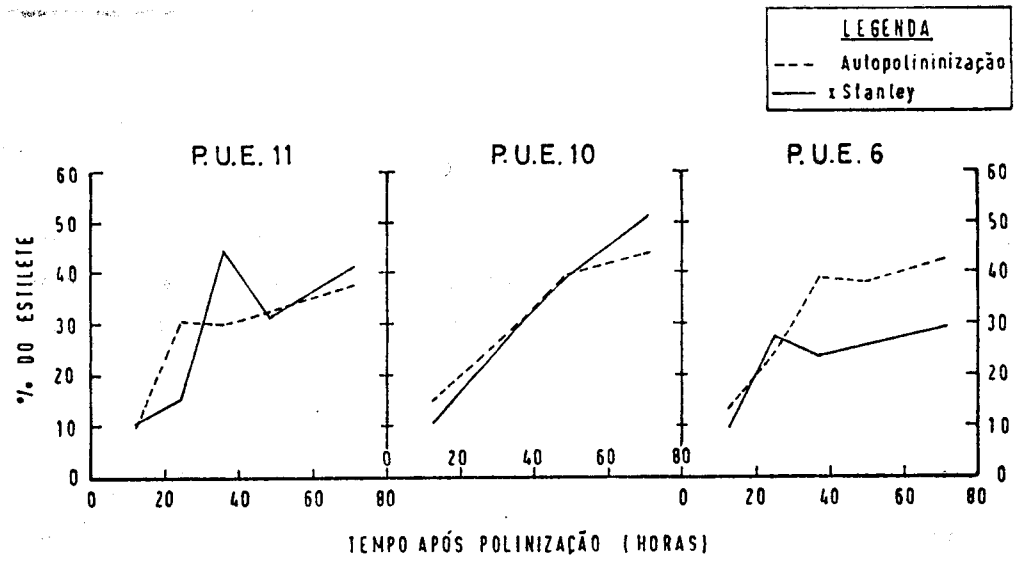


Fig. 5.33 -Crescimento do tubo polinico "in vivo", à temperatura de 30° para os diversos tratamentos -1989.

A temperatura de 10°C a taxa de crescimento é sensivelmente a mesma para todas as cultivares, não se observando

diferenças significativas. Há algumas diferenças no entanto em relação ao nível inicial de crescimento. A P UE 10 é a que apresenta um mais elevado comprimento durante as primeiras 200 horas (mais pequeno valor de b), sendo a sua curva práticamente uma exponêncial simples. A P UE 6 autopolinizada é a que apresenta a sigmoide mais acentuada, apresentando valores iniciais do tubo significativamente inferiores ao tratamento P UE 6 x 'Stanley'.

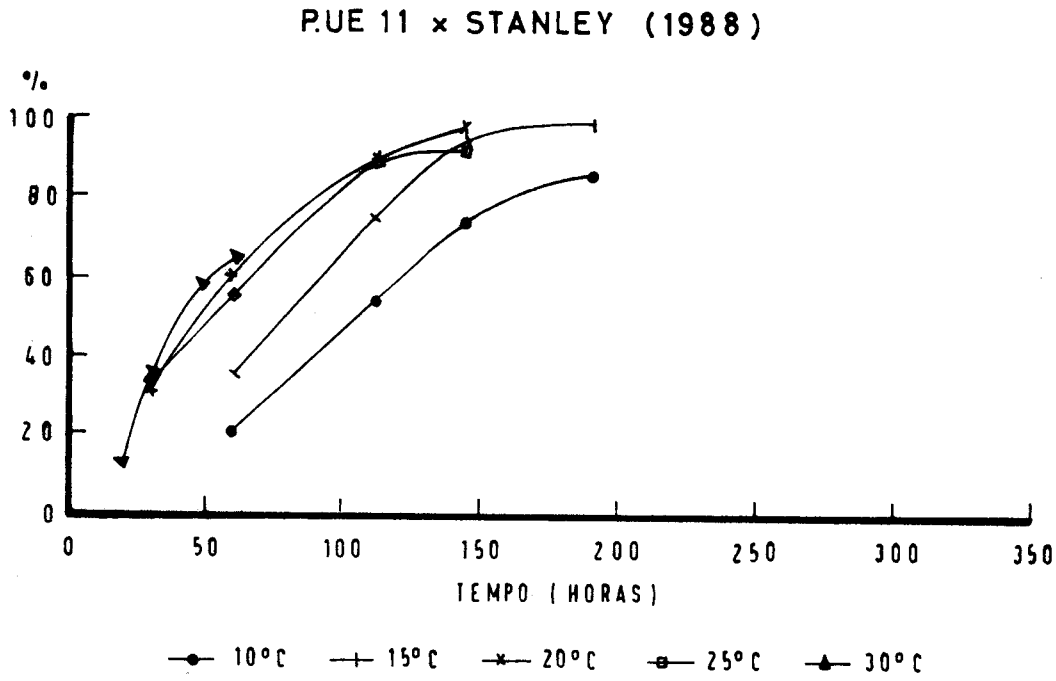


Fig. 5.34 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo" ajustadas para as médias dos valores observados às várias temperaturas, na combinação P UE 11 x Stanley -1988.

A 15 e 20°C a velocidade de crescimento é muito semelhante nos vários tratamentos, como se pode ver pelo índice de regressão das equações apresentadas no anexo 17. Já a 25°C surgem algumas diferenças: a P UE 6 apresenta uma taxa de crescimento superior às restantes cultivares quer em autopolinização quer quando polinizada com a Stanley.

O crescimento mais rápido do tubo polinico na cultivar P UE 6 quando polinizada com 'Stanley', está de acordo com a maioria dos autores, que referem ser a polinização cruzada

sempre mais eficiente do que a auto-polinização, mesmo tratando-se de cultivares auto-compativeis como é o caso.

Comparando as equações de todos os tratamentos, podemos observar que a velocidade de crescimento aumenta com a temperatura em geral para todas as cultivares, havendo no entanto diferenças ao nível da melhor temperatura, entre os clones de 'R. Claudia Verde' e a polinizadora regional. Enquanto aqueles não aumentam a taxa de crescimento de forma significativa a partir de 20°C, a P UE 6 regista um nitido acréscimo.

O melhor comportamento da P UE 6 a temperaturas elevadas, está de acordo com o já observado para a germinação e comprimento do tubo polinico "in vitro", confirmando assim a sua boa adaptação às condições climáticas meridionais.

Embora aparentemente diferentes, os resultados da P UE 11 x 'Stanley', em 1988 e 1989, estão no entanto de acordo com a preferência deste clone por temperaturas mais moderadas, não superiores a 20°C.

O cálculo das regressões lineares para as primeiras três observações, que correspondem em geral aos primeiros 2/3 do estilete (Quadro 5.9), possibilita uma melhor comparação da velocidade de crescimento inicial do tubo. Embora não significativas, devido ao elevado erro do ajustamento, as diferenças entre temperaturas sobrepõem-se claramente às registadas entre cultivares.

Os clones de 'R. Claudia Verde' proporcionam para todas as temperaturas uma taxa de crescimento maior que a P UE 6. Comparando com o valor de 0.344 mm por dia/grau obtido por JEFFERIES (1982), e considerando um comprimento médio de 15 mm dos pistilos, verifica-se para todas as temperaturas uma taxa de crescimento inferior à observada por aquele autor (Quadro 5.9). As diferenças relativas aos resultados de JEFFERIES, são particularmente importantes para as temperaturas de 10 e 15°C, onde a velocidade de crescimento do tubo nas nossas condições é sensivelmente metade das referidas por aquele.

A menor velocidade de crescimento do tubo polinico em situação de compatibilidade, pode ser justificada de duas formas: a influência das condições ambientais sobre a modificação desta caracteristica nas cultivares indigenas. Desta forma, a cultivar inglesa 'Vitória' utilizada por JEFFERIES, pode ter adquirido, devido à pressão do ambiente, uma capacidade de crescimento do tubo mais rápida, contrariamente ao nosso material que beneficia em geral de temperaturas elevadas durante a floração.

temp.	tratamento	b	dif. sig.	r2	i
	P UE 11 x Sta.	1.71	c	0.96	6.16
	P UE 10 x Sta.	1.50	c	0.92	5.40
25°C	P UE 6 x Sta.	1.08	b c	0.89	3.89
	P UE 6 x auto	1.48	c	0.99	5.36
	P UE 11 x Sta.	1.12	c	0.97	4.10
	P UE 10 x Sta.	1.23	c	0.97	4.43
20°C	P UE 6 x Sta.	0.93	c	0.99	3.38
	P UE x auto	1.17	c	0.98	4.21
	P UE 11 x Sta.	0.75	b c	0.98	2.74
	P UE 10 x Sta.	0.85	c	0.97	3.10
15°C	P UE 6 x Sta.	0.65	b c	0.99	2.34
	P UE 6 x auto	0.66	b c	0.99	2.41
	P UE 11 x Sta.	0.44	b	0.98	1.58
	P UE 10 x Sta.	0.50	b	0.99	1.80
10°C	P UE 6 x Sta.	0.37	a b	0.99	1.33
	P UE 6 x auto	0.22	a	0.95	0.79

i - taxa de crescimento em mm/dia para pistilos = 15mm

Quadro 5.9 - Indices de regressão das equações lineares, ajustadas para o crescimento inicial do tubo polinico "in vivo". Valores seguidos das mesmas letras não diferem significativamente para $p < 0.05$, segundo o teste T de Student.

Uma outra explicação possivel diz respeito ao nível da compatibilidade entre as cultivares utilizadas. Com efeito, além da incompatibilidade plena, admite-se hoje existirem diversos níveis de compatibilidade, sobretudo nas espécies poliploides, onde as combinações possiveis entre os alelos S são em mais elevado numero. Poderia concluir-se assim que a

combinação 'Victoria' x 'Giant Prune' utilizada por JEFFERIES fosse mais compativel que a 'R. Claudia Verde' x 'Stanley' por nós estudada. Esta hipótese parece no entanto afastada, pois aquele autor observou a mesma velocidade do tubo polinico, tanto em polinização cruzada, como em autopolinização. Também nós registamos valores semelhantes nos tratamentos da P UE 6 x Stanley e polinizada com o próprio pólen.

Um outro facto que vem favorecer a primeira das hipóteses levantadas, é o da taxa de crescimento nos tratamentos com a cultivar regional P UE 6, mais adaptado às condições ambientais da região, ser sempre inferior a todas as temperaturas, que aqueles em que entram os clones de 'R. Claudia Verde'.

A 30 °C observa-se já um nitido efeito inibidoa temperatura sobre o crescimento, pelo que não se calcularam as curvas respectivas. Podemos no entanto verificar, pela análise das médias observadas, que o efeito negativo da temperatura se pode comparar ao da própria incompatibilidade, embora nos pistilos destes tratamentos não se tenham observado quaisquer manchas de calose na parte terminal dos tubos polinicos. A temperatura demasiado elevada pode ter uma influência indirecta destruindo os tecidos do estilete através da dessecação provocada pelo calor, impedindo assim os tubos de continuarem o seu crescimento.

SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) atribuem a diminuição do comprimento do tubo polinico observado nas combinações incompativeis à destruição do tubo provocado pelo próprio fenómeno de incompatibilidade. Nas nossas observações, apenas para 25° esse facto parece registar-se. De facto, a esta temperatura apenas para os tratamentos P UE 10 e P UE 11, quando em autopolinização, se observa diminuição no comprimento do tubo.

Para 30° essa destruição parece estar no entanto mais relacionada com a temperatura demasiado elevada, do que com a existência de incompatibilidade. A P UE 10 é a unica que parece sugerir um melhor comportamento a esta temperatura, pois não se observa redução nitida do tubo polinico após as 48 horas, continuando em crescimento até à ultima fixação. No

entanto, em ambos os anos se provou ser impossivel conservar os pistilos em bom estado depois deste periodo, devido à sua rápida dessecação.

SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) e VASLAKAKIS e PORLINGIS (1984) não observaram nenhum efeito inibidor da temperatura de 25 e 30°C no crescimento do tubo polinico em polinização cruzada compativel de amendoeira, sendo mesmo estas temperaturas as que registaram em geral um mais rápido crescimento do tubo. No entanto, os ultimos daqueles autores referem uma ligeira inibição para a temperatura de 30°C quando se trata de autopolinização.

A amendoeira é porém uma espécie geralmente adaptada a regiões de Inverno mediterrânico, onde durante a floração se observam temperaturas relativamente elevadas. Em contrapartida a ameixeira europeia é uma espécie tipicamente continental, adaptada a regiões de clima mais frio. É pois compreensivel que registe um óptimo de temperatura mais baixo que a amendoeira, assim como um limite de tolerância às temperaturas elevadas também mais baixo.

Comparando as curvas médias de todos os tramentos compativeis estudados em 1989 (anexo 17), verifica-se que o crescimento do tubo aumenta com a temperatura, mas estabiliza quando chega aos 20°C. Note-se que o mais elevado indice de regressão relativo à curva de 10°C, não pode ser comparado directamente com os restantes por se tratar de uma sigmoide em que a fase exponencial da curva é retardada. O valor correspondente ao ajustamento da curva exponêncial é 0.010, bastante inferior portanto.

Comparando os valores da taxa de crescimento do tubo polinico observados em 1988 e 1989, verifica-se não haver grandes diferenças no tempo necessário para o tubo atingir o óvulo: cerca de 150 horas a 15°C e 100 horas a 20°C. Só a 25° se observa de facto uma grande diferença entre anos no tempo necessário para o tubo atingir o óvulo, cerca de 120 horas em 1988 e apenas 90 em 1989.

Esta diferença de comportamento entre anos à mesma temperatura, poderá não ser da responsabilidade do material vegetal pistilos, pois trata-se dos mesmos clones, mas sim

dever-se a diferenças de qualidade do pólen de 'Stanley' utilizado. De facto, embora o pomar em que foi recolhido fosse o mesmo, a percentagem de germinação observada "in vitro" sugere uma menor viabilidade em 1988 relativamente a 1989 (Quadro 5.15). Diversos autores aliás, referem ser a viabilidade do pólen um factor de grande variação anual, influenciado pelas condições ambientais que interferem na sua formação.

Também LEE (1980) observou uma elevada correlação entre a germinação do pólen "in vitro" e o crescimento do tubo "in vivo".

Já a diferença entre temperaturas no mesmo ano, parece ser mais da responsabilidade do factor pistilos, pois que como vimos atrás, as diferenças observadas vão no mesmo sentido das verificadas com a germinação do pólen "in vitro" dos clones utilizados no ensaio de temperaturas.

5.4.3 -Influência da temperatura na expressão da auto-incompatibilidade

Bastantes estudos sobre a incompatibilidade pólen-pistilo, têm concluido que a temperatura elevada pode retardar ou mesmo eliminar a reacção de incompatibilidade gametófitica nas mais diversas espécies (NSEIR, 1969; PATIL, RAJMANE e SANGHAVI, 1974; LEWIS, 1979; HIRATSUKA e TOMITA, 1989).

Em *Lilium longiflorum*, MATSUBARA e SACHIKO (1981) referem que o tratamento do polén a 40 ou 50°C durante uma hora pode impedir o fenómeno de incompatibilidade. Já anteriormente ASCHER e PELOQUIN (1970) tinham observado que utilizando uma temperatura de incubação superior a 30° os tubos polinicos incompativeis cresciam normalmente ao longo do estilete desta espécie, não mostrando a habitual paragem.

Em macieira, onde o fenómeno de incompatibilidade se assemelha de certo modo à ameixeira europeia em virtude de ser também um poliploide, WILLIAMS e MAIER (1977) encontraram para a cultivar auto-incompativel 'Cox'x Orange Pippin' um significativo efeito da temperatura no crescimento do tubo

polinico que em certas condições de idade do pistilo é mesmo suficiente para tornar a fertilização possivel.

Também HECHT (1964) em *Oenothera organensis* e TOWNSEND (1965) em *Trifolium hibridum* referidos por ASCHER e PELOQUIM (1970) observaram uma influência positiva da temperatura elevada no crescimento dos tubos polinicos incompativeis ao longo do estilete.

NSEIR (1969) observou que no cruzamento de varie-dades de ceregeira inter-incompativeis, o tubo polinico se aproximava do ovário para temperaturas de 27 e 35°C, enquanto a temperaturas inferiores a 15 e 20°C não ultrapassava respectivamente 1/4 e 1/2 do comprimento do pistilo.

Considerando as excepcionalmente elevadas temperaturas durante a floração da 'R. Claudia Verde' no Alto Alentejo em certos anos, poderia supor-se que o já de si enfraquecido sistema de incompatibilidade desta cultivar hexaploide poderia ser completamente impedindo de funcionar.

As experiências neste domínio adoptam geralmente uma de duas possibilidades: ou temperaturas moderadamente elevadas até 30°C, durante todo o periodo de incubação; ou em alternativa, um tratamento de choque de pistilos ou do pólen,

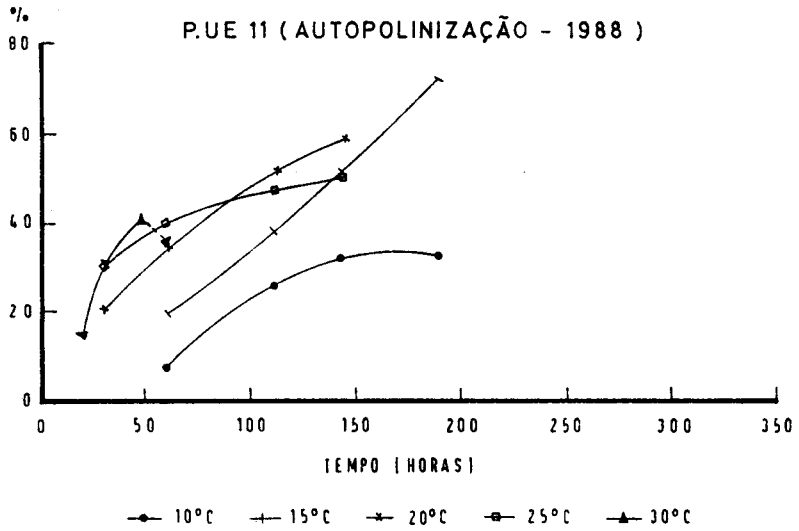


Fig. 5.35 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo", ajustadas para as médias dos valores observados nas diversas temperaturas, em pistilos de P UE 11 autopolinizados -1988.

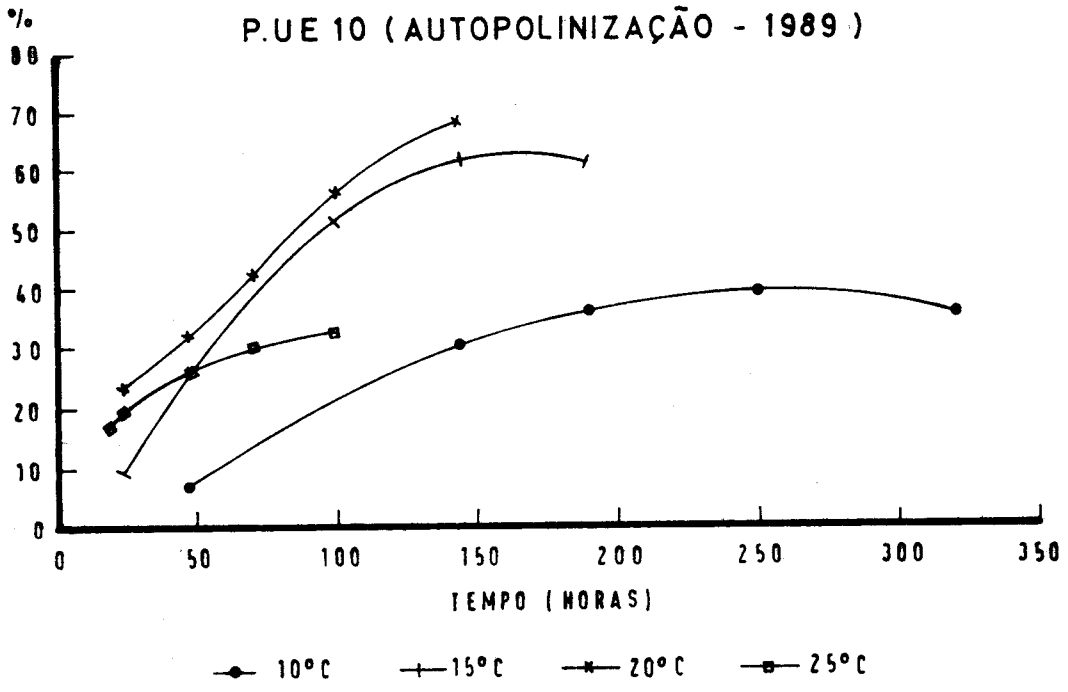


Fig. 5.36 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo", ajustadas para as médias dos valores observados nas diversas temperaturas, em pistilos de P UE 10 autopolinizados -1989.

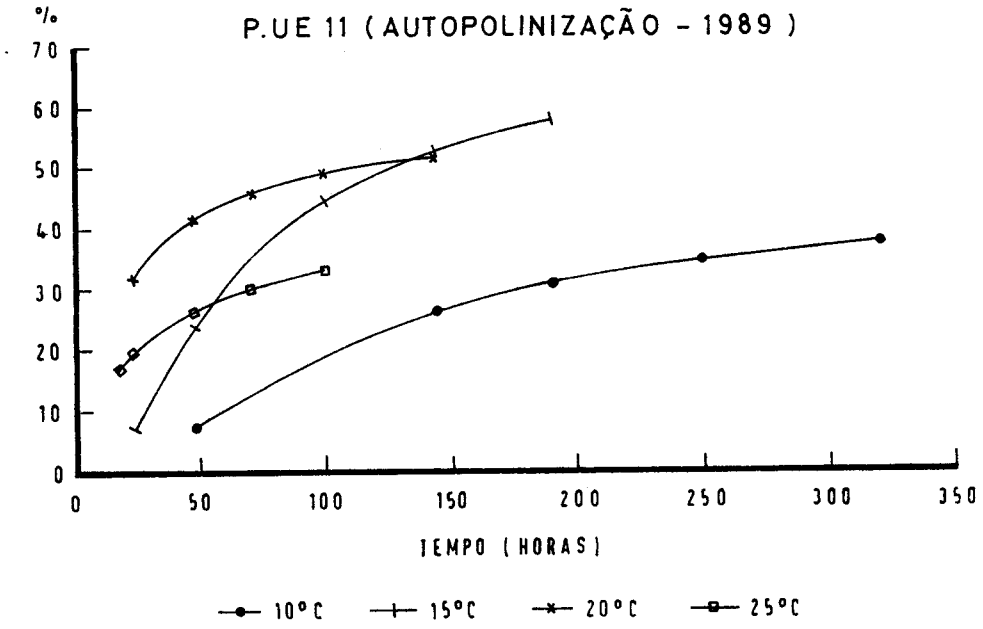


Fig. 5.37 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo", ajustadas para as médias dos valores observados nas diversas temperaturas, em pistilos de P UE 11 autopolinizados -1989.

a temperaturas bastante elevadas, chegando ao limite de resistência dos tecidos, durante curto periodo. Como o objectivo do nosso estudo era simular as condições naturais, optámos pela primeira hipótese.

Ao contrário das combinações compativeis em que o valor da assimptota é conhecido, no caso dos tratamentos onde se observa o fenómeno da incompatibilidade, seria muito subjectivo atribuir um valor máximo para Y, que é precisa-mente o que se procura. Por outro lado, interessanos mais procurar o máximo de correlação com os valores observados, do que utilizar uma mesma equação que facilitaria as comparações entre tratamentos. É que o objectivo principal deste estudo é o de procurar saber se a temperatura pode retardar ou até mesmo anular a expressão da incompatibilidade gametófitica, que em geral se expressa pela paragem dos tubos polinicos no primeiro terço do estilete.

No estudo realizado em 1988 no clone P UE 11 (Fig. 5.35), verifica-se que, enquanto às temperaturas de 10 e 30°C os tubos param nitidamente o seu crescimento antes de atingirem 1/2 do estilete, nas restantes temperaturas, sobretudo 15 e 20°C, o crescimento continua até à altura da ultima fixação. O declive da curva de 15°C parece indicar mesmo uma situação de compatibilidade plena. No entanto, se compararmos com as curvas da polinização com 'Stanley' (Fig.5.34), podemos observar que mesmo a 15° a velocidade de crescimento do tubo em autopolinização é pouco mais de metade da observada em polinização cruzada. Enquanto às 144 horas de incubação os tubos compativeis se encontram já perto dos óvulos, nos incompativeis ainda não ultrapassaram a primeira metade do pistilo.

Repetido em 1989 para o mesmo clone e alargado também ao P UE 10 (Figs. 5.36 e 5.37), o estudo permite concluir que de facto as temperaturas de 15 e 20° provocam um atraso significativo na expressão da incompatibilidade, porém insuficiente para permitir a autofecundação, pelo menos durante o periodo observado.

Essa influência positiva da temperatura modera-damente elevada parece ser mais evidente na P UE 11 que na P UE 10, enquanto que se regista uma troca entre clones, no que

respeita à melhor temperatura - 15°C para a P UE 10 e 20°C para a P UE 11.

A diferente resposta dos clones auto-incompativeis à mesma temperatura, é o resultado da conjugação entre o nível de incompatibilidade, determinado pelas diferenças genéticas ao nível dos alelos S, e o comportamento tipico de cada genótipo em relação à temperatura.

SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) referem que diferentes genotipos podem ter uma curva de resposta à temperatura caracteristica independente da incompatibilidade. De facto, embora a temperatura de 15° pareça ser mais efectiva no retardar da incompatibilidade, também observado em 1988 com o mesmo P UE 11, a maior taxa de crescimento que o clone P UE 10 regista a 20°C, bem patente no índice de regressão da equação que traduz o seu comportamento em polinização cruzada (Anexo 17), faz com que quando é autopolinizada, seja a temperatura de 20° aquela onde regista um maior comprimento.

Comparando os dois anos, verifica-se uma semelhança de comportamento para todas as temperaturas, não ultrapassando os mais compridos tubos polinicos, o primeiro terço do estilete nas temperaturas piores e os dois terços nas melhores.

Os nossos resultados estão de acordo com os observados por SOCIAS I COMPANY, KESTER e BRADLEY (1976) na cultivar de amendoeira auto-incompativel 'Ne Plus Ultra'. Estudando o efeito da temperatura no crescimento do tubo polinico em autopolinização e em polinização cruzada, estes autores verificaram também que na situação de incompatibilidade eram as temperaturas de 15 e 20°C que mais induziam o crescimento do tubo polinico, que em alguns casos podia ultrapassar os 50% do estilete. Em contrapartida, temperaturas mais baixas e mais altas não possibilitavam que os mesmos passassem o primeiro terço do estilete.

Tal como LEWIS (1942, referido por NSEIR, 1969) observou em cerejeira, o efeito positivo da temperatura no crescimento do tubo polinico não se mantém para as temperaturas demasiado elevadas. De facto, em ambos os anos e para os dois clones testados, as temperaturas de 25 e 30°C não

permitem um crescimento do tubo superior a 1/3 do estilete, à semelhança do que se verificava para as temperatura de 10°C.

De acordo com WILLIAMS E MAIER (1977) o maior comprimento final dos tubos polínicos a determinadas temperaturas pode ser mais o resultado da estimulação no crescimento inicial do tubo e menos um efeito directo da temperatura sobre o mecanismo da incompatibilidade em si. Assim, quando a reacção se produz este já percorreu um maior troço do estilete.

LEWIS (1979) refere a este respeito, que mesmo no tipo de incompatibilidade gametófitica, o reconhecimento do pólen incompativel é feito logo ao nível do estigma e imediatamente a seguir à sua germinação. Assim, embora a paragem do tubo polinico se possa fazer a diferentes niveis do estilete, tal não significa que a temperatura tenha um efeito inibidor sobre o mecanismo de reconhecimento, mas apenas que a reacção fisiológica que impede o crescimento do tubo, pode ser mais ou menos retardada em função da temperatura.

De facto, na observação dos tubos polinicos à fluorescência, pode-se verificar que nos tratamentos incompativeis a mancha de calose é mais espessa apresentando frequentemente dilatações tipicas da incompatibilidade, mesmo nos pistilos em que o tubo polinico ultrapassava os 2/3 do estilete (Fig 5.24-B).

No entanto segundo KNOX, WILLIAMS e DUMAS (1985), a temperatura elevada pode mesmo destruir a barreira da incompatibilidade, como resultado da desnaturação das proteinas associadas à reacção da incompatibilidade.

Em trabalho recente sobre a pêra Japonesa HIRATSUKA e TOMITA (1989), encontraram que o tratamento dos pistilos em àgua a 45° durante um curto periodo de 1.5 a 2.5 minutos, não danifica os pistilos e tem um efeito inibidor sobre as proteinas do estilete que comandam a incompatibilidade.

MATSUBARA (1979) refere também, que o tratamento do pólen com temperaturas elevadas (40°, durante 90 minutos), podem inactivar as proteinas especificas do pólen, tornando-o compativel. Esta técnica parece ser mesmo de aplicação mais fácil que o tratamento sobre os pistilos.

Parece pois poder concluir-se que, se os tratamentos rápidos com temperaturas elevadas são susceptiveis de terem um efeito inibidor do fenómeno de incompatibilidade, podendo o método ser util em trabalhos laboratoriais, o mesmo não se passa com a influência da temperatura durante o periodo de floração ao nível do pomar. Mesmo temperaturas no limite de resistência dos tecidos do pistilo, podem retardar a paragem do tubo polinico, mas não são suficientes para bloquear o mecanismo.

De acordo com os estudos realizados neste domínio, parece evidente que a acção da temperatura sobre a incompatibilidade está longe de ser um fenómeno passivo, constituindo antes pelo contrário um factor que age directamente sobre as substâncias intervenientes no processo, inactivando-as ou mesmo destruindo-as. Desta forma dificilmente se poderá admitir, que temperaturas ao nível das registadas nos pomares sejam suficientes para conseguir uma acção desse tipo.

A densidade de grãos sobre o estigma é referida como um importante factor de promoção, não só na germinação, mas também no crescimento do tubo polinico. De acordo com WILLIAMS e MAIER (1977) quanto maior fôr o numero de grãos de pólen, maior é a percentagem dos que possuiem um genotipo favorável à pseudo-compatibilidade.

Na germinação "in vitro" nós podemos comprovar esse facto, sobretudo ao nível da percentagem de germinação. No entanto embora seja dificil quantificar o numero de grãos presentes no estigma, pelas dificuldades na sua observação à fluorescência, a densidade dos mesmos sobre o estigma não parece ter influenciado significativamente o crescimento do tubo polinico.

Mesmo que a autopolinização resulte efectiva em determinadas condições de temperatura e de densidade de grãos sobre o estigma, o que só seria possivel de verificar com um mais prolongado tempo de incubação às temperaturas favoráveis de 15 e 20°C, a fertilização do óvulo só aconteceria se a sua longevidade se mantivesse por um grande periodo de tempo, em virtude da baixa velocidade de crescimento dos tubos polinicos incompativeis.

Como já se referiu no entanto, mesmo os pistilos que param o seu crescimento apenas no ultimo terço do estilete, apresentam na parte final do percurso manchas de calose tipicas do fenómeno de incompatibilidade. Assim, embora o dessecamento dos pistilos nos tenha impedido de alargar o periodo de observações, não é de prever que mesmo a temperaturas ideais se verifique um crescimento do tubo polinico suficiente para realizar a fecundação do óvulo.

5.4.4 -Longevidade dos óvulos e Periodo de Polinização Efectivo.

Ainda que a generalidade da produção de fruteiras esteja em grande parte dependente da fecundação, esta é ainda mais imperiosa nas prunoideas, devido à completa ausência de casos de partenocarpia. Assim, para que se verifique o vingamento do fruto, é indispensável que quando o tubo polinico chega ao óvulo, este ainda esteja viável. Daí a importância do periodo de polinização efectivo na produção de prunoideas. De acordo com diversos autores (THOMPSON e LIU, 1973; KEULEMANS, 1984;) as condições climáticas durante a floração, sobretudo a temperatura, influenciando o crescimento do tubo polinico e a longevidade dos óvulos, podem determinar um maior ou menor PPE.

Nas observações sobre a fluorescência dos óvulos, verificou-se em ambos os anos uma nitida diferenciação entre a degenescência do primeiro e do segundo óvulo. No entanto, os periodos em que se começa a observar a fluorescência em percentagens significativas, varia com as temperaturas e também com os anos.

A 30°C a degenerescência parece ser bastante rápida, tendo-se observado em 1988 cerca de 35% de pistilos com pelo menos um óvulo fluorescente, logo ao fim de dois dias da antese e mais de 85% em 1989 para o mesmo tempo (Fig. 5 38). Esta grande diferença entre os dois anos estudados, estende-se também ao segundo óvulo. Com efeito, enquanto que em 1988 apenas 9% de pistilos apresentam os dois óvulos fluorescentes, no ano de 1989 essa percentagem sobe para 45%.

As nossas observações estão de acordo com as de SOCIAS I COMPANY e FELIPE (1979), que referem que mesmo em amendoeira o envelhecimento do óvulo se acelera de tal modo a temperaturas superiores a 27°C, que o PPE se reduz quase aos momentos imediatos à antese.

A 25°C a longevidade dos óvulos parece ser bastante maior, havendo no entanto ainda nitidas diferenças entre anos (Fig. 5.39). Em 1989 a fluorescência do primeiro continua a registar-se bastante mais cedo, atingindo cerca de 80% ao fim de 100 horas, com pelo menos um dos óvulos portador de alguma fluorescência, enquanto em 1988 se registou para o mesmo periodo apenas metade daquele valor -40%.

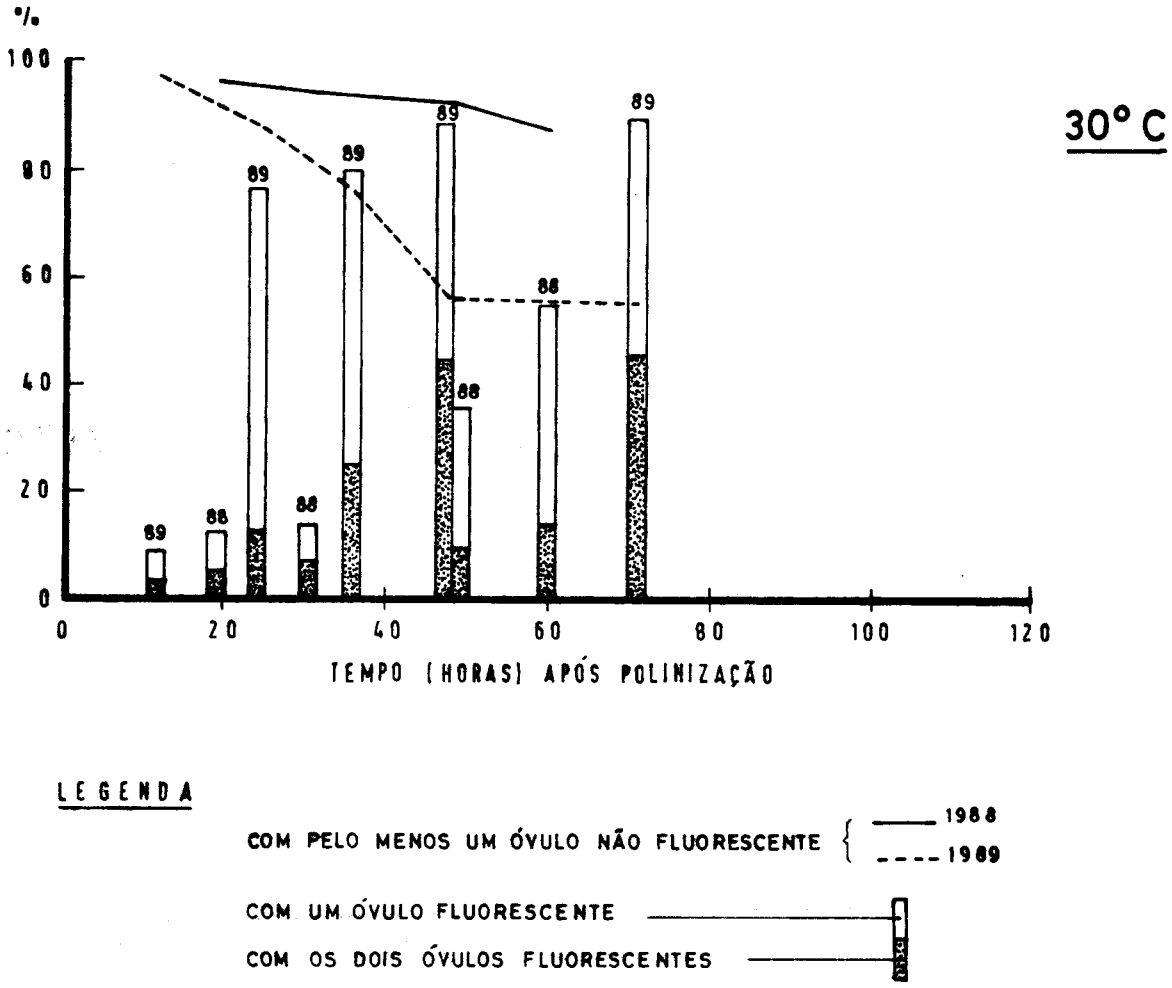


Fig. 5.38 -Percentagem de óvulos fluorescentes em pistilos de P UE 11, à temperatura de 30°C

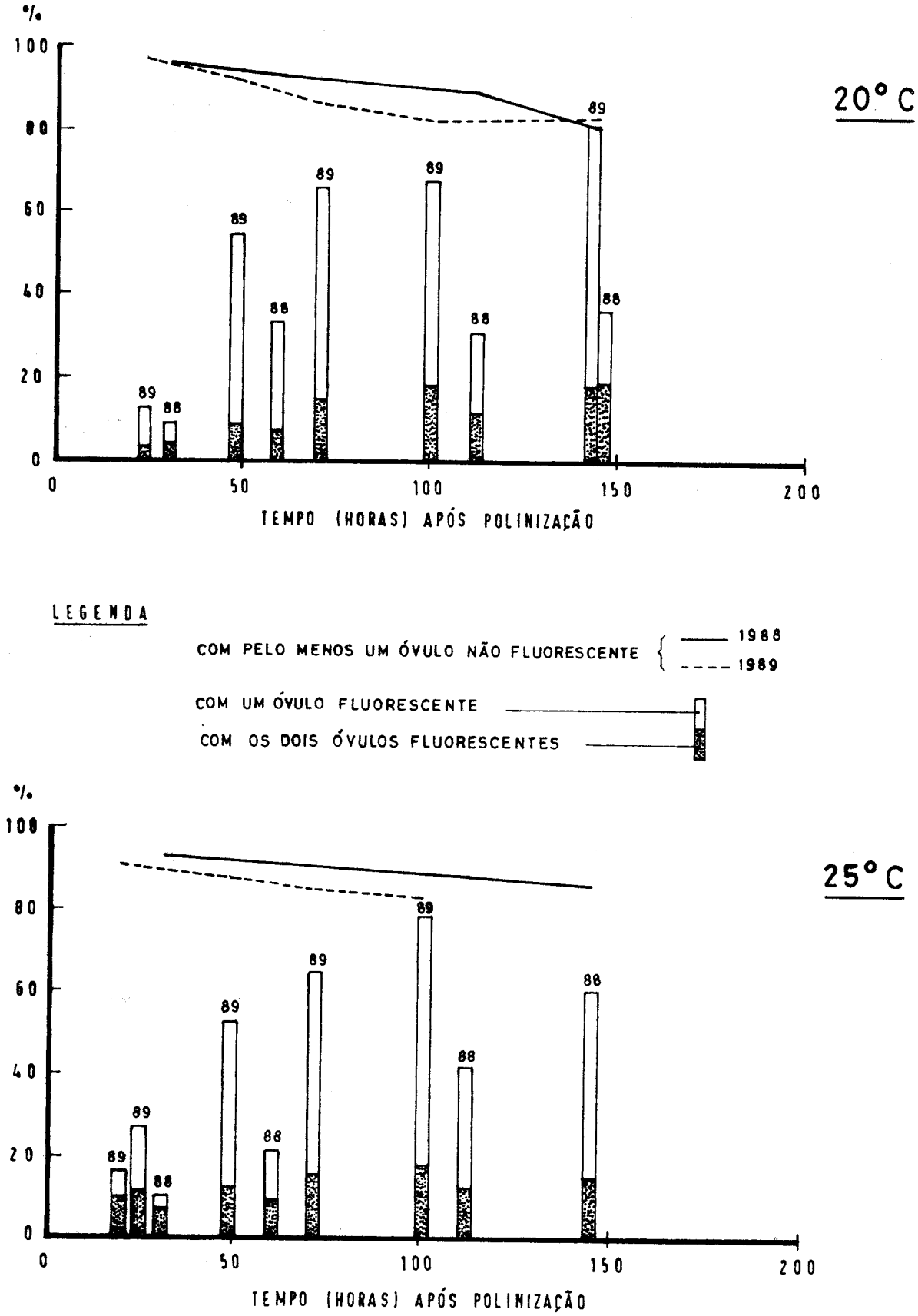


Fig. 5.39 -Percentagem de óvulos fluorescentes em pistilos de P UE 11, à temperatura de 20 e 25°C

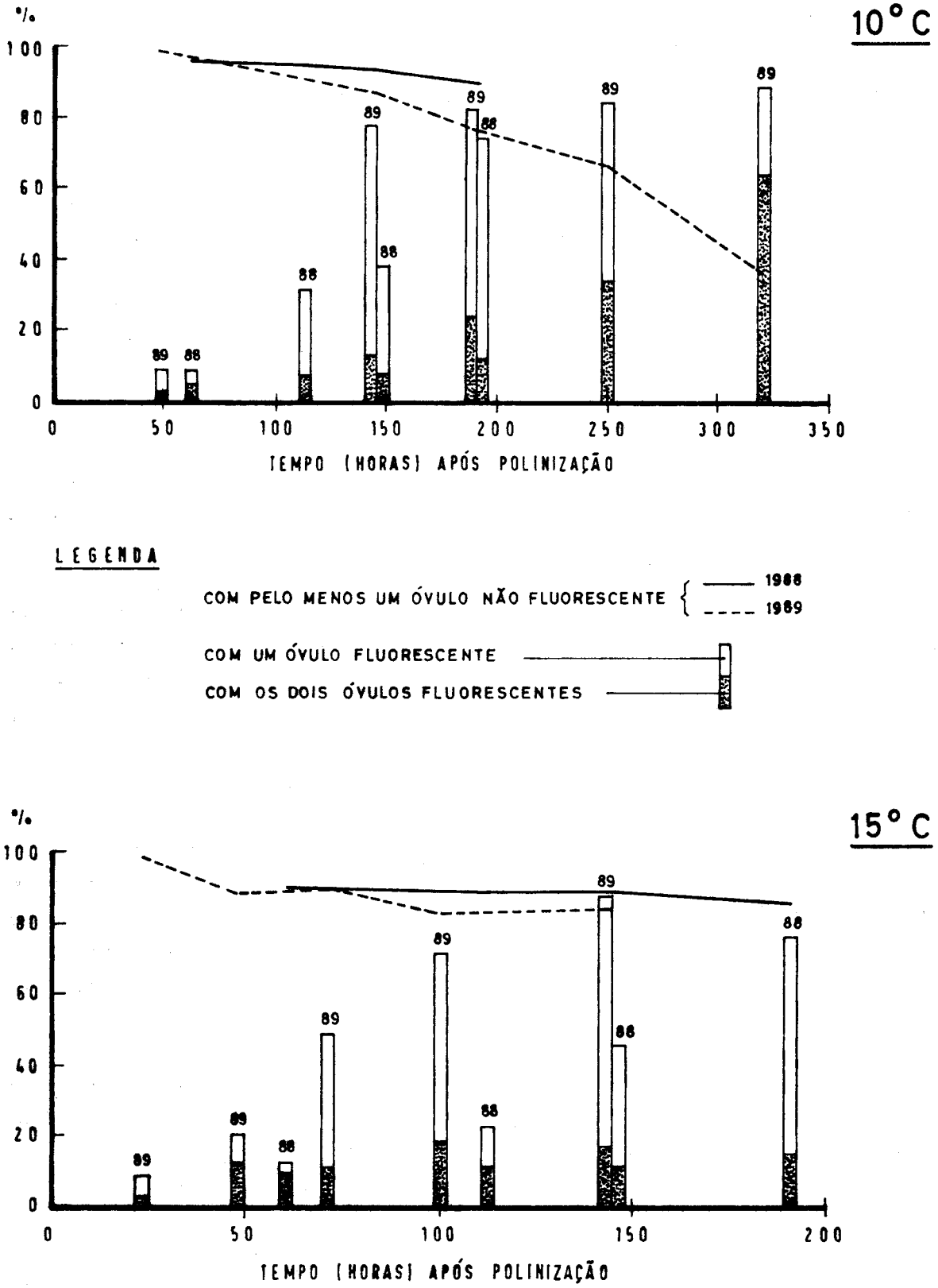


Fig. 5.40 -Percentagem de óvulos fluorescentes em pistilos de P UE 11, à temperatura de 10 e 15°C

A 20°C, embora o numero de pistilos que apresentam pelo menos um dos óvulos fluorescentes seja bastante inferior em 1988 do que em 1989, não parece haver grande diferença em relação ao inicio do aparecimento da mesma, cerca de dois dias depois da antese.

A 15°C as diferenças continuam a acentuar-se tanto em relação ao inicio da fluorescência do primeiro óvulo como na percentagem dos pistilos que a apresentam (Fig.5.40). Enquanto que em 1988 só 6 dias depois da antese a degenerescência do primeiro óvulo começa a acentuar-se, em 1989 isso sucede logo a partir dos 3 dias.

Apenas à temperatura de 10°C, parece ter-se atingido finalmente o fim do periodo de receptividade do segundo óvulo, para uma grande percentagem de pistilos. De facto, observa-se para o ano de 1989 e a partir das 200 horas, um rápido aumento dos pistilos com ambos os óvulos totalmente fluorescentes (Fig. 5.40). Como em 1988 as observações não foram além das 190 horas, não se pode concluir se o mesmo se passa neste ano. No entanto em relação à fluorescência do primeiro dos óvulos, os resultados não parecem diferir muito, registando-se mesmo valores semelhantes ao fim das 190 horas de incubação.

A 10°C não pode atribuir-se à temperatura demasiado elevada a perda de viabilidade dos óvulos registada, donde se poderá concluir que o periodo de longevidade do ultimo deles nesta cultivar e para as condições da região, parece situar-se pelos 8 a 9 dias depois da antese. Este valor é maior que o observado por outros autores.

SOULIE (1980) em 'Prune d'Ente' observou que ao fim de cinco dias à temperatura do laboratório, a maior parte dos pistilos já tinham os dois óvulos fluorescentes e prática-mente todos tinham pelo menos um deles nesse estado.

MARTINEZ-TELLEZ e CROSSA-RAYNAUD (1982) em Mirobolano observaram que 6 dias depois do estado D, a percentagem de ovulos receptivos descia para cerca de 50%.

Em ambos os anos verificou-se que desde muito cedo uma certa percentagem de pistilos apresenta os dois óvulos não

receptivos, parecendo ser um fenómeno independente da idade e da temperatura. Trata-se de pistilos aparentemente normais, mas que logo na primeira recolha apresentam ambos os óvulos fluorescentes. Provavelmente esta percentagem de pistilos não receptivos corresponde às flores mal formadas na diferenciação e que caiem durante a floração (DORSEY, 1919b).

Relativamente à degenerescência precoce de um dos óvulos, parecem confirmar-se as observações de outros autores. ANVARI e STOSSER (1979) referem que no género *Prunus* apenas um dos óvulos é fecundado, degenerando o outro muito cedo, logo a seguir à antese. Em algumas espécies ornamentais mesmo o segundo óvulo pode muito cedo apresentar também intensa fluorescência.

Também THOMPSON e LIU (1973) referem que na cultivar 'Italian Prune' um dos óvulos começa a sua degeneresçência muito cedo, logo a seguir à antese. Porém segundo estes autores, a redução do periodo de longevidade dos óvulos provocado pelo aumento de temperatura não constitui o principal problema nas condições do NW dos EUA. São sim as temperaturas demasiado baixas retardando o crescimento do tubo, que podem implicar que quando este chega ao óvulo, aquele já não se encontra viável.

Na cultivar 'Rainha Claudia Verde' é muito raro observarem-se frutos com fecundação dos dois óvulos, o que confirma a precoce degenerescência de um deles, antes de os tubos polinicos terem chegado ao ovário. No entanto, quando tal se observa, é geralmente sempre em anos de óptimas condições climáticas durante a floração e vingamento. Parece assim que a degenerescência do primeiro óvulo é para além da sua tendência natural, também bastante influenciada pela temperatura ambiente.

Nos pistilos observados em laboratório, a influência da temperatura tanto no inicio da degenerescência como na intensidade com que se verifica, mostrou ser grande. Enquanto que a 10°C só se inicia ao fim de cinco dias, a 20° aparece logo ao fim de dois dias e a 30°C é quase contemporânea com a abertura da flor. Podemos no entanto verificar que esse comportamento varia bastante com os anos, o que sugere uma

relação estreita entre longevidade potencial dos óvulos e qualidade da flor determinada pelos diversos factores que influenciam a sua diferenciação.

A influência do ano é também bem evidente na longevidade do segundo óvulo, sobretudo a temperaturas elevadas (Fig. 5.38).

De acordo com JEFFERIES (1975), a maturação do saco embrionário só acontece já depois de iniciada a antese, dependendo o processo das condições climáticas durante esse periodo. Nas condições de Inglaterra, este autor observou que na cultivar 'Vitória', a maturação do óvulo é tão reduzida que quando os primeiros tubos polinicos ali chegam aquele ainda não se encontra receptivo.

Interpretando os nossos resultados segundo as referências de JEFFERIES sobre este assunto, poderiamos concluir que em 1989 a maturação do saco embrionário estaria mais adiantada, iniciando-se o processo de degenerescência também mais rápido. De facto, analisando em pormenor os registos da temperatura ao nível dos pomares em 1988 e 1989 e comparando-os com o periodo que antecedeu a antese do clone P UE 11, pode observar-se que enquanto em 1988 a temperatura nesse periodo não ultrapassou os 15°C de máxima, no ano de 1989 houve uma subida grande de temperatura durante alguns dias, que acelerou todo o processo de abrolhamento, registando-se máximas de 25°C durante esse periodo.

Embora como já se referiu, a fecundação dos dois óvulos seja rara na 'R. Claudia Verde', verificou-se no ensaio de polinização que em 1988 havia uma anormal percentagens de frutos duplos nos tratamentos com 'Stanley'. Este facto vem confirmar a maior longevidade dos dois óvulos neste ano, mesmo nas condições do campo.

Contráriamente ao referido por alguns autores em relação a regiões mais setentrionais, o periodo de longevidade dos óvulos não parece constituir um problema para a frutificação da 'R. Claudia Verde' na região do Alto-Alentejo, pelo menos na grande maioria dos anos. Para as temperaturas médias habituais durante o periodo de floração da cultivar nesta região, que rondam os 12 a 15°C (Fig. 3.4), pelo menos

um dos óvulos permanece viável o tempo suficiente, para que o tubo polinico chegue ao saco embrionário a tempo de realizar a fecundação. Como se pode ver pelas figs. 5.41 e 5.42, às temperaturas de 15°, 20° e 25°C o numero de pistilos com pelo menos um óvulo viável, ao fim do tubo polinico ter percorrido o estilete, é sempre superior a 80% em qualquer dos anos estudados.

A maior parte dos estudos realizados neste dominio, atribuem às baixas temperaturas a principal responsabilidade da diminuição do PPE, em virtude do tempo necessário para o tubo polinico percorrer todo o estilete (THOMPSON E LIU, 1973; KEULEMANS, 1984). Nas nossas condições meridionais parece porém que são mais de temer as elevadas temperaturas, pela degenerescência precoce dos óvulos que provocam.

É referido pelos agricultores que a temperatura demasiado elevada durante a floração influencia negativamente o vingamento da 'R. Claudia Verde'. Como já vimos, o crescimento do tubo polinico é retardado quando a temperatura sobe acima dos 20°. É provável no entanto, que este não seja o unico, nem sequer o principal factor responsável pela redução do vingamento referido. Uma degenerescência mais rápida dos óvulos, motivada tanto pela temperatura demasiado alta no periodo de maturação do saco embrionário, como durante o periodo da antese, poderá contribuir para a redução do vingamento, ao encurtar bastante o PPE.

O estado nutricional da árvore é apontado também como um dos factores mais importantes na longevidade dos óvulos (SANSDRAP, 1978). As condições culturais podem assim afectar o PPE. WILLIAMS (1963) refere por exemplo que a aplicação de azoto durante o verão anterior, pode ter um efeito positivo nessa longevidade.

Na região de cultura do Alto Alentejo, é possivel que as más condições em que as àrvores estudadas vegetam, sem adubação nem poda e regas insuficientes, tenham também uma importante influência na longevidade dos óvulos. Considerando

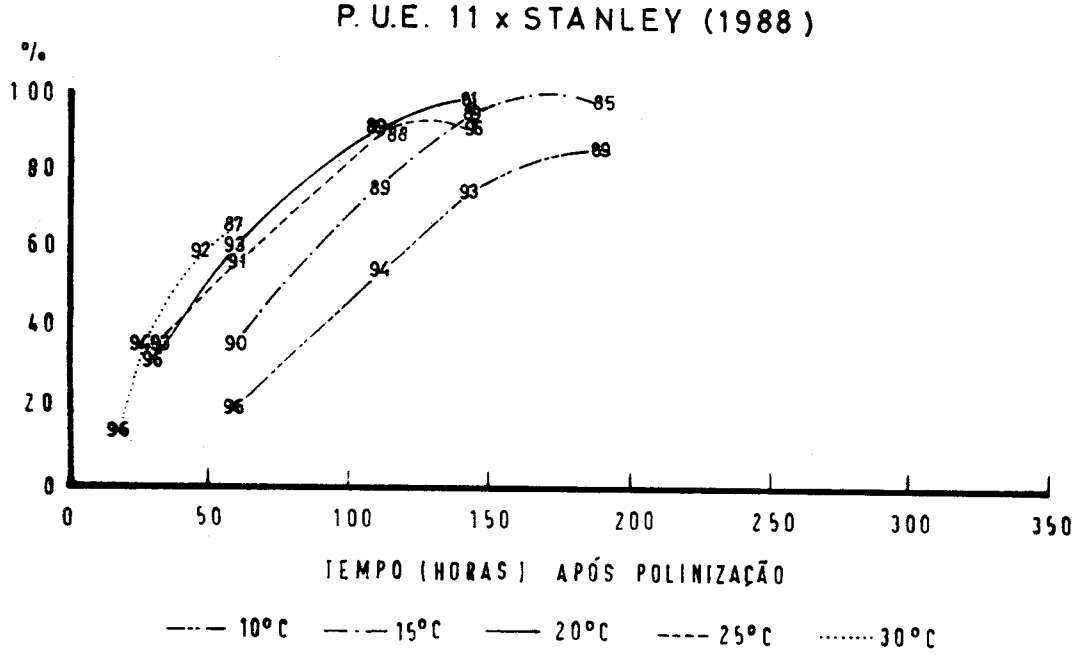


Fig. 5.41 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo" e percentagem de pistilos apresentando pelo menos um óvulo viàvel em 1988.

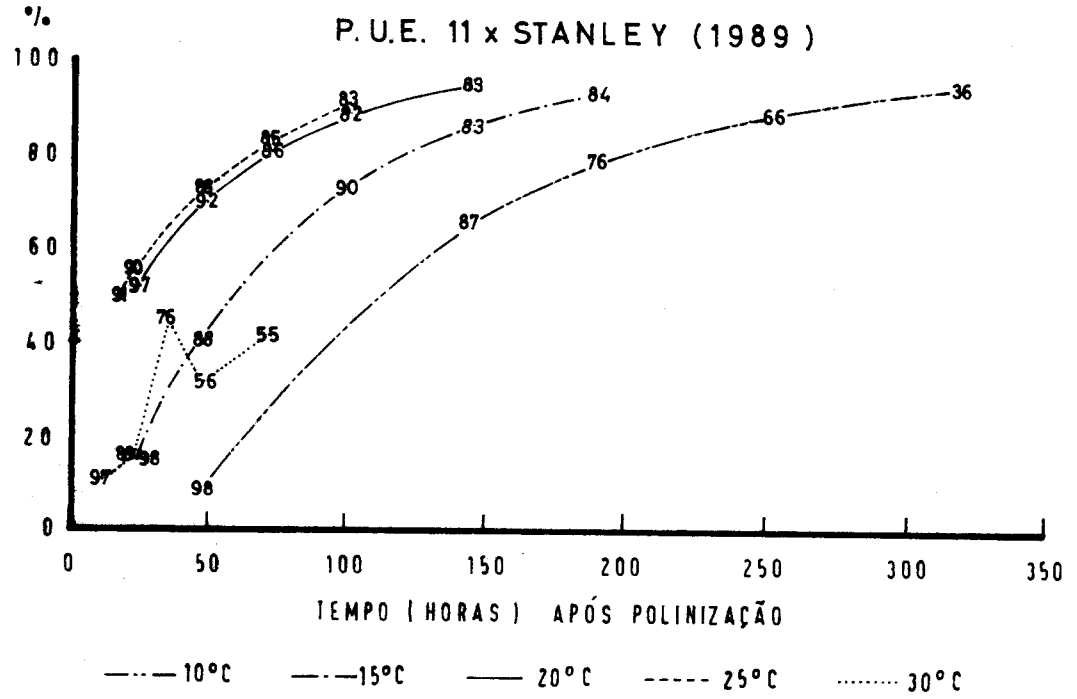


Fig. 5.42 -Curvas de crescimento do tubo polinico "in vivo" e percentagem de pistilos apresentando pelo menos um óvulo viàvel em 1989.

sobretudo que a tardia diferenciação do pistilo FAUST (1989) é a mais afectada por essas deficientes condições culturais.

Tomando a degenerescência do ultimo óvulo como o termo do periodo util de fecundação (LALATA, MARRO e SANSAVINI, 1978), pode-se observar que até às 190 horas, não houve diferenças nitidas entre os anos de 1988 e 1989, apesar das diferenças climatéricas referidas. Apenas para a temperatura de 10°C a degenerescência do segundo óvulo parece ser mais rápida neste ultimo ano. No entanto, a falta de mais observações a esta temperatura no ano de 1988, impede-nos de confirmar esta suposição.

Sendo semelhante a longevidade dos óvulos às temperaturas de 15, 20 e 25°, é naturalmente nas temperaturas mais elevadas que se tem um PPE mais longo (Figs.5.41 e 5.42

Na hipótese mais optimista de a estas temperaturas o periodo de longevidade do segundo óvulo se aproximar das 300 horas, o que só com um periodo mais longo de incubação se poderá confirmar, teriamos um PPE de cerca de 3 dias a 15°, e 5 dias a 20 e 25°C. A 10°C só com a polinização imediatamente a seguir à antese, a fecundação parece ser possivel

LEE e BUNEMANN (1981) encontraram para algumas variedades de ameixeiras azuis um PPE de 3 a 6 dias, variando no entanto de ano para ano. Por outro lado LEE (1982) refere que nas condições da Alemanha cuja temperatura média na altura da floração é de cerca de 10-12°C, são necessários cerca de 8 dias para o tubo polinico percorrer todo o pistilo.

THOMPSON e LIU (1973) referem que entre outros factores como a temperatura, origem do pólen etc, o factor variedade é dos mais importantes na determinação do PPE, não só pela diferença no crescimento do tubo polinico mas em todo o processo de fecundação do saco embrionário.

Em amendoeira e para temperaturas médias, SOCIAS I COMPANY e FELIPE (1979) referem uma longevidade de cerca de 6 a 8 dias.

Não deixa no entanto de ser bem evidente, a vantagem que as temperaturas mais elevadas têm no aumento do Periodo de Polinização Efectivo. Infelizmente, como refere KEULEMANS (1984), em certos anos a temperatura baixa durante a floração é acompanhada de chuva, o que reduz bastante o PPE, devido não só à menor velocidade de crescimento do tubo polinico, mas também à tardia libertação do pólen das anteras, e à dificuldade de circulação dos insectos. Esta situação é particularmente importante em climas de feição mediterrânica como o do Alentejo, sendo nestes anos que certos factores como a população de agentes polinizadores, ou a eficiência da variedade polinizadora, podem ser decisivos para a obtenção de um bom índice de frutificação.

Tal como refere LALATA, MARRO e SANSAVINI (1978), no caso de variedades auto-estéreis que exigem a presença de uma polinizadora, basta em certos anos um desfazamento de dois ou três dias no periodo de floração entre ambas, para que a polinização cruzada se torne completamente ineficaz.

O inicio do periodo de receptividade do estigma marca o inicio do PPE, daí que seja importante considerar também este factor. Segundo observámos no campo, na 'R. Claudia Verde' a secreção estigmática aparece em geral um dia depois da antese, estando no entanto muito dependente da temperatura e da altura do dia em que se dá a antese. Assim por exemplo com temperaturas máximas de 25°C, enquanto as flores que abrem de manhã podem ao fim do dia apresentar já o estigma humedecido, as que abrem ao fim do dia só cerca de 24 horas depois atingem esse estado. O numero de horas com temperaturas elevadas consecutivas parece ser decisivo no processo, daí a importância que os dias com sol têm para a optimização do PPE.

Em observações efectuadas no laboratório a temperatura constante, verificou-se que desde o estado de botão branco até ao aparecimento do fluido estigmático são precisos 7 h a 30°C, 12 h a 25°, 20 h a 20°C e 32 h a 15°C.

A variedade tem uma grande importância também na rapidez com que a antese acontece. Assim por exemplo enquanto que a 5°C a evolução dos botões de 'R. Claudia Verde' parece

parar completamente, na' Stanley' avançam para a antese mesmo assim.

Quando a antese é acompanhada de dias quentes o estigma é receptivo imediatamente, pois apresenta logo a secreção estigmática. Também aqui as temperaturas elevadas podem fazer aumentar o PPE.

5.5 -Estudo da compatibilidade entre clones regionais de 'Rainha Claudia Verde'

A auto-compatiblidade pode aparecer no seio de uma população auto-incompativel através da mutação ao nível dos alelos S responsáveis pela incompatibilidade, ou da hibridação com individuos portadores de alelos S diferentes (ABDALLA e HERMSEN, 1972). Esta ultima possibilidade é provávelmente a que ocorreu em algumas cultivares de R. Claudia, como por exemplo a 'R. Claudia de Bavay' e a 'R. C. d'Oullins', que são consideradas hibridos naturais da 'R. C. Verde', e que contráriamente a esta são auto-compativeis.

Algumas das chamadas 'falsas R. Claudias' são consideradas boas polinizadoras da R. C. Verde, sendo mesmo utilizadas como tal, em algumas regiões onde o periodo de floração de ambas é concordante. Apesar de se chamarem de R. Claudias, trata-se no entanto de variedades distintas, uma vez que na sua origem estão outras variedades (RENAUD, 1975).

As unicas referências sobre a compatibilidade entre clones ou cultivares de 'verdadeiras R. Claudias', é feita por BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949), que observaram não haver inter-compatibilidade entre alguns dos clones de 'R. Claudia Verde' prospectados em França. No entanto, os clones estudados foram em reduzido numero e apenas se consideraram os culturalmente mais interessantes, ou seja os que a selecção foi elegendo como os mais representativos das caracteristicas da 'R. Claudia Verde'.

A variabilidade de clones existente na região de cultura do Alto-Alentejo, é como já vimos excepcionalmente elevada, em virtude do método de propagação utilizado. Não existindo qualquer selecção dos mesmos, coexistem frequen-

temente no mesmo pomar, árvores de 'R. Claudia Verde' morfológimente diferentes e até às vezes tipos relativamente afastados das caracteristicas tipicas da cultivar.

Por outro lado nas espécies hexaploides, a incompatibilidade é como já vimos comandada por um sistema genético mais complexo que nos diploides, sendo também mais determinante a influência de certas condições ambientais na expressão do fenómeno. Sendo a ameixeira europeia hexaploide e em grande parte heterozigótica devido ao próprio mecanismo da auto-incompatibilidade, cada individuo possue em geral uma série de alelos S diferentes, que na segregação meiótica possibilita a existência de uma grande diversidade de genótipos nos grãos de polén de cada clone. Daí que a compatibilidade parcial seja geralmente a situação mais frequente, como resultado do elevado numero de factores em jogo. É sobretudo por esta razão, que os resultados da inter-compatibilidade entre variedades diferentes são por vezes contraditórios. Por exemplo a cultivar 'Coe's Golden Drop' que CRANE e BROWN (19, citados em BERNHARD, 1949) referem ser bastante eficiente como polinizadora da 'R. Claudia Verde', mostrou ser fracamente inter-compativel nos trabalhos de BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) com esta mesma cultivar.

Já CRANE e LAWRENCE (1929) e posteriormente AFIFY (1933) referem que contrariamente às espécies diploides, nas ameixeiras hexaploides a reacção de incompatibilidade se produz de forma amenizada. Segundo BUNEMANN e LEE (1980) a distinção entre combinações compativeis e incompativeis, é mesmo por vezes dificil de fazer em virtude desse facto.

De acordo com BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) quanto mais complexa é a poliploidia menos frequente é a incompatibilidade total. Pela mesma razão, os casos de inter-incompatibilidade no grupo das ameixeiras hexaploides, são muito mais raros que nos casos das cerejeiras ou ameixeiras diploides.

Como referem PATIL, RAJMANE e SANGHAVI (1974), quanto maior é o numero de alelos que controlam o processo, maior é a probabilidade de se encontrarem situações de incompatibilidade parcial, devido às mutações que ocorrem ao nivel dos referidos alelos.

Na caracterização morfológica dos clones prospec-tados na região do Alto-Alentejo, vimos que exceptuando o caso das polinizadoras regionais, as diferenças são bastante reduzidas, sendo de supor que aquela variabilidade se deva a mutações ao nível das pôlas, utilizadas desde há muito como meio de propagação. É mesmo provável, que embora de dificil identificação ao nível morfológico e fisiológico, o numero de individuos com diferenças genéticas importantes, seja muito mais elevado que o por nós identificado.

	PUE 5	PUE 10	PUE 11	PUE 15	PUE 32	PUE 33	PUE 34	PUE 39	PUE 45
PUE 5	75	48	70						
PUE 10	95					50			84
PUE 11			45						86
PUE 15	80	97	50			65			50
PUE 32		65			40				
PUE 33	90								90
PUE 34	80								
PUE 39			60					40	
PUE 45	100								75

Quadro 5.10 - Comprimento do maior tubo polinico, expresso em percentagem do comprimento total do estilete, para as combinações em que o mesmo ultrapassou o primeiro terço deste. Observações realizadas em 1988 ao fim de 90 horas de incubação a 20 ±1°C.

Esta enorme variabilidade pode ter originado muta-ções também ao nível dos alelos S, criando a possibilidade de haver compatibilidade entre alguns desses clones. A compatibilidade ainda que parcial poderia em condições ideais de temperatura ser suficiente para proporcionar um indice razoável de frutificação.

No ensaio realizado em 1988 com 9 clones, surgiram todas as situações desde a incompatibilidade total até à plena compatibilidade (Quadro 5.10). é também evidente, que as combinações em que o tubo polinico ultrapassou claramente o primeiro terço do estilete, estão em geral associadas a certos clones. é o caso do P UE 5 e P UE 45, que revelam uma maior tendência para a compatibilidade, sobretudo quando são utilizados como polinizadores.

Em 1989 retomaram-se os clones que tinham mostrado um certo nível de compatibilidade, com excepção do P UE 5 entretanto desaparecido e juntaram-se ainda mais alguns ultimamente prospectados, perfazendo um total de 12 clones. Reconhecendo que no ano anterior o tempo de incubação pode ter sido insuficiente, considerando um crescimento potencial do tubo polinico nestas situações mais reduzido do que é normal, procedemos à fixação dos mesmos apenas 100 horas depois da polinização.

Embora a expressão dos resultados seja diferente nos dois anos, podemos observar uma certa relação no comportamento de alguns clones (Quadro 5.12). O P UE 45 por exemplo, continua a manifestar uma certa compatibilidade com a maioria dos outros clones.

Também o P UE 4 e o P UE 10 apresentam percentagens de combinações pólen-pistilo compativeis suficientes, para se poder admitir a inter-compatibilidade entre clones regionais de 'R. Claudia Verde' como possivel, pelo menos nas condições laboratoriais.

Verifica-se ainda que a compatibilidade muito raramente é reciproca. Já BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) referem, que a compatibilidade entre individuos hexaploides tem um comportamento diferente de um cruzamento para o seu reciproco. Assim um individuo S1S1S1 S2S2S2 cruzado com outro que seja S1S1S2 S3S3S3, pode dar origem a uma situação de plena compatibilidade se o gâmeta macho S3S3S3 polinizar a planta fêmea com o primeiro do genótipo referido, mas o reciproco não é possivel pois todos os alelos S se encontram na segunda planta.

	PUE 4	PUE 10	PUE 11	PUE 15	PUE 32	PUE 33	PUE 36	PUE 37	PUE 43	PUE 44	PUE 45	PUE 54
PUE 4	0.0	0.65*	0.40	0.75**	0.30	0.80**	0.0	0.20	0.80**	0.50	0.70*	0.35
PUE 10	0.2	0.0	0.25	0.20	0.10	0.35	0.30	0.40	0.15	0.20	0.75**	0.35
PUE 11	0.90**	0.60	0.0	0.05	0.10	0.10	0.50	0.10	0.05	0.05	0.60	0.05
PUE 15	0.55	0.75**	0.70*	0.0	0.20	0.75**	0.25	0.10	0.45	0.55	0.45	0.20
PUE 32	0.80**	0.25	0.20	0.40	0.0	0.30	0.35	0.20	0.25	0.70*	0.40	0.10
PUE 33	0.80**	0.70*	0.95	0.50	0.25	0.0	0.15	0.05	0.20	0.15	0.45	0.15
PUE 36	0.70*	0.15	0.20	0.0	0.10	0.50	0.0	0.85**	0.05	0.10	0.45	0.15
PUE 37	0.35	0.70*	0.15	0.20	0.05	0.15	0.20	0.0	0.05	0.10	0.50	0.10
PUE 43	0.30	0.15	0.20	0.35	0.25	0.80**	0.25	0.10	0.0	0.40	0.80	0.25
PUE 44	0.70*	0.80**	0.10	0.30	0.0	0.70*	0.10	0.05	0.10	0.0	0.60	0.0
PUE 45	0.35	0.60	0.45	0.30	0.20	0.10	0.15	0.10	0.0	0.15	0.0	0.30
PUE 54	0.80**	0.10	0.00	0.35	0.10	0.25	0.00	0.30	0.15	0.10	0.10	0.0

Quadro 5.11 -Valores da maior diferença registada entre o crescimento do tubo polinico em autopolinização e polinização inter-clonal em 1989. Valores assinalados com ** e * indicam as combinações em que essa diferença é significativa segundo o teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV respectivamente para $p < 0.01$ e $p < 0.05$.

Se admitirmos o modelo de 'heterosis' de MULCAHY e MULCAHY (1983, referidos por GAUDE e DUMAS, 1987) poder-se-ia explicar para o caso das ameixeiras hexaploides, que o nivel de compatibilidade estaria correlacinado positivamente com o numero de alelos S diferentes no pólen e no pistilo. Assim, quanto maior a percentagem de pistilos em que se observam tubos polinicos no óvulo, maiores serão as diferenças ao nível dos alelos S. Da mesma forma se poderá pensar, para a percentagem de tubos polinicos que em cada pistilo são compativeis.

Nas nossas observações, embora o numero de tubos polinicos de cada pistilo não tenha sido quantificado, podemos verificar uma certa correlação positiva entre o numero de tubos compativeis de cada pistilo e a percentagem de pistilos com tubos compativeis nessa combinação.

Considerando o grau de compatibilidade de cada combinação como o resultado da interacção entre os alelos S de cada individuo do cruzamento, podemos avaliar as diferenças ao nível do gene S entre individuos, não apenas pelas situações de compatibilidade ou incompatibilidade plena, mas também por todos os resultados intermédios no crescimento do tubo polinico. Assim, tomando como valores esperados para a situação de incompatibilidade plena, os resultados do tratamento de aupolinização para cada clone, e calculado o valor da maior distância entre estes e o observado em cada cruzamento segundo o teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV, podemos dispor de um valor comparável e avaliar mesmo a significância das respectivas diferenças, entre o crescimento do tubo observado e situação de incompatibilidade plena.

Podemos observar pelos valores do quadro 5.11, que valores de D superiores a 0.624 se podem considerar muito significativos e correspondem portanto a situações, em que a probabilidade da combinação ser compativel é inferior a 1 %. Sem estar insento de alguns inconvenientes, como por exemplo o de mascarar as diferenças existentes ao nivel das frequências registadas a 3/4 e 4/4 do estilete, este método é aquele que nos parece estar mais de acordo com a forma como os resultados foram recolhidos e com o objectivo pretendido.

Como já referimos, os clones P UE 4 e P UE 45 são os que maiores situações de inter-compatibilidade apresentam. Enquanto o primeiro se apresenta relativamente diferente do ponto de vista morfológico, o mesmo não acontece para o P UE 45 em que as diferenças, tanto ao nível morfológico como fisiológico são minimas. Este facto vem reforçar a hipótese de que a inter-compatibilidade pode ocorreer entre clones fenótipicamente semelhantes.

	PUE 4	PUE 10	PUE 11	PUE 15	PUE 32	PUE 33	PUE 36	PUE 37	PUE 43	PUE 44	PUE 45	PUE 54
PUE 4		10		40		20			30		25	
PUE 10												
PUE 11	40	5									15	
PUE 15		30	40			25			15			
PUE 32	10									5		
PUE 33	20	5	50	10							10	
PUE 36	10							30			10	
PUE 37		25									20	
PUE 43												
PUE 44	10	10				30					10	10
PUE 45	10	20	10							15		20
PUE 54	30			10								

Quadro 5.12 -Percentagem de pistilos em que o tubo polinico atingiu o ovário, para as diversas combinações interclonais (1989).

Com o objectivo de analisar o comportamento de cada clone relativamente aos restantes, efectuámos o mesmo teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV para o valor médio das onze combinações de cada um, excluindo a autopolinização, considerando os clones separadamente enquanto planta fêmea e planta macho (Quadro 5.13). O P UE 4 e o P UE 15 são os que apresentam valores mais elevados em ambas as situações, ainda que não significativas, revelando assim a sua maior distância em relação aos restantes clones. Todos os outros têm em geral comportamentos muito distintos, quando actuam como macho e como fêmea.

clone	valores de D	
	como planta fêmea	como planta macho
P UE 4	0.48	0.53
P UE 10	0.19	0.45
P UE 11	0.26	0.28
P UE 15	0.43	0.28
P UE 32	0.25	0.10
P UE 33	0.33	0.38
P UE 36	0.29	0.17
P UE 37	0.25	0.19
P UE 43	0.24	0.15
P UE 44	0.28	0.23
P UE 45	0.30	0.48
P UE 54	0.11	0.16

Quadro 5.13 -Valores médios de D (Teste de KOLMOGOROV--SMIRNOV) para os diversos clones em inter--polinização, enquanto planta fêmea e macho

Se considerarmos válido para as situações de compatibilidade parcial, a influência positiva da temperatura, à semelhança do que ocorria para a auto-incompatibilidade, poderemos ainda supor que o resultado final da expressão da inter-compatibilidade é o resultado da interacção das diferenças alélicas entre os clones, com as condições de temperatura verificadas durante o crescimento do tubo polinico. Isto teria como consequência nas condições de campo, que o êxito da inter-compatibilidade entre clones como factor de vingamento, estaria muito dependente das condições climáticas em cada ano durante a floração.

De facto da observação sobre o comportamento da frutificação da 'R. Claudia Verde' na região, pode-se constatar que a irregularidade de produção está mais relacionada com o clima durante a floração, que com a alternância fisiológica da cultivar. Ao contrário do que acontece nas regiões onde a utilização de polinizadoras é rotina, aqui pode-se observar em geral sempre um elevado numero de flores todos os anos.

A confirmação de que a aparente compatibilidade de alguns tratamentos, corresponde a uma possibilidade real de

fertilização, não pode ser feita porque infelizmente como assinala UDACHINA (1980), a técnica da microscopia em fluorescência não permite estudar o processo da fecundação, devido ao facto do saco embrionário nas fruteiras não ficar fluorescente. De resto tambem nas combinações compativeis, a penetração do tubo no óvulo não foi nunca observada.

Restará em estudos posteriores provar, que no caso das combinações compativeis, a fusão dos gâmetas e o desenvolvimento do zigoto é possivel. A realização de ensaios de interpolinização sobre ramos ao nível dos pomares, será um dos passos indispensáveis. Tal só será no entanto possivel, quando as colecções de clones entretanto instaladas, entrarem em floração, o que demorará alguns anos, considerando o grande periodo de juvenilidade desta cultivar.

A inter-compatibilidade entre clones de 'R. Claudia Verde' culturalmente interessantes e morfológicamente idênticos, parece verificar-se pelo menos para as temperaturas altas do laboratório. Além de contribuir para explicar a actual produção residual existente nos pomares da região do Alto Alentejo, onde não existem polinizadoras, este facto leva a pensar que a implantação de pomares extremes de 'R. Claudia Verde' é possivel, com a condição de explorar ao máximo esta inter-compatibilidade, através de uma criteriosa escolha de clones, assim como na proporção dos mesmos a introduzir nos pomares.

Ainda que a eficácia da polinização nestas condições seja sempre menor que a verificada com polinização de outras variedades, tal não significa necessáriamente uma diminuição na produtividade da cultura. Com efeito, ao contrário de outras prunoideas como a amendoeira e a cerejeira, em que para se conseguir uma boa produção é indispensável conseguir-se um elevado índice de vingamento das flores, na ameixeira basta uma taxa de vingamento de 3 a 4% para se atingir uma boa carga de frutos.

Para além do referido, há ainda a registar que a 'R. Claudia Verde' sendo uma cultivar muito alternante e muito fértil em termos de diferenciação floral, beneficiará com a prática de uma polinização abaixo do óptimo. Será uma monda de frutos natural, que contribui para a árvore não entrar em

alternância. Este sistema implicaria naturalmente a prática de uma poda generosa, de modo a conseguir-se uma floração super abundante.

5.6 -Estudo da eficácia de polinizadoras de outras variedades

5.6.1 -Concordância do periodo de floração

Entre os elementos necessários para o estudo da eficácia de uma variedade como polinizadora, interessa em primeiro lugar comparar a sua época de floração com a da variedade a polinizar. Esta informação, que no nosso caso não estava disponivel, dificultou desde logo a implantação do ensaio, pois tivemos que recorrer a referências bibliográficas sobre o assunto, cuja validade para esta região do Alentejo, se sabia desde logo ser questionável.

Para serem concordantes todos os anos, as variedades terão de ser semelhantes não só nas suas necessidades de frio, mas também em relação às exigências de calor para se iniciar o abrolhamento. De acordo com TABUENCA (1980) a 'R. Claudia Verde' é uma cultivar mais exigente em frio Invernal que a 'Stanley' e a 'Prune d'Ente', necessitando de mais 200 horas que a primeira e 100 que a segunda. Em relação à exigência de calor necessária para iniciarem o abrolhamento, a 'Prune d'Ente' parece necessitar de temperaturas muito mais altas que a 'R. Claudia Verde' e 'Stanley'.

Segundo observámos, a melhor concordância de flora-ção entre cultivares de diferentes exigências em frio e calor, acontece nos anos em que durante o Inverno se acu-mularam uma grande quantidade de horas de frio e poste-riormente na Primavera há uma subida rápida e acentuada da temperatura, fazendo de imediato abrolhar todas as culti-vares. Pelo contrário nos anos em que a temperatura sobe gradualmente, a diferença entre cultivares acentua-se, abrolhando primeiro as menos exigentes em calor e só depois as mais exigentes. GRIGGS e HESSE (1963) apontam também as horas de frio acumuladas durante o Inverno, como responsáveis pela duração do periodo de floração em ameixeiras japonesas. Quanto mais frio registado durante o Inverno, mais curto seria o periodo

de floração. Parece assim justificada a maior irregularidade da 'Prune D'Ente' no que respeita à floração.

Também nas observações de BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) em Bordeus, tanto a 'Prune d'Ente' como a 'R. Claudia D'Althan' tiveram em média um inicio de floração de alguns dias mais tarde que a 'R. Claudia Verde'. No entanto mais a sul em Montauban, BEJON (1986) refere uma perfeita concordância da 'R. Claudia d'Althan' e também uma boa concordância da 'Stanley'. Porém em relação à 'Prune d'Ente', observou também uma floração mais tardia.

Os periodos de floração que se apresentam na fig. 5.44, foram registados na região em estudo durante quatro anos. Convém no entanto referir que este factor da concordância de floração, é mais uma informação sobre o valor destas cultivares como potenciais polinizadoras da 'R. Claudia Verde' na região em causa, não sendo porém motivo de variação dos resultados obtidos no ensaio, como já foi descrito em 4.3.2.

Das observações dos quatro anos podemos concluir que a melhor concordância é a da P. UE 6 e da 'Stanley', sendo as polinizadoras regionais P. UE 1 e P. UE 13 aquelas que apresentam uma maior diferença no periodo de floração com a 'R. Claudia Verde'. A cultivar 'Prune D'Ente', cuja floração anda muito associada à 'Stanley', apresenta no entanto alguma variação de ano para ano em relação à 'R. Claudia Verde'. A 'R. Claudia d'Althan' inicia a floração em geral um pouco antes da 'R. C. Verde', sendo o periodo de floração simultânea relativamente curto.

Se considerarmos que o periodo de transporte efec-tivo de pólen é determinado no inicio, pela deiscência das anteras, que ocorre em geral depois do inicio da receptividade do estigma e no final pela longevidade dos óvulos, podemos concluir que para aumentar ao máximo esse periodo, é desejável que as variedades polinizadoras iniciem a floração ligeiramente mais cedo que a variedade a polinizar e não o contrário. Este facto levaria a excluir à partida a 'R. C. D'Althan'.

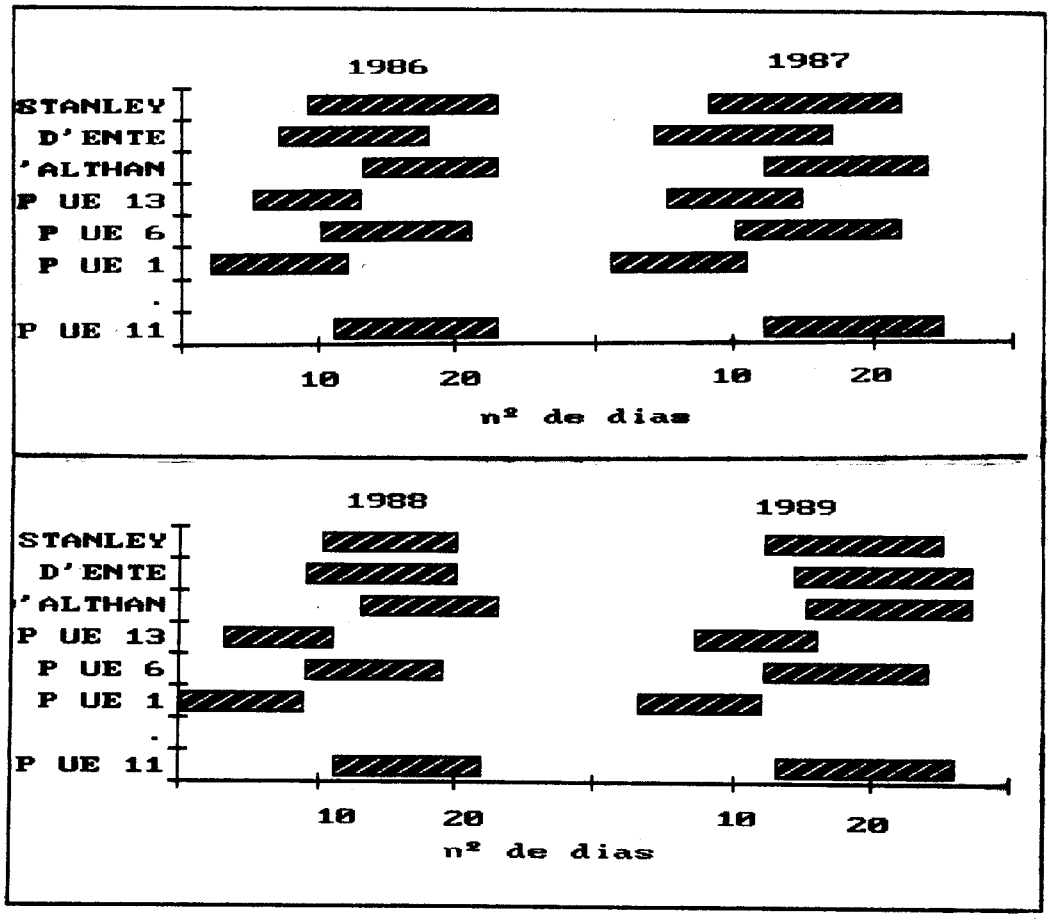


Fig. 5.43 -Concordância do periodo de floração de algumas cultivares potenciais polinizadoras da 'R. Claudia Verde', na região do Alto-Alentejo.

5.6.2 -Viabilidade do pólen

A capacidade do grão de pólen para germinar e emitir um tubo polinico é sem duvida um dos factores importantes numa variedade polinizadora. Sendo este factor uma caracteristica genética, convém estudá-lo em pormenor, assim como à influência ambiental na expressão do mesmo, antes de aconselhar uma variedade como polinizadora.

KEULEMANS (1980) porém, considera que a percentagem de germinação do pólen avaliada "in vitro", é um mau critério

para avaliar o valor de uma variedade como polinizadora. Este autor observou mesmo em certas variedades, uma correlação negativa entre aquele parâmetro e o vingamento posteriormente obtido no campo.

A não correspondência da viabilidade do pólen observada "in vitro" com a a eficiência na polinização "in vivo", tem no entanto possiveis explicações. A quantidade de pólen produzida nas anteras é de tal forma elevada, que em geral quando as condições de polinização são boas, o factor qualidade pode não se tornar limitante. É no entanto em condições dificeis de polinização, por exemplo em anos de condições climáticas adversas durante a floração, ou no caso de falta de agentes polinizadores, que o factor qualidade se torna importante.

Pensamos pois, que ainda que a análise da viabi-lidade do pólen por si só, não sirva para explicar o compor-tamento das diversas variedades como polinizadoras, ela é à semelhança do factor concordância de floração, um dos elementos a ter em consideração num estudo deste género.

Segundo REMY (1953), a qualidade do pólen de uma variedade, reflecte de certa forma o seu nível de estabilidade genética. Desta forma, os hibridos inter-especificos produzem em geral uma maior percentagem de grãos anormais. Registando-se em geral uma elevada correlação entre esse facto e a germinação do pólen, este parâmetro reflecte as distâncias genéticas entre os seus progenitores. Quanto mais distantes as espécies ou variedades parentais, menor será a viabilidade do pólen, como resultado da falta de afinidade dos grupos cromossómicos durante a meiose.

Das polinizadoras utilizadas, apenas a 'Prune d'Ente' se pode considerar uma cultivar mais estável, pois que tanto a 'Stanley' como as polinizadoras regionais são hibridos relativamente recentes, num estado F1 muito provávelmente. Mesmo assim, a percentagem de germinação daquela cultivar por nós observada, não é superior às restantes cultivares (Quadro 5.14).

A percentagem de germinação das polinizadoras regionais, semelhante às restantes cultivares, traduz uma boa

afinidade entre a *P. doméstica* e a *P. insititia*, pois que foram originadas de hibridações naturais entre a 'R. Claudia Verde' e os abrunheiros expontâneos da região.

variedades	nº de obs.	médias (%)	intervalo de conf. para p=95%
Stanley			
1986	10	35.26	28.17 - 42.35
1987	10	11.43	8.96 - 13.90
1988	8	18.78	16.68 - 20.87
1989	10	28.02	21.06 - 34.98
Prune d'Ente			
1986	8	43.00	31.23 - 54.77
1987	10	17.05	5.17 - 28.90
1988	6	22.58	1.46 - 43.7
1989	10	41.88	32.40 - 51.36
P. UE 13			
1986	10	15.01	5.17 - 24.85
1987	8	23.25	16.68 - 29.8
1988	7	29.73	9.57 - 49.89
1989	8	23.60	13.27 - 33.93
P UE 6			
1986	7	39.93	29.43 - 50.43
1987	10	38.18	31.36 - 45.00
1988	8	27.75	11.80 - 43.70
1989	10	33.10	21.14 - 45.06

Quadro 5.14 - Viablidade do pólen "in vitro" das variedades utilizadas como polinizadoras.

A 'Stanley' é a que apresenta os menores valores, estando de acordo com as observações feitas por BUNEMANN e LEE (1980), que referem ser da ordem dos 40 % diminuindo 10 a 20 % em certos anos.

A maior variação dos valores observados nos diferentes anos, para a 'Stanley' e 'Prune d'Ente' pode traduzir como já vimos, uma menor adaptação destas cultivares às condições climáticas da região. Com efeito, é precisamente no ano de 1987, de Inverno mais suave, que a taxa de ger-minação mais decresce, tornando-se significativa a diferença relativamente

relativamente aos restantes anos. Para as restantes cultivares embora surjam algumas diferenças, elas não são nunca significativas.

5.6.3 -Índices de vingamento e de frutificação final

5.6.3.1 -Análise global do ensaio

Para melhor compreender os resultados do ensaio de polinização, será necessário ter presente a forma de implantação do mesmo, pois que daí podem vir algumas explicações para a interpretação de alguns dos resultados obtidos.

A 'R. Claudia Verde' é uma cultivar em que a alternância fisiológica é bastante acentuada. COURANJOU (1978, 1982) observou que essa alternância é devida a uma grande capacidade para diferenciar gomos florais, conjugada com uma elevada sensibildade desssa mesma diferenciação, à presença de frutos sobre a árvore. Segundo aquele autor, ao contrário de outras cultivares de ameixeira, na 'R. C. Verde' existe uma elevada correlação positiva entre o numero de gomos florais diferenciados e o índice de frutificação desses mesmos gomos. Assim a produção dos anos de safra, é ainda acentuada pela fraca competição existente entre frutos durante o vingamento e queda de Junho.

Outra particularidade no comportamento da 'R. Claudia Verde' parece ser o seu diminuto grau de autonomia entre ramos e pernadas, relativamente ao fenómeno da alternância fisiológica. Este facto é particularmente importante no caso do nosso ensaio de polinização, em que as unidades experimentais são constituidas por vários ramos distribuidos pela árvore. É assim de prever que haja uma grande influência das árvores sobre o comportamento de cada ramo, de acordo com as várias fases de alternância e que podem de certo modo mascarar ou confundir os efeitos dos tratamentos. Esta diluição do efeito dos tratamentos é de esperar sobretudo ao nível da queda de Junho onde as condições de alimentação da árvore desempenham um importante papel.

Pela análise global dos resultados apresentados, pode desde logo observar-se que para além do factor concordância de floração, há uma significativa diferença entre as cultivares estudadas, na sua eficiência como polinizadoras da 'R. Claudia Verde', que se deve a caracteristicas da sua biologia floral.

Também em relação aos anos durante os quais se realizou o ensaio, se registaram diferenças que como veremos adiante, nem sempre se podem atribuir às condições climáticas durante a floração e vingamento.

Em relação ao factor local, as diferenças observadas nas diferentes contagens de frutos e em relação às quatro cultivares testadas, não se mostraram significativas, havendo apenas a registar diferenças em relação ao tratamento de polinização livre, que são de resto a confirmação das diferenças de polinização dos dois pomares já atrás descritas.

5.6.3.2 -Primeira queda de flores

A primeira contagem de vingamento efectuou-se imediatamente a seguir ao retirar dos sacos, três semanas depois do inicio da floração. Durante este periodo ocorre a queda de algumas flores e jovens frutos, considerando-se este primeiro índice de vingamento, que aqui chamaremos de pós-floral, como uma medida da percentagem de pistilos aparentemente normais, potencialmente aptos a vingarem. De acordo com a definição de DORSEY (1919b), neste periodo ocorre a queda pós-floral e ainda parte da segunda queda que se inicia logo a partir de duas semanas depois da plena floração (Fig 4.12). No entanto, parte das perdas durante este periodo, são também devidas à influência negativa do saco sobre as flores.

A maior parte das flores que caiem naturalmente durante a floração, correspondem aos casos de má ou incompleta diferenciação, em que se dá o aborto dos pistilos. Estes não iniciam qualquer engrossamento, tornam-se castanhos ou negros e a abcisão dá-se pela base do pedicelo. Em geral, a importância desta queda ainda que variando com as variedades, está directamente relacionada com a influência am-

Segundo DORSEY (1919b), o aborto dos pistilos está relacionado com as condições de nutrição da àrvore e com o fenómeno de competição entre flores do mesmo gomo. Deste modo a existência de uma pequena percentagem de pistilos abortados é normal acontecer todos os anos e estaria positivamente correlacionada com o numero de flores diferenciadas por gomo. Pelo contrário, os casos de uma grande percentagem de pistilos mal formados, pode ter a ver com uma carência ou desiquilibrio nutricional ao nível de toda a árvore.

A existência da queda de flores durante a floração é referida ainda por outros autores, sendo apontada sempre como causa principal a insuficiente diferenciação nos gomos florais, devido à competição entre eles. Segundo MARTINEZ-TELLEZ e CROSSA-RAYNAUD (1982) os pistilos podem apresentar-se aparentemente normais no inicio da floração, mas em grande parte deles os óvulos não se encontram receptivos. Nos anos que se seguem a grandes produções, o fenómeno parece intensificar-se como resultado da concorrência do crescimento dos frutos em relação à diferenciação floral. WELLS e BUKOVAC (1978) por exemplo, apontam este facto como o responsável da irregularidade de produção observada no Michigan sobre a cultivar 'Stanley'. Também KEULEMANS (1980) refere que no ano seguinte a uma grande produção, se regista em regra uma redução na qualidade das flores.

Parece pois, que independentemente do sucesso da fertilização, as flores possuem já pré-determinada uma certa tendência para vingar ou não fruto, sendo de grande importância as condições durante o desenvolvimento do gomo floral.

COURANJOU (1982) refere que a competição existe não só entre gomos, mas também entre flores do mesmo gomo, havendo assim uma correlação negativa entre a qualidade média das flores e o seu numero por árvore. No entanto, este autor conclui em todos os seus trabalhos efectuados sobre a alternância de produção na ameixeira, que a cultivar 'R. Claudia Verde' parece constituir uma excepção. De facto segundo as suas observações, além de uma grande capacidade para diferenciar gomos florais nos anos de contra-safra, a 'R. Claudia Verde' parece não possuir esse mecanismo de autoregulação, verificando-se mesmo que quanto maior é a carga de gomos florais sobre a árvore, mais elevada é a sua aptidão

para vingar fruto. Este facto é um dos que explica em grande parte, o elevado índice de alternância fisiológica característico desta cultivar.

Dos resultados que se apresentam, é possivel desde logo observar que os valores relativos à primeira queda de flores (Quadro 5.15), são bastante superiores aos referidos por outros autores em variedades de ameixeira Europeia. A aumentar a diferença há ainda a considerar o facto, da escolha dos botões florais efectuada com o objectivo de uniformizar o estado fenológico do ramo a isolar, excluindo os botões mais atrasados, aumentar a qualidade dos restantes. De facto as flores mais atrasadas na antese são em geral de menor qualidade. SOCIAS e COMPANY (1983) observaram que as flores que abrem mais tarde na amendoeira, apresentam um mais elevado índice de óvulos estéreis e produzem uma menor quantidade de pólen. Considerando as perdas até à primeira contagem, como resultado unico da primeira queda de DORSEY, haveria uma clara contradição das nossas observações com as de COURANJOU (1983).

Infelizmente o factor saco impede-nos de saber, que percentagem da queda registada, corresponde de facto à queda natural de flores e qual a que se deve à destruição pelo saco batendo em algumas flores com o vento, e no microclima criado.

Outra limitação ainda, reside no facto de parte da queda registada até às três semanas, dizer já respeito à queda de vingamento (Fig. 4.12). No entanto, de acordo com as nossas observações, a queda de vingamento na 'Rainha Claudia Verde' só se torna verdadeiramente importante, mesmo nos casos de ausência de polinizadoras, a partir das três semanas depois da floração, o que torna pouco importante esta contribuição.

A pequena diferença não significativa entre os dois locais do ensaio, que se manteve todos os anos, põe de lado a hipótese da grande queda pós-floral se dever ao mau estado de nutrição das árvores. Recordemos que enquanto o pomar de

factor estudado	modali-dades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	20.99	0.573	a
	Elvas	21.50	0.615	a
Anos	1986	24.01	0.819	a
	1987	18.96	0.863	a
	1988	18.79	0.616	b
	1989	23.21	0.957	b
Polini-zadoras	Stanley	23.51	0.806	a
	D'Ente	24.15	0.962	a b
	P UE 13	20.14	0.877	b c
	P UE 6	20.82	0.888	c d
	Livre	17.60	0.680	d

Desvio-padrão - 4.303

Quadro 5.15 -Valores da percentagem de frutos na 1ª contagem, às três semanas depois da antese. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

factor estudado	modali-dades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	11.49	0.523	a
	Elvas	11.33	0.631	a
Anos	1986	11.63	0.783	a
	1987	10.79	0.643	a b
	1988	10.02	0.652	b
	1989	13.20	1.062	b
Polini-zadoras	Stanley	16.04	0.622	a
	D'Ente	14.21	0.771	a b
	P UE 13	12.37	0.502	b
	P UE 6	9.30	0.594	c
	Livre	5.12	0.549	d

Desvio-padrão - 2.929

Quadro 5.16 -Valores da percentagem de frutos na 2ª contagem, 40 dias depois da antese. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

Borba era constituido por árvores velhas, muito próximas e sem qualquer poda, o pomar de Elvas pelo contrário baseava-se em árvores ainda novas e bem tratadas.

A semelhança nos valores da primeira queda em ambos os locais, parecem confirmar também as observações de COURANJOU (1982 e 1983), sobre a particularidade da 'R. Claudia Verde' não reduzir a qualidade das flores nos anos de grande diferenciação floral. De facto ainda que sincronizados em relação à alternância fisiológica, a intensidade de floração era superior em Elvas, sobretudo nos anos de contra-safra.

Os maiores valores de queda observados em 1987 e 1988, cujas diferenças significativas em relação aos restantes anos são válidas para todas as polinizadoras e nos dois locais, como se pode observar pelas interacções não significativas deste factor com os restantes (Anexo 19-A), parece apontar no sentido de não poder explicar-se a queda pós-floral apenas pelo fenómeno de alternância fisiológica. Enquanto 1988 foi um ano de contra safra, sobretudo no pomar de Borba, podendo a maior queda dever-se à insuficiente diferenciação floral de algumas flores, o mesmo não é possivel dizer de 1987. Não é também visivel a diferença entre os dois pomares em 1988, que se deveria registar no caso de ser aquela a explicação.

Uma provável razão pode estar nas insuficientes horas de frio registadas durante o Inverno de 1986/87. É referido por alguns autores o facto, de um insuficiente numero de horas de frio poder afectar negativamente as etapas finais da diferenciação floral. KESTER e GRIGGS (1959) atribuem a este factor, a grande diferença na queda de gomos florais e flores observada em amendoeira na California durante a floração, que pode ir de 0% a 40% em certos anos. A queda de bastantes gomos florais na 'R. Claudia Verde' ainda antes da floração, foi também por nós mais recentemente observada (1990), aparentemente como resultado da falta de frio durante o inicio do Inverno.

Na região do Alto Alentejo o somatório de horas de frio parece ser como já vimos, uma das condicionantes mais importantes à expansão desta cultivar, encontrando-se por assim dizer no limite inferior de adaptação a este elemento

climático. Dos anos estudados, o Inverno de 1986/87 foi o unico em que aquele total desceu abaixo das 800 horas, consideradas como limite inferior de exigência da cultivar.

No caso do presente ensaio, parecem pois terem sido importantes na maior queda floral, a grande produção do ano de 1987 e a insuficiência de horas de frio no Inverno de 1986/87, devido a uma diminuição na qualidade das flores. Lembremos que também ao nível da viabilidade do pólen essa menor qualidade se faz sentir para alguns clones de 'R. Claudia', sobretudo no ano de 1987.

Para as diferenças entre aqueles dois grupos de anos pode ainda ter contribuido a diferença entre os picos de queda de vingamento. Como já foi referido, o facto de termos retirado os sacos apenas três semanas depois do inicio de floração, teve como consequência que parte da queda de vingamento já se tinha dado, ficando incluida assim na primeira contagem. Essa percentagem da segunda queda variou no entanto com os anos, em função da temperatura. Assim em 1987 e 1988 com temperaturas mais elevadas, todo o processo de vingamento foi acelerado e portanto é de prever que às três semanas, uma maior percentagem de queda de vingamento tivesse ocorrido.

Ainda que não se possa considerar o numero de flores malformadas constante todos os anos, apesar dos estudos de COURANJOU sobre a 'R. Claudia Verde' apontarem neste sentido, é de prever que a verdadeira queda de vingamento esteja mais próxima dum valor Q = 100 - (K + VF), em que K seria essa constante e VF o vingamento final observado na segunda contagem de frutos. A importância relativa de Q na primeira contagem é explicada na fig. 5.44.

Entre outros, THOMPSON e LIU (1973) referem precisamente este facto, tendo observado na cultivar 'Itália' que a queda de vingamento pode iniciar-se de 10 a 20 dias depois da plena floração, dependendo da temperatura do periodo.

Também MARQUES DE ALMEIDA (1945) refere que em amendoeira, a primeira queda de frutos se confunde em geral com o segundo periodo de abcisão.

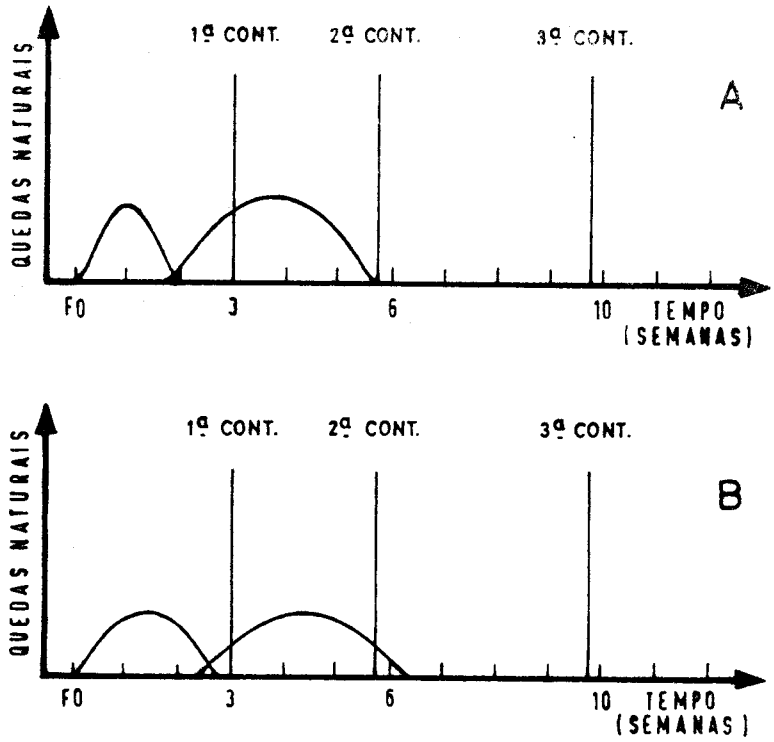


Fig 5.44 - Esquema mostrando a relação entre a queda de vingamento e as contagens de frutos do ensaio, nos dois grupos de anos.

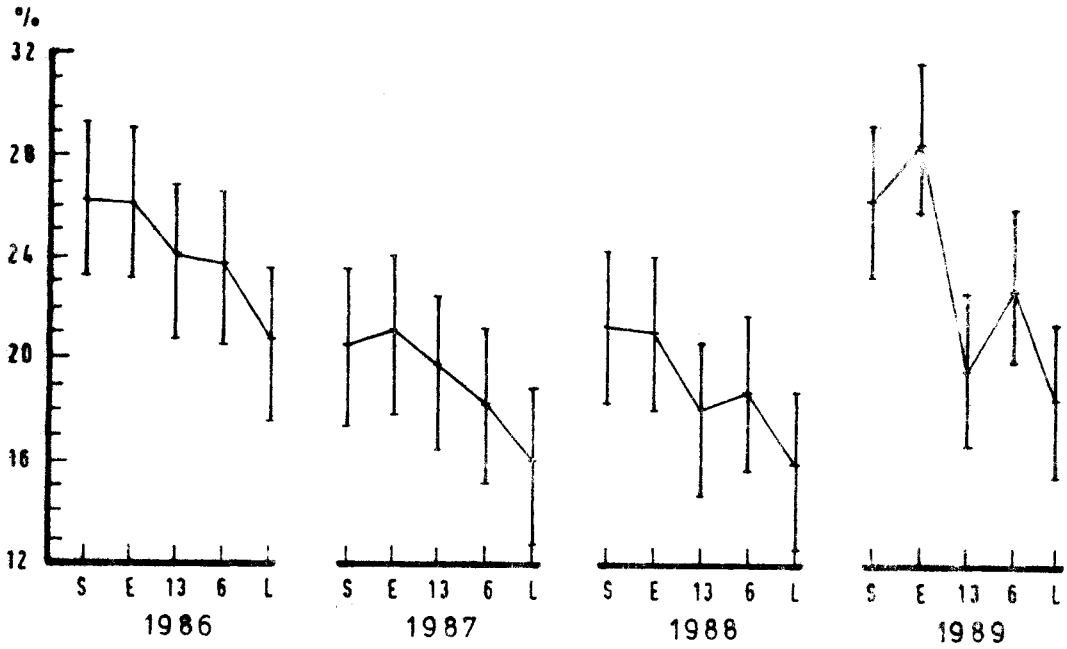


Fig 5.45 - Percentagens de vingamento pós-floral observadas nos vários tratamentos e durante os quatro anos do ensaio. Médias e intervalos de confiança a 95%.

A comprovar o facto da queda de vingamento já se ter iniciado, está o aparecimento nesta primeira contagem, de diferenças significativas entre as cultivares polinizadoras, contrário ao que seria de esperar (Anexo 18-A). As diferenças são no mesmo sentido que as observadas em relação ao vingamento final, que abordaremos a seguir.

Aliás a separação entre a primeira e a segunda queda, embora teóricamente tenham origem diferente, é difícil de fazer na prática. Em geral dá-se a ocorrência simultânea de ambas, sobretudo quando a floração se prolonga por muito tempo.

5.6.3.3 -Vingamento final

A segunda queda inicia-se cerca de duas semanas depois da plena floração e prolonga-se por mais ou menos tempo, conforme as condições climáticas que comandam o crescimento do tubo polínico e a fecundação dos óvulos. Os pistilos apresentam em geral já algum engrossamento ainda que diminuto e tornam-se amarelos antes de cairem. Os primeiros a cairem possuem ainda o estilete verde e a abcisão dá-se pela base do pedicelo, tal como na primeira queda. A partir de certo diâmetro a abcisão começa a efectuar-se pela base do ovário.

A queda de vingamento prolonga-se na 'R. Claudia Verde' até cerca de quarenta dias depois da floração, atingindo grande parte dos pistilos a dimensão de um grão de trigo e alguns mesmo a de um grão de ervilha (Fig 5.46). Esta tardia queda de vingamento, também observada por BERNHARD (1972), mas que parece ser mais importante nas nossas condições meridionais, pode ser explicada pela elevada qualidade das flores por um lado e pela importância da autopolinização, que parece ser suficiente para desencadear o crescimento inicial do fruto. Esta observação está assim de acordo com a influência positiva das temperaturas moderadamente altas no crescimento do tubo polínico por nós observada no material em laboratório. A tardia paragem do tubo polínico, que como vimos, pode chegar até dois terços do estilete, mantém durante algum tempo a influência necessária

ao crescimento do ovário, retardando assim a queda de vingamento.

BERNHARD (1972) refere que nas flores da ameixeira parece haver uma pré-determinação em relação ao vingamento do fruto. Assim existem flores que mesmo fecundadas são incapazes de vingarem fruto; outras iniciam o desenvolvimento do ovário ainda que sem se ter registado a fecundação nos óvulos. Se a primeira é fácil de explicar, admitindo a insuficiente diferenciação de algumas flores, sobretudo ao nível da ultima fase de desenvolvimento do saco embrionário, já para a segunda tem sido mais difícil de encontrar uma explicação. De qualquer modo parece hoje evidente, que o engrossamento do ovário é um fenómeno independente da fecundação dos óvulos.

Qualquer que seja o engrossamento do ovário, a não fecundação de um dos óvulos pelo menos, é a principal causa da queda de vingamento ou segundo BERNHARD (1949) o não desenvolvimento do zigoto. É no entanto referido por outros autores que também alguns pequenos frutos onde houve fecundação, podem cair neste periodo, parecendo assim haver outros factores que podem interferir no fenómeno (KESTER e GRIGGS, 1959a).

factor estudado	modalidades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	44.75	2.123	a
	Elvas	48.04	2.438	a
Anos	1986	51.85	2.919	a
	1987	43.60	2.764	b
	1988	46.47	3.253	a b
	1989	43.67	3.837	b
Polinizadoras	Stanley	31.08	2.122	c
	D'Ente	40.51	2.387	c
	P UE 13	36.73	2.597	c
	P UE 6	53.78	3.001	b
	Livre	69.88	3.135	a

Desvio-Padrão: 13.891

Quadro 5.18 -Valores da queda de vingamento. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

Fig. 5.46 -Aspecto dos frutos de 'R. Claudia Verde', 30 dias depois da floração, em plena queda de vingamento.

Fig. 5.47 -Aspecto dos frutos após a queda de vingamento, (45 dias depois da floração). Podem ainda observar-se alguns dos frutos nao fecundados, mais pequenos e prestes a cair.

factor estudado	modali-dades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	24.81	1.919	a
	Elvas	28.84	2.403	a
Anos	1986	17.74	1.798	b
	1987	29.21	3.007	a
	1988	33.64	3.108	a
	1989	26.72	3.652	a b
Polini-zadoras	Stanley	19.92	1.563	b
	D'Ente	18.68	2.056	b
	P UE 13	23.64	2.232	b
	P UE 6	26.65	3.250	b
	Livre	45.23	4.873	a

Desvio-padrão: 15.295

Quadro 5.19 -Valores da queda de Junho. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

Segundo THOMPSON e LIU (1973) observaram para a variedade 'Itália', um dos óvulos do ovário degenera muito cedo, logo a seguir à antese, enquanto a longevidade do segundo se prolonga até pelo menos ao 10º dia após a antese, altura em que já se iniciou e começa a intensificar-se a queda de Junho.

JEFFERIES (1975) distingue ainda três periodos dentro da 1ª fase de crescimento do fruto: 1-a) -inicio do crescimento, que nas condições de Inglaterra se prolonga até às quatro semanas e durante a qual se produz a maior parte da queda de vingamento. Nesta primeira fase ocorre o processo de fertilização do óvulo e inicia-se o crescimento do endosperma; 1-b) -que se prolonga por três semanas e coincidindo com uma diminuição na queda de frutos e o seu rápido engrossamento; 1-c) -abrandamento do crescimento do fruto, aumentando de novo a queda de frutos (Fig. 5.51).

Nas nossas observações porém, a queda de vingamento prolonga-se por toda a fase I, indo mesmo até ao inicio da fase II. Há porém duas situações diferentes que contribuem

para esse dilatar da queda de vingamento: por um lado temos os frutos que embora não fecundados, iniciam o seu crescimento tal como os outros e que não se distinguem à vista senão imediatamente antes da queda. Por outro, temos os pequenos frutos do tamanho de um pequeno grão de trigo, que desde muito cedo se distinguem pela sua cor amarelada, mas que demoram algum tempo a cair (Fig. 5.47). Porém na 2ª contagem, este ultimo tipo de frutos não foi incluido, embora muitos deles ainda estivessem sobre os ramos.

Os resultados de vingamento final traduzem a soma das quedas totais de frutos até 5 semanas depois da plena floração, o que engloba as quedas de flores durante a floração e as quedas devido ao não vingamento do fruto (Quadro 5.16). Podemos já ver nesta altura uma clara diferença significativa entre as várias polinizadoras, que é em geral mantida de igual forma todos os anos (Anexo 19-B). A interacção polinizadoras-anos é significativa (Anexo 18-A), mas apenas devido ao facto das diferenças entre cultivares não serem todos os anos de nível significativo. A polinização com as cultivares 'Stanley' e 'Prune d'Ente', são no entanto todos os anos as que proporcionam um mais elevado índice de vingamento final, não sendo nunca as diferenças entre ambas significativas.

Comparando os gráficos das figs. 5.45 e 5.48, observa-se que as pequenas diferenças já visiveis na primeira contagem de frutos se acentuam, ao mesmo tempo que os intervalos de confiança para 95% se reduzem, o que confirma uma eficácia de polinização diferente das cultivares utilizadas. Torna-se também já evidente nesta altura, a reduçaõ dos frutos no tratamento de polinização livre, que é sobretudo evidente no pomar de Borba.

Tendo em conta a abundância de flores nestas árvores e a pequena queda de Junho caracteristica da cultivar, pode-se considerar que apenas a polinização livre do pomar de Elvas não seria suficiente para obter uma boa produção. BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) consideram para as condições francesas, suficiente um indice de vingamento de 6%. Em condições de um pomar podado, o limite de 6% de vingamento é no entanto um pouco baixo. Além disso como já referimos a queda de vingamento prolonga-se para lá das cinco semanas.

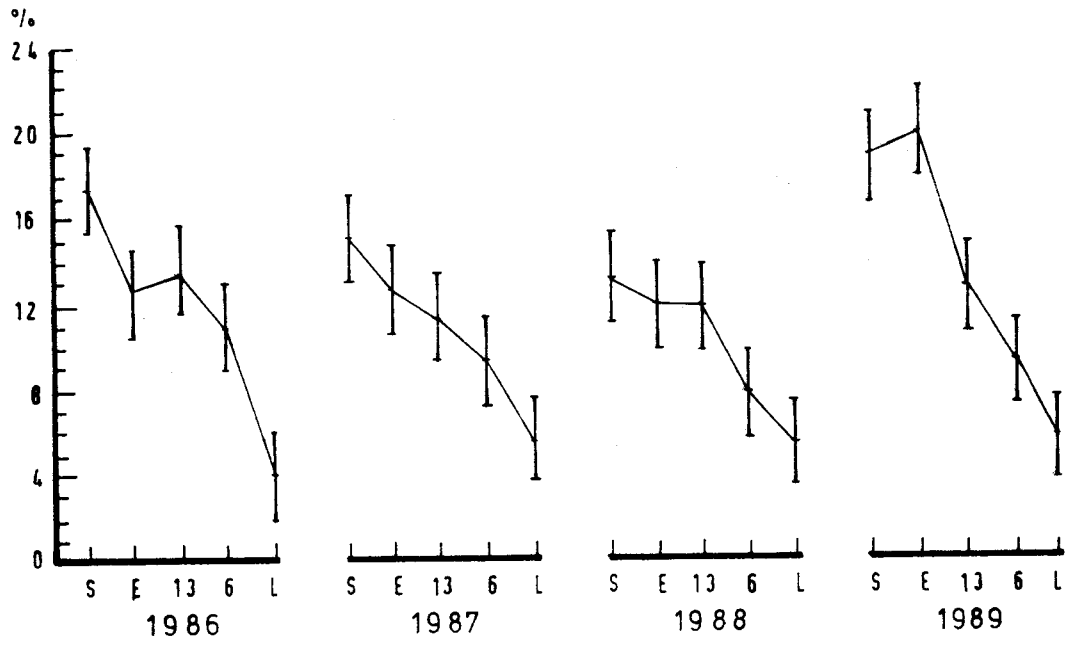


Fig. 5.48 -Médias da percentagem de vingamento final e respectivos intervalos de confiança a 95%. Interacção polinizadoras x anos.

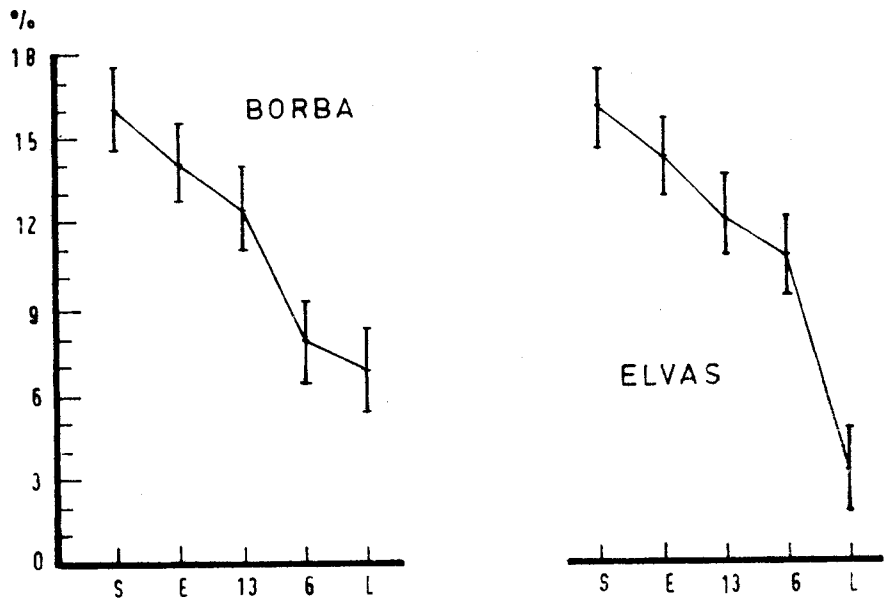


Fig. 5.49 -Médias da percentagem de vingamento final e respectivos intervalos de confiança a 95%. Interacção polinizadoras x locais.

Para podermos analisar mais em pormenor a queda devida exclusivamente à falta de vingamento, observemos a variável queda de vingamento, que corresponde à diferença do vingamento pós-floração para o vingamento final, expressa em percentagem do primeiro (Quadro 5.18).

As maiores diferenças existem como era previsivel ao nível das polinizadoras. Mas também em relação aos anos se registaram algumas diferenças significativas, o que evidência a importância das condições ambientais no processo de vingamento.

Comparando os gráficos das figs. 5.48 e 5.52, observamos que de facto a queda de frutos ocorrida entre os 21 e 40 dias depois da antese (queda de vingamento) representa a grande contribuição para o vingamento final. A unica excepção diz respeito à P UE 13 em Borba, que apresentando uma queda de vingamento semelhante à 'Stanley', tem um valor de vingamento final mais baixo. A explicação parece estar apenas, no facto da queda pós-floral corres-pondente ter sido excepcionalmente elevada, sobretudo em 1988 e 1989.

O tratamento com polinização livre registou sempre as maiores quedas de frutos, embora os valores sejam muito diferentes nos dois locais, como se pode ver pela interacção locais x polinizadoras (Fig. 5.53 e anexo 21-A). Esta diferença é porem perfeitamente explicada pelas diferentes condições de polinização nos dois pomares. Em Borba além de se ter posteriormente concluido haver uma grande cultivar de clones de 'R. Claudia Verde' que proporcionam um certo grau de inter-compatibilidade, há ainda algumas àrvores de duas polinizadoras regionais: a P UE 1 e a P UE 13. Pelo contrário no pomar de Elvas, a uniformidade do material R. Claudia é maior e não foi encontrado qualquer tipo de polinizadora. É pois de prever que em polinização livre o índice de vingamento de Borba seja mais elevado que o de Elvas.

Ao nível das diferentes polinizadoras apenas com a P.UE 6 se obteve uma queda significativamente superior às restantes. A interacção anos-polinizadoras não é significativa o que revela um comportamento constante em todos os

anos, relativamente à compatibilidade destas cultivares com a 'R. Claudia Verde' (Anexo 23).

Ao contrário do que acontece com as espécies diploides, onde a inter-incompatibilidade absoluta é por vezes referida, HURTER, TONDER e BESTER (1979) em ameixeiras japonesas, nas variedades hexaploides é muito raro, situando-se em geral o grau de incompatibilidade num nível intermédio que pode ser ou não suficiente para obter uma boa produção atendendo a uma série de factores. Entre os mais importantes estão as condições climáticas, intensidade de floração na cultivar principal e existência de agentes polinizadores. Destes factores apenas o primeiro variou neste estudo de ano para ano. Mesmo assim o factor variedade revelou-se sempre mais importante.

Recordando mais uma vez a recente teoria de MULCAHY e MULCAHY (1983, referido por GAUDE e DUMAS, 1987), segundo a qual quanto maior fôr a diferença ao nível dos alelos S entre variedades, maior será o seu grau de inter-compatibilidade. Seria assim possivel explicar o facto da 'Stanley' proporcionar um mais elevado índice de vingamento. Esta cultivar é com efeito a que se encontra genéticamente mais afastada da 'R. Claudia Verde'. As polinizadoras regionais em contrapartida, tendo um certo parentesco com esta, pois que muito provávelmente serão hibridos naturais da 'R. Claudia Verde' com os abrunheiros expontâneos na região, possuirão alguns alelos S idênticos, reduzindo assim a sua compatibilidade. Deste modo se poderia explicar o baixo vingamento obtido com a P. UE 6. Da mesma forma, o comportamento intermédio da P UE 13 poderia significar muito simplesmente, que esta cultivar ao contrário da P UE 6 não terá origem em nenhum cruzamento com a 'R. Claudia Verde'.

O grau de inter-compatibilidade nas ameixeiras hexaploides, mesmo excluindo a influência ambiental, será sempre de muito difícil interpretação devido ao grande numero de alelos em acção. Segundo BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE (1949) os problemas de inter-incompatibilidade surgem apenas entre variedades auto-incompativeis, podendo à priori tomar-se sempre como compativel, uma polinização feita com pólen de uma cultivar autocompativel como a 'Stanley' por exemplo.

Entre as possiveis razões para a maior eficácia de uma variedade como polinizadora, está ainda o factor viabilidade do pólen. Porém, de acordo com as observações da percentagem de germinação "in vitro", este factor não pode ter influenciado significativamente os resultados de vingamento obtido. A correlação entre a viabilidade do pólen das diversas cultivares e o índice de vingamento registado entre a primeira e segunda contagem de frutos ainda que significativa, é de apenas 0.37 e de sinal negativo.

A avaliação da qualidade do pólen através da germinação "in vitro" tem no entanto como já vimos, sérias limitações. BUNEMANN e LEE (1980) referem que a germinação sobre o estigma está para além da qualidade do próprio pólen, também dependente da variedade a polinizar.

Um outro factor determinante da germinação do pólen quer "in vitro" quer sobre o estigma é a densidade de grãos de pólen. Não nos parece no entanto que este possa ter sido um factor importante ao nível do ensaio, pois que ao polinizar o estigma, houve o cuidado de embeber bem o pincel em pólen, garantindo um boa quantidade de grãos sobre o estigma. Aliás em algumas amostras de pistilos recolhidos e observados em fluorescência, se observou uma grande quantidade de pólen sobre o estigma.

A não existência de relação entre estes dois factores compreende-se ao observarmos mais atentamente dois factos. Um diz respeito ao tipo de polinização realizado; que ao contrário da polinização efectuada com agentes naturais, depositou sobre cada estigma uma quantidade de grãos de pólen de tal forma elevada, que minimiza a pequena diferença que possa existir entre a capacidade de germinação do pólen das cultivares. A outra diz respeito a essas mesmas diferenças. Como vimos em 5.6.2 o intervalo de confiança da média das observações da germinação "in vitro" é de tal forma elevado, que de acordo com a análise estatistica realizada, apenas em dois anos 1986 e 1987 se registam diferenças significativas entre cultivares.

Ao nível dos anos, apenas em 1986 se observam diferenças significativas para os restantes (Quadro 5.18). A maior queda em 1986 pode dever-se entre outros factores às

mais baixas temperaturas registadas esse ano no periodo da pós-floração. Embora não disponhamos do registo da temperatura ao nível dos pomares para esse ano, podemos observar pelo gráfico da fig.4.6, que em 1986 tanto as temperaturas máximas como as minimas, foram inferiores às registadas em 1987, sobretudo no periodo de vingamento do fruto.

As condições climáticas, sobretudo a temperatura, são apontadas por muitos autores como sendo as responsáveis pela importância da queda de vingamento em ameixeiras. DORSEY (1919a) referia já que entre os factores responsaveis por esta queda, se encontram as baixas temperaturas, que ao provocarem uma diminuição na velocidade de crescimento do tubo polinico, impossibilitam a fertilização do óvulo antes da sua degenerescência. THOMPSON e LIU (1973) refere o periodo de três semanas a seguir à plena floração como decisivo em todo o processo embriológico, sugerindo no entanto que a sensibilidade a esse mesmo factor varia muito com as cultivares. Nas suas observações sobre a cultivar 'Itália', a falta de vingamento nos anos de baixas temperaturas durante a floração, deve-se não à redução no crescimento do tubo polinico, mas sim a uma degenerescência precoce dos óvulos, em virtude do tardio desenvolvimento do saco embrionário e endosperma.

Ao nível do nosso ensaio pensamos que a influência da temperatura, tenha mais a ver com o retardamento no crescimento do tubo polinico do que com a degenerescência precoce dos óvulos. De facto como vimos nos estudos em laboratório só para temperaturas bastante elevadas, próximas dos 30°C, a degenerescência dos óvulos parece constituir problema. Por outro lado a polinização efectuou-se logo no inicio da receptividade do estigma, aproveitando ao máximo o periodo de longevidade do óvulo.

Embora outros elementos climáticos sejam apontados como possiveis de influenciar o processo de polinização e vingamento, nomeadamente a chuva e o vento (DORSEY, 1919a), nas condições do ensaio esses factores não se consideram importantes. Por um lado porque o factor transporte do pólen não existe, tendo o mesmo sido depositado directamente sobre o estigma. Por outro, porque o abrigo proporcionado pelo saco, impediu que por exemplo a água da chuva possa ter

lavado os grãos de pólen da superficie do estigma, antes deste germinar. Talvez por isso o vingamento de 1989 não reflecte as más condições climatéricas observadas (Quadros 5.16 e anexo 18), sendo mesmo o mais elevado de todos os anos.

A sensibilidade das várias polinizadoras às condições climáticas adversas não é porém igual. Assim podemos verificar que enquanto a 'Stanley' e a 'Prune d'Ente' tem em termos de vingamento final uma relativa variação de ano para ano, as polinizadoras regionais embora com valores mais reduzidos, proporcionam uma mais constante percentagem de vingamento (Fig.5.51). Já em relação à percentagem de germinação do pólen "in vitro", se observou a mesma situação, sendo aquelas duas primeiras cultivares as unicas a registarem diferenças significativas nos vários anos. Trata-se possivelmente de uma menor adaptação às condições climáticas da região, relativamente às polinizadoras regionais.

5.6.3.4 -Queda de Junho

A terceira queda natural de frutos, chamada queda de Junho, mas que no caso das ameixeiras Europeias ocorre geralmente ainda durante o mês de Maio, corresponde a frutos já vingados, numa altura em que o embrião ainda não atingiu o seu completo desenvolvimento (Fig. 5.50). O inicio desta queda pode variar com as cultivares, mas está sempre relacionada com o inicio da lenhificação do caroço. Nas cultivares cujo crescimento do fruto obedece à tipica curva em duplo S, a queda de Junho coincide com a redução de crescimento do fruto, Fase II na fig. 5.51-B).

Segundo as observações de JEFFERIES (1975) na cultivar Vitória, a queda de Junho registou-se no fim da fase I e principio da fase II, coincidindo com o inicio da formação do endosperma celular e rápido crescimento do embrião. De acordo com DORSEY (1919b) a paragem no desenvolvimento do embrião seria a causa directa desta importante queda de frutos.

A queda de frutos durante o seu desenvolvimento é considerada como uma consequência natural da competição alimentar entre si e de acordo com COSTA, PISANI e RAMINA

(1986) esta é sempre precedida de uma diminuição na velocidade de crescimento, sendo tanto mais intensa quanto mais nitido for esse abrandamento. Para aqueles autores, até à queda de Junho o crescimento vegetativo parece constituir lugares metabolicos mais fortes que os frutos, beneficiando da prioridade em relação ao acesso às substâncias nutritivas. Desta forma, só os frutos em melhor situação de competir com a vegetação permanecem, caindo os restantes. A regular estes fenómenos de competição, é atribuido um importante papel às auxinas, giberelinas e citoquininas, que contribuem positivamente para a activação dos lugares de chamada para os nutrientes.

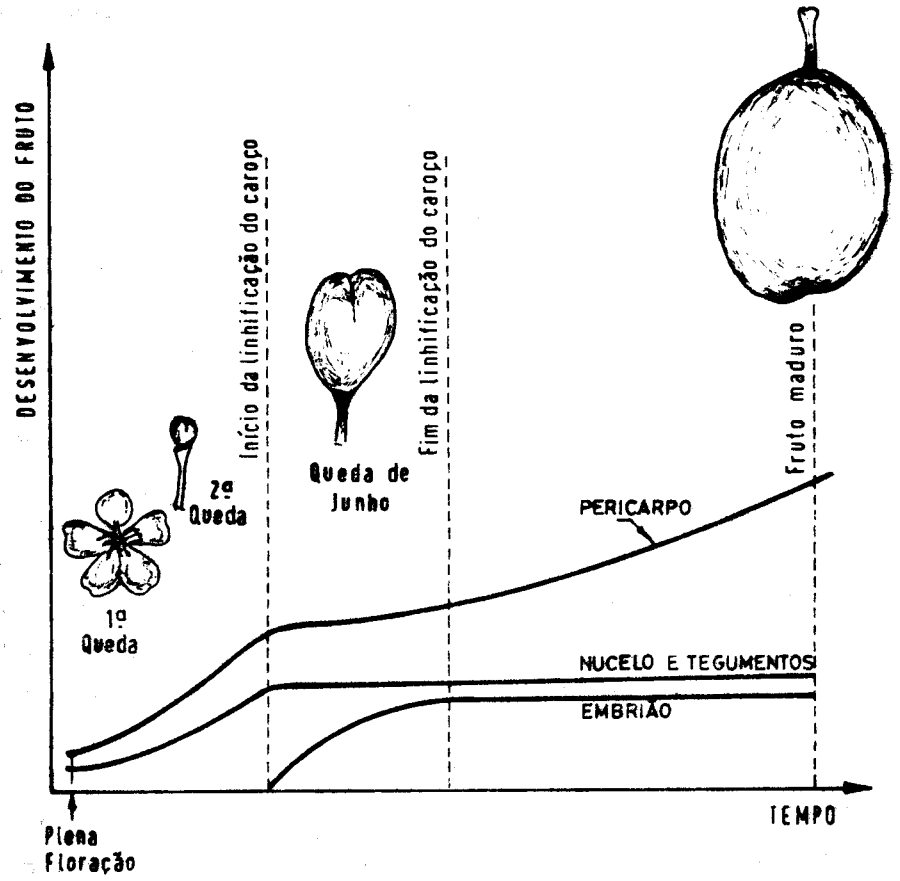


Fig. 5.50 -Esquema ilustrativo dos diferentes estados de desenvolvimento numa variedade de ameixeira (Sg. BERNHARD, DELMAS e SANFOURCHE, 1949).

Também HUGARD (1975) refere que nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto a competição entre este e os

jovens ramos em crescimento é grande, sendo a produção de substâncias de crescimento no fruto, a razão por que consegue manter alguma prioridade na alimentação e manter o seu crescimento.

Nas nossas observações, a queda de Junho ocorreu durante os ultimos quinze dias de Maio, coincidindo de facto com um relativo abrandamento do crescimento do fruto (Fig. 5.51-B). Contráriamente ao observado por HERRERO e ITURRIOZ (1983), a 'R. Claudia Verde' apresentou nesta região um crescimento do fruto, onde se podem distinguir bem as três fases: crescimento inicial de multiplicação celular -Fase I, endurecimento do endocarpo -Fase II e engrossamento final que corresponde ao periodo de alargamento celular com grande armazenamento de água -FaseIII.

Embora o numero de contagens seja pequeno para se poder observar com rigor a curva de abcisão, pode-se mesmo assim verificar, que contráriamente ao que acontece por exemplo com a 'Stanley', a queda de Junho na 'R. Claudia Verde' é relativamente pequena. Os valores por nós registados são no entanto superiores aos observados por HERRERO e ITURRIOZ (1983) em Zaragoça. Segundo estes autores em cultivares como a 'Stanley', a queda de Junho funcionaria como um mecanismo de autoregulação, reduzindo a quantidade de frutos sobre a árvore nos anos de grande vingamento. Noutras em contrapartida, esse comportamento não se verifica, sendo a queda de Junho independente da carga de frutos. A 'R. Claudia Verde' seria um exemplo evidente desta segunda situação, pelo que a sua pequena queda de Junho caracteristica, acentua ainda mais os anos de safra.

Comparando ainda as nossas observações com as de HERRERO e ITURRIOZ (1983), podemos concluir que também a curva de crescimento do fruto se apresenta diferente da observada por aqueles autores, onde não se regista uma nitida paragem de crescimento durante a lenhificação do caroço (Fig. 5.51-A). As diferenças entre os dois casos estão porém de acordo com o referido por COSTA, PISANI e RAMINA (1986), sobre a relação entre intensidade da queda e abrandamento no engrossamento do fruto. Um menor crescimento na fase II observado por nós, corresponde de facto a uma maior queda de Junho. Será dificil porém de saber se essa diferença é devida

factor estudado	modali-dades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	8.79	0.486	a
	Elvas	8.60	0.569	a
Anos	1986	9.59	0.555	a
	1987	7.93	0.583	b
	1988	7.11	0.586	b
	1989	10.14	1.003	a
Polini-zadoras	Stanley	12.90	0.586	a
	D'Ente	11.59	0.712	a
	P UE 13	9.44	0.463	b
	P UE 6	6.89	0.517	c
	Livre	2.63	0.294	d

Desvio-padrão - 2.370

Quadro 5.20 -Valores do vingamento depois da queda de Junho. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

factor estudado	modali-dades	médias	erro padrão	diferenças signif. a 5%
Local	Borba	8.25	0.461	a
	Elvas	8.06	0.557	a
Anos	1986	9.03	0.640	a
	1987	7.43	0.572	b
	1988	6.68	0.574	b
	1989	9.46	0.960	a
Polini-zadoras	Stanley	12.12	0.564	a
	D'Ente	10.92	0.712	a
	P UE 13	8.94	0.478	b
	P UE 6	6.44	0.499	c
	Livre	2.33	0.257	d

Desvio-padrão - 2.379

Quadro 5.21 -Valores da percentagem de frutos final. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes, segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$.

a diferenças genéticas do material, ou às diferentes condições culturais.

Em relação ao nosso ensaio e contrariamente ao que seria de esperar, em virtude da queda de Junho estar relacionada com problemas de alimentação, não se observaram diferenças significativas em relação aos dois locais (Quadro 5.19 e Anexo 20). Tal facto parece confirmar a reduzida capacidade desta cultivar se defender em relação à escassez de substâcias alimentares, deixando cair boa parte dos seus frutos.

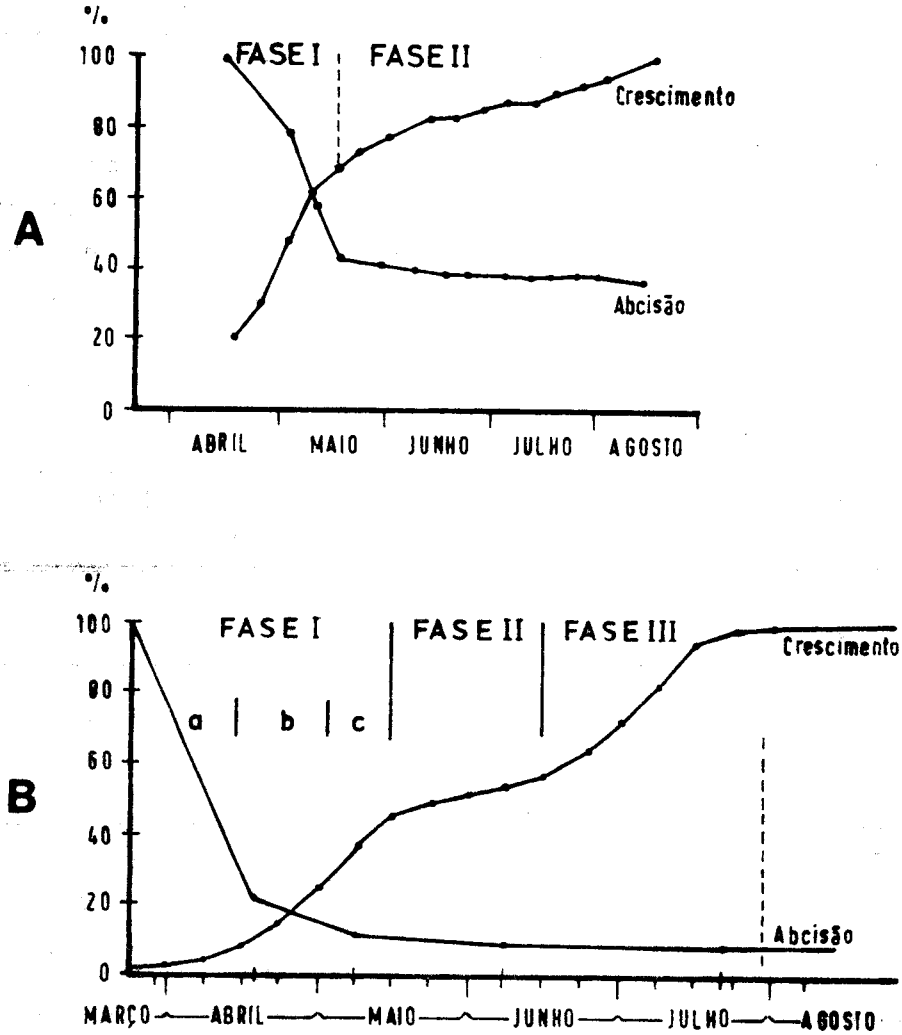


Fig. 5. 51 -Curvas de crescimento e de abcisão de frutos na 'R. Claudia Verde' e 'Stanley'. A- segundo HERRERO e ITURRIOZ (1983); B- segundo observações no ensaio de polinização.

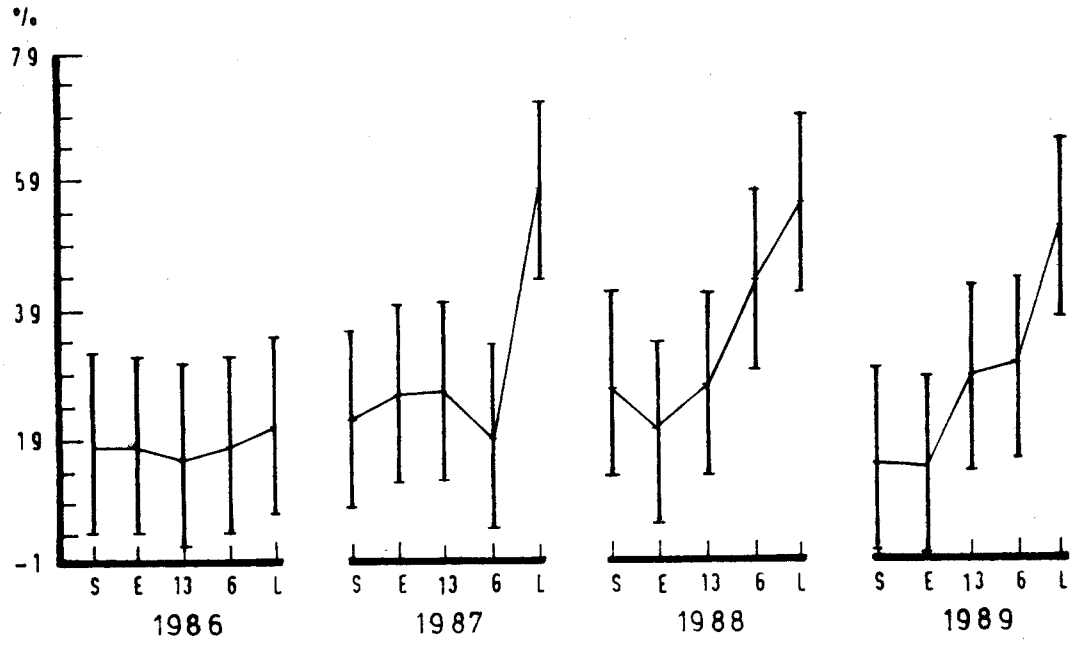


Fig 5. 52 -Médias da queda de vingamento e respectivos intervalos de confiança para p < 0.05%. Interacção anos x polinizadoras.

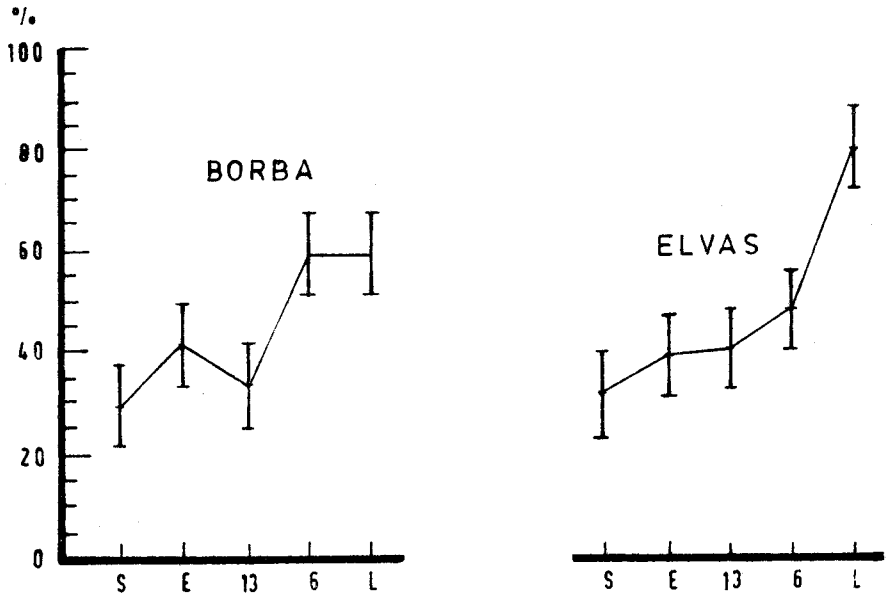


Fig 5. 53 -Médias da queda de Junho e respectivos intervalos de confiança para p < 0.05%. Interacção locais x polinizadoras.

Supondo uma grande influência da carga relativamente a esta queda, poderiamos concluir de uma forma geral, que exceptuando o ano de 1987 em que no pomar de Borba se registou uma grande produção, em nenhum outro caso se justifica uma queda de Junho elevada, em virtude da baixa produção das àrvores.

Por outro lado como COURANJOU (1978) refere, a autonomia dos ramos em relação ao todo árvore é muito reduzida sendo em ultimo caso, a situação geral desta no que respeita à circulação de substâncias alimentares, que determina o que se passa ao nível do ramo. Como devido às condições de insuficiente polinização em que as árvores se encontram, a sua carga de frutos é sempre relativamente pequena, isto implicaria também uma pequena queda de Junho.

Dos valores observados nos vários anos, apenas o de 1986 é significativamente inferior aos restantes (Quadro 5.19). No entanto essa diferença resulta apenas da menor queda verificada nos tratamentos de polinização livre e com P UE 6, não havendo em relação às restantes polinizadoras diferenças importantes (Anexo 21-B e fig. 5.53).

De igual modo o factor polinizadoras é significativo (Anexo 20-B), mas só a polinização livre tem um valor muito diferente dos outrs tratamentos. A análise mais cuidada das médias observadas em todas as polinizadoras, pode no entanto constituir matéria de interesse, inclusivé para a explicação da já referida "anormal" queda de Junho por nós observada.

Observamos assim que embora não significativamente diferentes pelo teste por nós utilizado, as diferenças vão no mesmo sentido das observadas para a queda de vingamento. Ou seja, a 'Stanley' e 'Prune d'Ente' regista os menores valores de queda, enquanto que as polinizadoras regionais têm as mais elevadas percentagens (Quadro 5.19). A explicação não pode estar ao nível dos pequenos frutos amarelados, do tamanho de um grão de trigo, que ficam como já referimos até muito tarde na árvore, pois que eles já não foram incluidos na segunda contagem.

Tudo indica que para além da causa nutricional, parece existir uma outra razão relacionada com a qualidade da polinização a influenciar a queda de Junho por nós observada na 'R. Claudia Verde'. Esse factor parece variar com os anos e se compararmos os valores da queda de vingamento e da queda de Junho para este factor, verificamos que aos maiores valores da primeira correspondem os menores da segunda para o mesmo ano. Este facto é bem evidente por exemplo para o ano de 1986, precisamente o unico que apresenta diferenças significativas em ambas as contagens, em relação aos restantes.

Também em relação à polinização livre, onde a falta de pólen efectivo é particularmente evidente, se verifica que as maiores quedas de Junho são precisamente nos anos em que o vingamento final é maior, fazendo com que o mais elevado vingamento observado em 1986 neste tratamento, deixe de se verificar na percentagem de frutos depois da queda de Junho (Quadro 5.20).

Do exposto poderá concluir-se, que tal como o observado por outros autores, na 'R. Claudia Verde' a verdadeira queda de Junho é muito pequena, enquanto que a queda de vingamento se pode prolongar por muito tempo, mesmo para além das cinco semanas depois da plena floração, embora variando com os anos.

Este facto parece poder explicar todas as anormais diferenças encontradas na 2ª e 3ª contagem, que são em geral complementares entre si. A sobreposição das quedas devidas aos diversos factores, que se verifica ser bem evidente neste caso, tende a mascarar os valores reais respeitantes a cada uma delas, dificultando a análise.

O responsável pela tardia queda de frutos é muito provávelmente o pseudo-vingamento do frutos provocado pelo atraso na paragem do tubo polinico, que pode resultar como já vimos da compatibilidade parcial entre clones de 'R. Claudia Verde' ou da influência positiva da temperatuara. A justificar este facto está o baixo índice de correlação, observado entre frutificação final e vingamento final para o tratamento de polinização livre no pomar de Borba, comparativamente às restantes polinizadoras, inclusivé a polinização livre de Elvas onde devido à homogeneidade do pomar era de esperar um

menor grau de polinização entre clones de 'R. Claudia Verde' (Anexo 24).

5.6.3.5 -Frutificação final

A percentagem de frutificação final pouco difere da observada logo a seguir à queda de Junho (Quadros 5.20 e 21). Além disso como se pode ver no anexo 24, o índice de correlação entre as duas ultimas contagens, é bastante elevado ao nível de todos os factores, comprovando uma grande proximidade entre as duas variáveis.

Y = a + b X1 + c X2		Int. conf.b	Int. Conf. c	R2
Stanley	16.63 -0.044X1 -0.157X2	-0.044 - 0.133	0.121 - 0.278	0.22
D'Ente	20.64 -0.166X1 -0.161X2	0.089 - 0.243	0.072 - 0.250	0.54
P UE 13	13.38 -0.046X1 -0.116X2	-0.010 - 0.102	0.051 - 0.181	0.35
P UE 6	13.56 -0.095X1 -0.076X2	0.056 - 0.134	0.040 - 0.112	0.63
Livre	8.19 -0.066X1 -0.029X2	0.051 - 0.081	0.020 - 0.039	0.78
geral	16.79 -0.131X1 -0.096X2	0.109 - 0.153	-0.131 - 0.323	0.65

Y = Percentagem de frutos à colheita
X1 = Queda de vingamento
X2 = Queda de Junho

Quadro 5. 22 -Equações de regressão para a frutificação final em relação às duas primeiras contagens de frutos.

O cálculo das regressões da frutificação final relativamente às variaveis vingamento pós floração e vingamento final, não permite encontrar grandes diferenças entre as várias polinizadoras. Apenas na polinização livre encontramos um índice de regressão para a queda de Junho significativamente inferior às outras cultivares (Quadro 5.21). De notar no entanto o comportamento singular da 'Stanley' onde, embora não significativamente diferente das outras cultivares, o coeficiente de pós-floração é mais elevado e menor o de vingamento final. Não fosse a grande variabilidade dos resul-

tados e poderiamos concluir que as quedas naturais de frutos a seguir às três semanas, são menos importantes no caso da polinização com a 'Stanley' do que com outras cultivares. O mesmo seria dizer que o crescimento do tubo polinico é mais rápido, antecipando-se todo o processo de vingamento e quedas associadas.

A equação geral que explica 65% da variação total (Quadro 5.21), indica claramente que a queda de vingamento é o principal factor que afecta a frutificação final, sendo o seu índice de regressão superior ao da queda de Junho.

Exceptuando o caso da polinização livre, em que como já explicámos as diferenças entre locais são perfeitamente compreensiveis, todas as outras polinizadoras revelam pequenas diferenças entre o pomar de Borba e Elvas (Fig. 5.55).

A maior eficiência ddas cultivares 'Stanley' e 'Prune d'Ente' mantem-se todos os anos, ainda que seja mais evidente em 1989 (Fig. 5.54). Este facto está de acordo com o bom comportamento do pólen da 'Stanley', em situações climáticas menos boas, observado no teste de germinação "in vitro".

Comparativamente aos resultados obtidos por outros autores, os valores de frutificação final por nós observados são relativamente baixos. Num ensaio do mesmo tipo, mas sem isolamento dos ramos, CAMBRA (1950) em Zaragoza obteve 28,6 % e 21,9 % de frutos, respectivamente com as cultivares 'Cascabel' e 'Claudia de Tolosa'. Com polinização natural, HERRERO y ITURRIOZ (1983) observou cerca de 36 % de frutificação e FACCIOLI e MARANGONI (1978) 36,2 %, ambos em árvores incluidas em colecções, sem limitação ao nivel da polinização portanto.

Entre os factores responsáveis por este facto, está sem duvida a destruição de flores e frutos devido às técnicas utilizadas no ensaio, nomeadamente ao factor saco. Sobre a metodologia de polinização artificial, KESTER e GRIGGS (1959b) observaram que o vingamento proporcionado nessas condições era sempre inferior do que com polinização natural, para igual temperatura e desde que não haja limitação ao nivel dos agentes polinizadores. Como alternativa, THOMPSON e

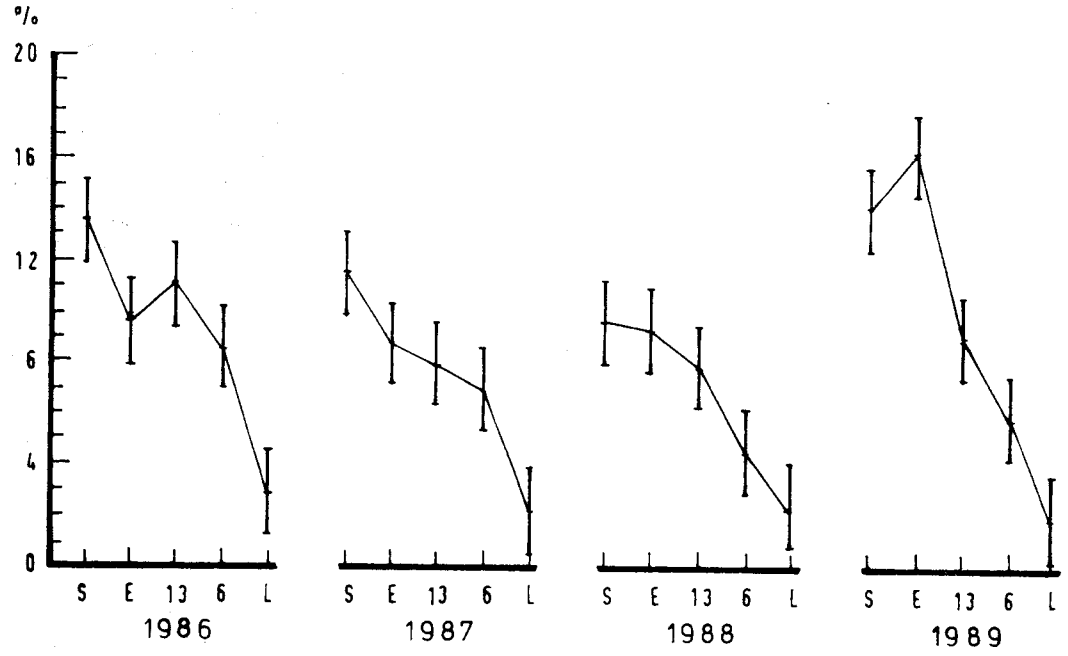


Fig. 5.54 -Médias da percentagem de frutos final e respectivos intervalos de confiança para p< 0.05. Interacção anos x polinizadoras.

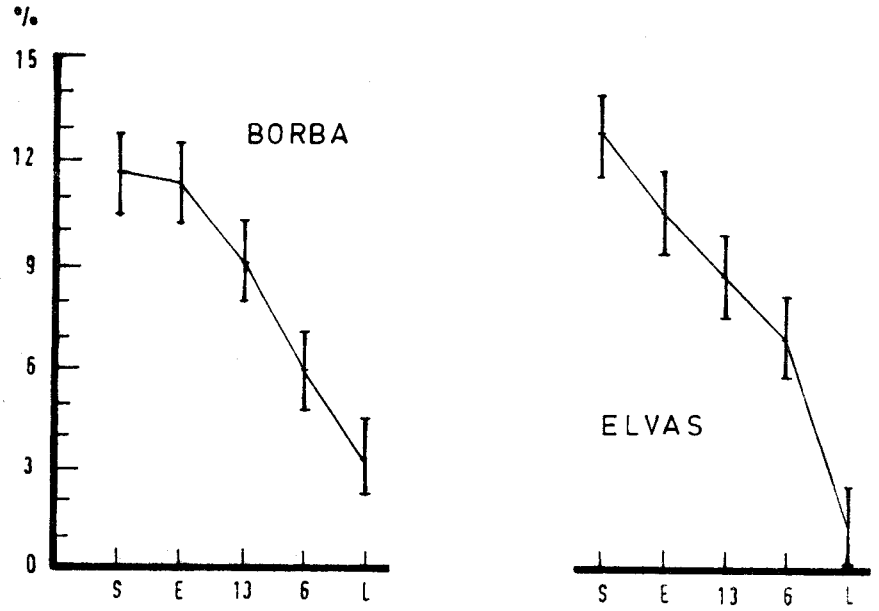


Fig. 5.55 -Médias da percentagem de frutos final e respectivos intervalos de confiança para p< 0.05. Interacção locais x polinizadoras.

LIU (1972) sugere que em ensaios deste tipo, se utilize o método da polinização suplementar, não isolando as flores.

No entanto a utilização do saco não implica apenas desvantagens, pois cria um microclima que em certos anos pode favorecer o crescimento do tubo polinico, ainda que de acordo com BELLINI (1975), esse microclima nem sempre seja favorável ao vingamento. De facto o efeito de estufa criado dentro do saco, pode elevar a temperatura acima dos 30°C em certos anos, danificando os pistilos. É assim dificil de concluir sobre o resultado final dos efeitos positivos e negativos devidos à utilização dos sacos. Aliás nos anos em que ocorreu chuva e vento durante a floração, implicando maiores estragos de flores no interior do saco, também foram os anos em que mais beneficiaram do abrigo proporcionado pelo mesmo.

De qualquer forma convém referir, que o nivel máximo de 12 % conseguido com as duas melhores cultivares, atendendo à quantidade de flores existente nas árvores excede em muito o que seria necessário para obter uma boa produção. Em anos de floração intensa THOMPSON e LIU (1972) refere que 4 % é suficiente para proporcionar uma boa produção.

De acordo com alguns autores italianos, BELLINI e BINI (1971); FACCIOLI e MARANGONI (1978); COSTA e GRANDI (1982), em polinização cruzada 1 a 5% de frutificação final é considerado insuficiente, 5 a 10 % bom e mais de 10 % elevada. Também STOTT et al (1973, referido por JEFFERIES, 1975) considera o valor de 10% de frutificação como suficiente para conseguir uma boa produção.

Em contrapartida o valor de 3,5 % obtido em polinização livre por CAMBRA (1950), em situação de carência de polinização, é da mesma ordem de grandeza do observado por nós. O nivel de 2.33 % obtido na polinização livre significa pouco, atendendo à grande diferença entre as possibilidades de polinização dos dois pomares. Na verdade são 3.3 % em Borba e apenas 1.35 % em Elvas. Embora tais diferenças não sejam suficientes para se tornarem significativas do ponto de vista estatistico, elas são concerteza importantes do ponto de vista biológico e perfeitamente explicadas pelas diferentes condições de polinização dos dois pomares, já explicadas em 4.3.3.2.

A percentagem de frutificação ideal na 'R. Claudia Verde' não deve ser em nosso entender muito alta, pois que a cultivar não tendo a capacidade de controlar o numero de frutos sobre a árvore através da queda de Junho, como sucede com outras cultivares, entra em alternância acentuada a seguir a um ano de grande produção. Um indice de vingamento moderado, pode assim servir como uma monda de frutos natural.

A monda de frutos na ameixeira, praticada a seguir à queda de Junho, é muito dispendiosa e não tem em geral um significativo efeito no calibre do fruto. Em ensaios precisamente sobre a 'R. Claudia Verde', RENAUD (1972) concluiu que a monda só terá alguma influência se for efectuada muito cedo, ainda durante a floração. HERRERO e ITURRIOZ (1983) por sua vez, aplicando DNOC durante a floração concluiram que a 'R. Claudia Verde' reduzia em muito pouco o seu vingamento inicial, comparada com outras cultivares como a 'Stanley' por exemplo. Um outro incon-veniente da monda de flores é o perigo de geadas tardias reduzirem posteriormente o índice de vingamento. Porém WELLS e BUKOVAC (1978) referem que a monda de frutos a seguir à queda de Junho tem um efeito positivo significativo tanto no calibre como na qualidade do fruto da 'Stanley'.

Parece pois poder concluir-se que. se em outras cultivares a monda de frutos ou de flores é ainda uma operação de eficiência discutivel, no que respeita à 'R. Claudia Verde', ela é sem duvida ainda mais questionável. Outros meios ao nosso alcance para evitar grandes índices de frutificação, são por um lado os que agem indirectamente, reduzindo o numero de flores, sobretudo a poda de frutificação e certas técnicas culturais que limitem a diferenciação floral. Por outro lado as que podem controlar o vingamto, como o maneio das abelhas e a eficiência da variedade polinizadora. Estas ultimas têm a vantagem de se poderem adaptar em função das condições climáticas de cada ano, que como já referimos condicionam muito os processos de polinização e vingamento.

6 —CONCLUSÕES

6.1 -Auto-incompatibilidade nos clones de 'Rainha Claudia Verde' prospectados

As observações por nós efectuadas, quer nas condições de campo, quer em laboratório, confirmam para todos os clones estudados, a auto-incompatibilidade gametófitica caracteristica já referida por outros autores. O nivel de variabilidade existente na região, não proporciona pois a selecção de individuos auto-compativeis, que muito interessariam ao melhoramento da espécie.

Os resultados diversos observados, ao nivel da expressão da auto-incompatibilidade nos vários clones, estão de acordo com a natureza poliploide do material. Nestes casos, a paragem do tubo polinico no estilete acontece mais ou menos rápidamente, consoante o numero de alelos S idênticos no gâmeta masculino e no tecido pistilar.

6.2 -Importância da temperatura na expressão do fenómeno da incompatibilidade e no PPE.

O estudo da influência da temperatura, no crescimento do tubo polinico dos clones de 'R. Claudia Verde' auto-polinizados, mostrou que este factor pode alterar significativamente o nivel a que a reacção de incompatibilidade se dá, mostrando-se porém insuficiente para levantar por completo a inibição imposta por este mecanismo.

Se um comportamento do tipo do referido por HUGARD (1978) para a variedade de macieira 'Golden Delicious', em que uma certa tendência para a auto-compatibilidade conjugada com a existencia de condições climáticas favoráveis, pode ter como resultado um certo grau de vingamento, existe também na 'R. Claudia Verde', nós não o podemos comprovar.

Dentro dos limites, que a metodologia utilizada permitiu conservar os ramos em bom estado no laboratório, parece não ser possivel realizar-se a fecundação, mesmo às temperaturas mais favoráveis de 15° e 20°C. Restará saber se, utilizando uma técnica que permita uma maior longevidade das

flores, tal não seria possivel. A falta de condições em laboratório, para utilizar ramos enxertados em pequenas plantas enraizadas, de acordo com a técnica ensaiada por JEFFERIES (1982), impediu-nos no entanto de prolongar por mais tempo o periodo de crescimento do tubo polinico.

O factor temperatura mostrou no entanto ser da máxima importância na eficácia da polinização, pela influência determinante quer no crescimento do tubo polinico, quer na longevidade dos óvulos.

Temperaturas iguais ou inferiores a 10°C durante a floração e vingamento, podem reduzir significativamente a taxa de vingamento desta variedade, devido ao reduzido Periodo de Polinização Efectivo (PPE) que possibilitam. No entanto, este não é seguramente um problema importante na região em causa, pois que em geral a temperatura média durante a floração é sempre bastante superior.

Mais de recear parece ser a temperatura demasiado elevada, que além de inibir o crescimento do tubo polinico, provoca a degenerescência precoce dos óvulos, impedindo a fecundação de se efectuar. Este ultimo facto mostrou ser mais grave nos anos em que a temperatura sobe muito, logo a partir da antese, provávelmente devido ao acelerar do processo de maturação do saco embrionário.

6.3 -Inter-compatibilidade entre clones de 'Rainha Claudia Verde'

O nível de compatibilidade verificado em laboratório, entre alguns dos clones mais representativos da população regional de 'Rainha Claudia', varia bastante, estando em geral positivamente correlacionado com as diferenças observadas ao nível morfológico e fisiológico.

A mutação ao nível das polas, utilizadas como material de propagação, parece estar na origem da alteração dos factores genéticos que comandam o mecanismo de incompatibilidade. Assim, alguns clones cujas caracteristicas são sem duvida ainda as da 'R. Claudia Verde', manifestam um grau de inter-compatibilidade que sugere ter havido mutações ao nível

de alguns dos alelos S. A pseudo-compatibilidade referida por alguns autores como o resultado da poliploidia ou da influência de condições ambientais, não nos parece ser suficiente para explicar os resultados por nós observados.

Um importante factor que pode ter influenciado os resultados obtidos, é a temperatura relativamente elevada do laboratório, que como já vimos contribui de forma decisiva para a expressão da reacção de incompatibilidade. No entanto temos de considerar, que esta é também a situação que se verifica na maioria dos anos nos pomares do Alto-Alentejo, onde as condições ambientais durante a floração são particularmente favoráveis.

Pode-se pois concluir que, a inter-compatibilidade entre os clones de 'R. Claudia Verde' da região, favorecida pelas elevadas temperaturas durante a floração, é um dos factores que mais contribuirá para a produção residual de alguns pomares verificada actualmente.

A possibilidade de cultivar futuramente esta variedade extreme, recorrendo apenas à consociação de diferentes clones inter-compativeis revela-se possivel nesta região, devendo no entanto confirmar-se ainda primeiro em ensaios de campo, se o índice de frutificação assim conseguido é compativel com uma exploração comercial. Para já esta possibilidade está afastada das soluções a adoptar pelo agricultor, por carecer de estudos mais prolongados e de uma exaustiva selecção dos clones mais indicados para a cultura.

6.4 -Eficácia de polinização das variedades estudadas

Em rigor poderá dizer-se que se trata da eficácia de fecundação e não apenas da eficácia de polinização. No entanto ainda que o termo de polinização signifique em rigor apenas o transporte do polén desde as anteras até ao estigma, é geralmente utilizado de acordo com HUGARD (1975), para todo o processo que envolve directa ou indirectamente a acção do pólen. Assim na linguagem corrente de arboricultura, o termo polinização abrange ainda de certo modo a fecundação e o próprio vingamento do fruto.

Do estudo efectuado sobre os três principais factores que estão na origem da eficácia de uma variedade como polinizadora; concordância de floração, viabilidade do pólen e compatibilidade com a variedade a polinizar, podemos concluir ser a 'Stanley,' aquela que oferece um menor grau de risco na sua utilização como polinizadora exclusiva em pomares de 'R. Claudia Verde' na região do Alto Alentejo.

De facto, com a unica excepção de 1989, a polinização com a variedade 'Stanley' foi a que permitiu obter sempre um mais elevado índice de frutificação final. Confirmou-se assim a informação de outras regiões que dão esta variedade como potencialmente boa polinizadora. A mais reduzida viabilidade do polén obtida na germinação "in vitro", parece não ser importante.

Além da comprovada inter-compatibilidade com a 'R. Claudia Verde', aquela variedade possui um periodo de floração concordante, ligeiramente antecipado até, o que é vantajoso sobretudo em anos de baixas temperaturas durante a floração, pois permite aumentar o Periodo de Polinização Efectivo. Nunca é de mais lembrar que as observações referentes a este factor são válidas apenas para a região muito limitada de Borba e Elvas, carecendo a sua generalização a outras regiões, ainda que muito próximas, de uma experimentação caso a caso.

Como vantagens na utilização da Stanley como polinizadora destaca-se o facto de ser auto-fértil e muito pouco alternante. Sendo auto-fértil não é necessário prever a sua polinização no pomar com a variedade principal ou com uma terceira variedade. É também por isso mais fácil tirar partido da sua ligeira antecipação do periodo de floração em relação à 'R. Claudia Verde'. A reduzida alternância da 'Stanley' é também uma vantagem, pois assegura todos os anos uma grande quantidade de flores, indispensável a uma variedade cujo primeiro objectivo neste caso é a produçao de pólen.

Em relação às desvantagens na utilização da 'Stanley' como polinizadora, estão a sua relativamente baixa valorização como produtora de frutos e a maior sensibilidade a certas doenças criptogâmicas que a 'R. Claudia Verde'. Este ultimo

factor obriga a que se efectuem tratamentos complementares nos pomares, o que dificulta e encarece mais a exploração dos mesmos. Entre essas doenças está a moniliose, sobretudo a Monilia laxa, que em anos de chuvas durante a floração pode causar bastantes estragos nesta variedade, ao contrário do que acontece com a 'R. Claudia Verde' que é resistente. No entanto a probabilidade de ocorrerem chuvas durante o periodo de floração na região do Alto Alentejo, é relativamente reduzida, minimizando assim este inconveniente.

Em relação à valorização dos frutos da 'Stanley', é necessário admitir de facto uma desvalorização, sobretudo quando comparados com os da 'R. Claudia Verde' cuja qualidade é de longe superior, qualquer que seja a sua utilização. Há pois que prever quando da instalação do pomar que cerca de 8 a 10 % da sua produção têm uma valor bem inferior ao praticado para a 'R. Claudia Verde'. Mesmo assim, a utilização desta variedade representa uma melhoria em relação à situação actual, pois a 'Stanley' ainda é bem mais valorizada que os tradicionais "Beijinhos" utilizados na região como polinizadores.

Um outro outro problema ainda, mas que é em geral comum a todos os pomares consociados, é a necessidade de realizar pelo menos duas colheitas, em resultado da diferença na época de maturação das duas variedades. Também aqui esse inconveniente existe, pois a maturação da 'R. Claudia Verde' é mais precoce que a da 'Stanley', sobretudo quando a colheita da primeira se faz ainda durante a pré-maturação.

Com a utilização de polinizadoras de forma sistemática e bem distribuidas nos pomares, é pois de esperar que os índices de vingamento da 'R. Claudia Verde' na região subam bastante, como aliás se pode deduzir do ensaio efectuado. Esta consequência implica só por si, uma mudança de atitude dos agricultores em relação à condução dos pomares. De facto, a não realização de poda de frutificação, terá repercursões muito negativas ao nível da alternância fisiológica. Ao contrário do que sucede actualmente em que o baixo índice de vingamento actua como regulador da alternância, evitando as grandes safras, com a utilização de polinizadoras a unica forma de reduzir essa tendência, é praticar uma poda racional mais ou menos intensa consoante se trate

respectivamente de ano de safra ou contra-safra. Além disso a poda anual é ainda hoje indispensável em fruticultura, para manter uma renovação da copa, e um bom equilibrio entre frutos e superficie foliar.

Nos novos pomares parece pois ser da máxima importância prever a instalação da variedade 'Stanley' como polinizadora. A curto prazo, e para aumentar a produção dos pomares já instalados, a polinização pode ser assegurada colocando ramos desta variedade nos pomares durante a plena floração e ao mesmo tempo assegurando uma elevada população de abelhas. Esta técnica já testada por vários autores, parece dar bons resultados ainda que exiga alguns cuidados. De acordo com GRIGGS e HESSE (1963) em ameixeira japonesa e BRIGGS, THORP e KLUNGNESS (1983) em amendoeira, a eficácia da mesma está ligada à manutenção dos ramos em boas condições, para o que se aconselha a sua colocação em àgua, substituindo mesmo os ramos caso a floração se prolongue durante muito tempo e fazendo a máxima dispersão possivel dos mesmos sobre o pomar. Aqueles autores aconselham a mudar os ramos todos os cinco dias, periodo a partir do qual a viabilidade do pólen se reduz bastante. Com efeito a sua influência é muito localizada, podendo mesmo no caso de grandes árvores ser necessário mais que um ramo por cada uma. No caso de um só ramo por árvore, a sua colocação deverá ser no topo.

7 -BIBLIOGRAFIA

ABDALLA, M.M.F.;HERMSEN, J.G. -*Unilateral incompatibility: Hypotheses, debate and its implications for plant breeding*, Euphytica, 21, 32-47, 1972.

AFIFY, A. -*Pollen tubes growth in diploid and polyploid fruits*, J. Pom. Hort. Science, 9, 113-119, 1933.

AGARWAL, P.K. -*Effect of storage in organic solvents on the germination of grapevine pollen*, Jour. Hort. Science, 58 (3), 389- 392, 1983.

ALLARD, R.W. -*Principios do melhoramento genético das plantas*, São Paulo, Editôra Edgard Blucher Ltda., 1971.

ANVARI, S. F.;STOSSER, R. -*La microscopie à fluorescence, une nouvelle méthode pour évaluer la viabilité des óvules chez Prunus*, Z. Pflanzenzucht, 81, 333-336, 1978.

ASCHER, P.D.;PELOQUIN, S.J. -*Effect of floral aging on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in Lilium longiflorum*, Amer. J. Bot., 53 (1), 99-102, 1966.

ASCHER, P.D.;PELOQUIN, S.J. -*Temperature and the self-incompatibility reaction in 'Lilium longiflorum' Thunb.*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 95(5), 586-588, 1970.

BAGNI, N.;GEROLA, F.M. -*Micro e macrosporogenesi, impollinazione e fecondazione, in La Fertilitá nelle Piante da Frutto*, Bologna, Istituto Coltivazioni Arboree, 1978, 309-329.

BARBIER, E. -*La pollinisation; Croisez et multipliez*, L'Arboriculture Fruitière, 379, 39-42, 1985.

BATTACHARJYA, S.S.;LINKSEN, H.F. -*Recent advances in the physiology of self-sterility in plants*, Sci. Cult., 20 (8), 370-373, 1955.

BEJON, J. J. -*La pollinization du prunier*, Journee d'etudes "Prunes de table", Moissac, 1986.

BELLINI, E. -*Indagini sulla biologia fiorale della 'Burmosa' e di alcune sue cultivar impollinatrici*, Rivista Ortoflorofrut. Italiana, 59, 210-221, 1975.

BELLINI, E.;BINI, G. -*Indagini sulla biologia fiorale della 'Ruth Gerstetter' e di alcune sue cultivar impollinatrici*, Rivista Ortoflorofrut. Italiana, 55 (2), 103-117, 1971.

BELLINI, E.;BINI, G. -*La fertilitá nel susino, in La Fertilitá nelle Piante da Frutto*, Bologna, Istituto Coltivazioni Arboree, 1978, 403-422.

BELMANS, K. -*Les varietes de prunes*, Le fruit Belgue, 413, (54), 52-75, 1986.

BERNHARD, R. -*Observations sur la pollinisation de plusieurs espèces fruitieres*, 101º Congrés de la Societe Pomologique de France, Strasbourg, 132-144, 1972.

BERNHARD, R.;DELMAS, H.G.;SANFOURCHE, G. -*La polinization du prunier*, Station de Recherches Viticoles et d'Arboriculture Fruitiére du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye, 1949a.

BERNHARD, R.;DELMAS, H.G.;SANFOURCHE, G. -*Recherches sur la pollinisation de quelques variétés de pruniers*, Station de Recherches Viticoles et d'Arboriculture Fruitière du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye, 1949b.

BLONDEL, L.;THOMAS, M. -*Place des principales espèces fruitieres dans la classification botanique de Rehder*, Extrait de "Manual of cultivated trees and shrubs" par Alfred Rehder, Pont-de-la-Maye, 1962.

BONOMO, R.;TIEZZI, A. -*Influenza di regolatori di crescita e fungicidi su polline di melo in vivu ed in vitru*, Riv. Ortoflorofrutt. It., 70, 43-52, 1986.

BOYLE, R.M.D.;PHILOGENE, B.J.R. -*The natives pollinators of an apple orchard: variations and significance*, Jour. Hort. Science, 58 (3), 355-363, 1983.

BREWBAKER, J.L. -*Pollen citology and incompatibility systems in plants*, J. Hered. 48, 271-277, 1957.

BREWBAKER, J.L.;KWACK, H. -*The calcium ion and substances influencing pollen growth*, in Pollen Physiology and Fertilization, Amsterdam, North-Holland Pub. Co., 1964,143-151

BRIGGS, D.; WALTERS, S.M. -*Plant variation and evolution*, 2ª edição, Cambridge, Cambridge University Press, 117-124, 1984.

BRIGGS, D.;THORP, R.;KLUNGNESS, M. -*Artificial pollination of almonds, Prunus dulcis, with bouquets monitored by fruit set and pollen germination*, Jour. Hort. Science, 58 (2), 237-240, 1983.

BUNEMANN, G.;LEE, C.L. -*Biologie de la mise a fruits des varietes de prunes bleues et ses consequences pour une culture rentable dans le nord de l'Alemagne*, Le Fruit Belgue, 48, 107-115, 1980.

CAILLAVET, H. -*Les variétés de prunes de table*, 2º Congrés National Prune et Pruneau, 78-81, Agen, 1948.

CAILLAVET, H. -*Monographie des principales varietes de prunier*, INRA-Station de Recherches d'Arboriculture Fruitiére, Pont-de-la- Maye, 1973.

CAMBRA, M. -*Ensaios sobre polinizações artificiais em ciruelo 'Reina Claudia Verde'*, separata de Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei, 2 (1), 72-75, 1950.

C.E.T.A.; I.N.R.A.; S.U.A.D. -*Etude de differentes souches et varietes de prunes 'Reine Claude'; compte-rendu d'essai*, Pont-de-la-Maye, Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière, 1976.

CHAMPAGNAT, P. -*Quelques réflexions sur la dormance des bourgeons des végétaux ligneux*, Physiol. Vég. 21 (3), 607-618, 1983.

CHAUVIN, J.E. -*Etude de quatre familles de demi-freres issues de croisements intraspecifiques chez le prunier doméstique*, Memoire de Fin d'Etude, Pont-de-la-Maye, Station d'Arboriculture Fruitiere-INRA, 1985.

COBIANCHI, D. et al. -*Ricerche sulla fertilitá delle cultivar di cino-giapponese*, Comunicação apresentada ao seminário "Fertilitá delle piante da frutto", Bolonha, 1978.

CONOVER, W. J. -*Practical nonparametric statistics*, 2ª edição, New York, John Wiley & Sons, 1980.

COSTA G.;GRANDI, M. -*Contributo alla conoscenza della esigenze di impollinazione di nuove cultivar di susino*, Comunicação apresentada ao "Incontro Frutticolo S.O.I. su la cultura del Susino", Ferrara, 1982.

COSTA, G.;PISANDI, P.L.;RAMINA, A. -*Il controllo ormonale del ciclo di fruttificazione negli alberi da frutto*, Riv. Ortoflorofrutt. It. 70, 5-23, 1986.

COURANJOU, J. -*Les résultats de quinze années de recherches sur les aspects génétiques de l'alternance posent de nombreux problémes sur la physiologie de l'arbre, 2º Colloque sur les Recherches Fruitiéres*, 107-123, Pont-de-la-Maye, 1982.

COURANJOU, J. -*Premiers résultats des recherches sur fac-eurs varietaux et les mécanismes de l'alternance du prunier domestique*, Agronomia Lusitana, 32, 143-161, 1971.

COURANJOU, J. -*Recherches sur les causes genétiques et les mécanismes de l'alternance du prunier domestique (Prunus domestica L.)*, Ann. Amélior. Plantes, 20 (3), 297-318, 1970.

COURANJOU, J. -*Recherches sur les causes genétiques et les mécanismes de l'alternance du Prunier domestique*

(Prunus domestica L.), Phisiol. Veg., 16 (3), 505-520, 1978.

COUTAUD, J. -*Contribution à l'étude de la fécondation et de la fructification chez le pommier*, Ann. Amélior. Plantes, 4, 51-127, 1954.

CRANE, M.B.;LAWRENCE, J.C. -*Genetical and cyitological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits*, J. Pomol. Hort. Sci., 7, 276-301, 1929.

CRESTI, M.;DONINI, B.;DEVREUX, M. -*L'autoincompatibilità e la sua importanza nel miglioramento delle piante coltivate, in La Fertilitá nelle Piante da Frutto*, Bologna, Istituto Coltivazioni Arboree, 1978, 330-349.

CURRIER, H. B. -*Callose substance in plant cells*, Amer. J. Bot., 44, 478-488, 1957.

DECKERS, J.C.;KEULEMANS, J. -*Essais varietaux sur pruniers: resultats 1969-1978*, Le Fruit Belgue, 100-106, 1980.

DE GREEF, M.;DE WAEL, L.;LAERE, O.V. -*Facteurs climatiques et pollinization entomophile en culture fruitiere*, Le fruit Belgue, 404 (51), 315-317, 1983.

DELMAS, J.M.;ROZIER, M.;VILLEMUR, P. -*Pollinization de l'olivier*, L'Arboriculture Fruitiere, (417), 43-51, 1989.

DERMINE, E.;LIARD, O. -*Indentification et description des variétés du prunier européen*, Extrait de la "Revue de l'Agriculture", 6 (9), 1953.

DERMINE, E.;LIARD, O. -*Etude sur la Reine Claude d'Althan*, Extrait du "Fruit Belgue", 1952.

DORSEY, M.J. -*Relation of weather to fruitfulness in plum*, Jour. Agric. Research, 17 (3), 103-126, 1919a.

DORSEY, M.J. -*A study of sterility in the plum*, Genetics, 4, 417-488, 1919b.

DUHAMEL DU MONCEAU, M. -*Traité des arbres fruitiéres*, 1768.

DUMAS, C.;KNOX, R. B. -*Callose and determination of pistil viability and incompatibility*, Theor. Appl. Genet., 67, 1-10, 1983.

EREMIN, G.V. -*New data on origin of Prunus domestica L.*, 4th International Symposium of Working Group: Plum and Prune Genetic Breeding and Pomology, Station INRA d'Arboriculture Fruitiére, Bordeaux, 1989.

FACCIOLI, F.;MARANGONI, B. -*Ricerche sulla fertilità delle cultivar di susino europeo (Prunus domestica L.)*, in La Fertilitá nelle Piante da Frutto, Bologna, Istituto Coltivazioni Arboree, 1978, 584-597.

FERNANDEZ-ESCOBAR, R.;GOMEZ-VALLEDOR, G.;RALLO, L. -*Germination "in vitru" del polen de cultivares de olivo*, Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei, 15 (3/4), 261-272, 1981.

FERNANDEZ-ESCOBAR, R.;GOMEZ-VALLEDOR, G.;RALLO, L. -*Influence of pistil extract and temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of olive cultivars*, Journal of Horticultural Science, 58 (2), 219-227, 1983.

GAUDE, T.;DUMAS, C. -*Molecular and cellular events of self-incompatibility*, Int. Rev. Cytology, 107, 333-366, 1987.

GRIGGS, W.H.;HESSE, C.O. -*Pollination requirements of japanese plums*, Davis, 1963.

GRZYB, Z.S.;ZAGAJA, S.W. -*The influence of various rootstocks on the morphological changes in 'Italian prune' flowers*, Acta Horticulturae 48, 7-11, 1976.

HAVE, D.J. Van Der -*Plant breeding perspectives, Wageningen*, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 134-138, 1979.

HECHT, A. -*Partial inactivation of an incompatibility substance in the stigmas and styles of Oenothera, in Pollen Phisiology and Fertilization*, Amsterdam, North-Holland Pub. Co., 1964, 237-243.

HERRERO, J.;ITURRIOZ, M. -*Aclareo en Ciruelo*, Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei, 16 (3-4), 347-362, 1983.

HERRERO, M. P.;JOHNSON, R.R. -*High temperature stress and pollen viability of maize*, Crop Science, 20 (6), 796-800, 1980.

HESLOP-HARRISON, J. -*An interpretation of the hydrodynamics of pollen*, Am. Journ. Botany, 66, 737-743, 1979.

HESLOP-HARRISON, J.;HESLOP-HARRISON, Y. -*Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; Intracellular hidrolysis of fluorescein diacetate*, Stain Technology, 45 (3), 115- 120, 1970.

HESLOP-HARRISON, J.;HESLOP-HARRISON, Y.;SHIVANA, K.R. -*The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure*, Theor. Appl. Genet., 67, 367-375, 1984.

HIRATSUKA, S.;TOMITA, A. -*Incompatible pollen tube growth and protein composition in styles of Japanese pear following hight temperature treatments*, Euphytica, 43, 191-196, 1989.

HUGARD, J. -*Pollinisation et fecondation, La Pomologie Française*, Abril, 63-78, 1975.

HURTER, N.;TONDER, M.J.Van ;BESTER,J. -*Cross-pollination requirements of the plum cultivar 'Redgold'*, The Deciduous Fruit Grower, 5, 152-155, 1979.

INSTITUT TECHNIQUE DE L'APICULTURE -*La pollinisation du prunier*, Bul. Tech. Apic., 6 (4), 21-32, 1979.

IVANICKA, J. -*Staining pollen tubes in the styles of fruit species by resorcin blue*, Biologia, 32 (4), 289-292, 1977.

JAIN, A.;SHIVANA, K.R. -*Storage of pollen grains in organic solvents: effect of organic solvents on membrane permeability*, Incompatibility Newslletter, 18, 1986.

JEFFERIES, C.J. -*Floral biology and fruit development in the European plum*, Thesis of M.S., Bristol, 1975.

JEFFERIES, C.J.;BELCHER, A. R. -*A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo*, Stain Technology, 49 (4), 190- 202, 1974.

JEFFERIES, C.J.et al. -*Experimental systems and a mathematical model for studying temperature effects on pollen tube growth and fertilization in plum*, Plant Cell and Environment, 5, 1982, 231-236.

KAPETANOVIC, N. -*Les variétés locals de pruniers de Bosnie et Herzegovine*, Thése de Doctorat, Bordeaux, 1960.

KESTER, D.E.;GRIGGS, W.H. -*Fruit setting in the almond: The pattern of flower and fruit drop*, Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 74, 214-219, 1959a.

KESTER, D.E.;GRIGGS, W.H. -*Fruit setting in the almond: The effect of cross-pollinating various percentages of flowers*, Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 74, 206-213, 1959b.

KEULEMANS, J. -*Pollinisation et fecondation chez le prunier*, Le fruit Belgue, 117-121, 1980.

KEULEMANS, J. -*The effect of Temperature on pollen tube growth and fruit set on plum trees*, Acta Horticulturae, 149, 1984, 95-101.

KHO, Y. O.;BAER, J. -*Observing pollen tubes by means of fluorescence*, Euphytica, 17, 298-302, 1968.

KHO, Y.O.;BAER, J. -*Microscopie à fluorescence et recherche botanique*, Zeiss Information, 18, 54-57, 1970.

KLUNGNESS, M.;THORP, R.;BRIGGS, D. -*Field testing the germinability of almond pollen (Prunus dulcis)*, Jour. Hort. Sci., 58 (2), 229-235, 1983.

KNOX, R.B.;GAGET, M.;DUMAS, C. -*Mentor pollen techniques, International Review of Citology*, 107, 315-332, 1987.

KNOX, R.B.;WILLIAMS E.G.;DUMAS, C. -*Pollen, pistil, and reprodutive function in crop plants*, Plant breeding reviews, 9-79, 1986.

LACADENA, J. R. -*Genetica*, 3ª edição, Madrid, A.G.E.S.A., 1981, pgs. 434-444.

LALATTA, F.;MARRO, M.;SANSAVINI, S. -*La fertilità nel melo e nel pero, in La Fertilitá nelle Piante da Frutto*, Bologna, Istituto Coltivazioni Arboree, 1978, p 361.

LANDSBERG, J.J. -*Some useful equations for biological studies*, Expl. Agric.,13, 273-286, 1977.

LAPINS, K.O. -*Mutation breeding, in Methods in Fruit Breeding*, Purdue, J. Moore e J. Janick, 1983, 74-99.

LATORSE, M. P. -*Etude de deux facteurs limitant la productivité du noisetier (Corylus avellana L.)*, Diplome d'Etudes Approfondies, Pont-de-la-Maye, Station d'Arboriculture Fruitière-INRA, 1981.

LAYNE, E.C.R.;SHERMAN, W.B. -*Interspecific hibridization of Prunus*, Hortscience, 21 (1), 48-51, 1986.

LEE, C.L. -*Germination du pollen, croissance des tubes polliniques et conditions de fecondation chez Prunus domestica*, Gartenbauwissenschaft, 45 (6), 1980, 241-248.

LEE, C.L.;BUNEMANN, G.;HERRMANN, S. -*Long terme storage of plum pollen*, Gartenbauwissenschaft, 46 (2), 69-72, 1981.

LEE, G.L. -*Pollen germination, pollen tube growth and fertilization behaviour of Prunus domestica. II. Pollen tube growth in the style*, Gartenbau-wissenschaft, 45 (6), 241-248, 1980.

LEE, G.L. -*Pollen germination, pollen tube growth and fertilization behaviour of Prunus domestica. I. Pollen germination in vitru and in vivu*, Gartenbauwissenschaft, 45 (5), 228-235, 1980.

LEE, G.L.;BUNEMANN, G. -*Pollen tube growth, and fertilization behaviour of Prunus domestica. III. Fertilization behaviour of some blue plum cultivars*, Gartenbauwissenschaft, 46 (5), 217-223, 1981.

LEWIS, D. -*Comparative incompatibility in angiosperms and fungi*, Adv. in Genet., 6, 235-285, 1954.

LEWIS, D. -*Sexual incompatibility*, Science Progress, 172, 593-605, 1955.

LEWIS, D. -*Sexual incompatibility in plants*, London, Edward Arnold Publ. Ld., 1979.

LINSKENS, H.F. -*The influence of castration on tube growth after self pollination, in Pollen Physiology and Fertilization*, North-Holland Publishing Company, 1964, 231-236.

LINSKENS, H.F. -*The Physiological basis of incompatibility in angiosperms*, Biol. J. Linn. Soc. Suppl., 1, (7), 143-152, 1975.

LOBO, J. Madeira -*Fruticultura de hoje*, Lisboa, Luso-Espanhola Lda., 1977.

LUCKA, M. -*L'Influence de differentes methodes de castration sur les processus de nouaison et de fecondation*, Station d'Arboriculture Fruitiere, Pont-de-la-Maye, 1959.

MAESTRO, M. C.; ALVAREZ, J. -*The effects of temperature on pollination and pollen tube growth in muskmelon*

(Cucumis melo L.), Scientia Hortculturae, 36, 173-181, 1988.

MANGIN, L. -*Sur la callose, nouvelle substance fondamentale existant dans la menbrane des champignons, Comptes Rendus*, 40, p 644, 1890.

MANGIN, L. -*Nouvelles observations sur la callose*, C. R. Acad. Sci. Paris, 151, 279-283, 1910.

MARCUCCI, M.C.;VISSER, T.;VAN TUYL, J.M. -*Pollen and pollination experiments. VI. Heat resistence of pollen*, Euphytica, 31, 287-290, 1982.

MARENAUD, C.;DESVIGNES J.C. -*Incidences de quelques viroses d'arbres fruitiers à noyau sur la qualité du pollen des pêchers inoculés*, Plant. Protection, 85 e 88, 1965.

MARQUES DE ALMEIDA, C. R. -*Acerca da improdutividade na amendoeira*, Anais do Instituto Superior de Agronomia, 15, 8-184, 1945.

MARTIN, F. W. -*Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence*, Stain. Techn., 34, 125-128, 1959.

MARTINEZ-TELLEZ, J.;CROSSA-RAYNAUD, P. -*Contribution à l'etude du processus de la fécondation chez trois espèces de Prunus: P. persica (L.) Batsh., P. cerasifera Ehrh. et P. mahaleb L. grâce à l'utilization de couples de variétés mâle-stériles et mâle-fertiles*, Agronomie, 2 (4), 333-340, 1982.

MASCARENHAS, J.P. -*The biochemistry of angiosperm pollen development*, Bot. Rev., 41, 259-314, 1975.

MATSUBARA, S. -*Overcoming the self-incompatibility of Lilium longiflorum Thunb. by application of flower-organ extract or temperature treatment of pollen*, Euphytica, 30, 97-103, 1981.

MENDES, J.C. -*Contribuição para o conhecimento do numero de horas com temperatura do ar inferior a 7° C em Por-*

tugal Continental, Lisboa, Instituto Nacional de Meteorologia e Geofisica, 1983.

MESNIER, Y. -*Les varietes de Mirabellier (Prunus insititia) cultivees en France*, Extrait du "Fruit Belgue" nº380, Pont-de-la-Maye, 1977.

MITTEMPERGHER, L. -*Principi di miglioramento genetico delle piante da frutto*, Firenze, Edizioni Tellus, s.d.

MORAES, P. -*Manual prático de agricultura*, tomo 1, Lisboa, Livraria de António Maria Pereira, 1896.

MORSE, R.;HOOPER, T. -*Enciclopédia Ilustrada de Apicultura*, 1º e 2º volume, Lisboa, Publicações Europa-América, 1986,. 120, 234.

MURTY, U.R. -*A standardized cotton blue stain for pollen germination and growth in andropogoneae grasses, Stain technology*, 46 (5), 239-243, 1971.

NATIVIDADE, J.V. -*A improdutividade em pomologia*, Alcobaça, Dissertação para o concurso de Professor Catedrático do I.S.A, 1932.

NATIVIDADE, J.V. -*Os abrunhos*, Boletim da Junta Nacional das Frutas, 253-261, 1947.

NAVARRO, A. F. -*Evolução microscópia e macroscópia do gomo floral de um esporão de ameixeira (Rainha Claudia), e considerações sobre a poda mais racional a empregar em face dos resultados obtidos*, Lisboa, Tipografia do Comércio, 1926.

NAVARRO, J.R. -*La ciruela Red Beauty y su productividad*, Servicio de Extension y Capacitacion Agrária, Murcia, 1987.

NETTANCOURT, D. -*Incompatibility in Angiosperms*, Monografia de Theo. Appl. Genetic, 3, 1977.

NETTANCOURT, D. et al -*Ultrastructural aspects of the self-incompatibility mechanism in Lycopersicum peruvianum Mill.*, J. Cell Sci., 12, 403-419, 1973.

NSEIR, P. -*étude de l'influence de la température sur la croissance des tubes polliniques chez des variétés inter-incompatibles et inter-compatibles de cerisier (Prunus Avium et Prunus Cerasus)*, Thèse, Bordeaux, 1969.

OKIE, R.W. -*Plums Rootstocks, in Rootstocks for Fruit Crops*, New York, John Wiley & Sons, 1987, 321-360.

PANDEY, K.K. -*Centric chromosome fragments and pollen-part mutant of the incompatibility gene in Nicotiana alata*, Nature, 206, 792-795, 1965.

PANDEY, K.K. -*Mentor pollen: possible role of wall-held pollen growth promoting substances in overcoming intra and interspecific incompatibility*, Genética, 47 (3), 219-229, 1977.

PATIL, V. K.;RAJMANE, K.D.;SANGHAVI, K. U. -*Incompatibility in fruit plants* - a review, Tropical Agriculturist, 130 (2), 107-133, 1974.

PEREIRA, A. M. M. -*Estudo da zonagem da Rainha Claudia nos concelhos de Elvas e Estremoz*, Lisboa, 1970.

PHILIPPEAU, G. -*Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales*, Institut Technique des Céreales et des Fourrages, Paris, 1986.

POLITO, V.S. -*Flower and fruit development, in Prune Orchard Management*, Berkeley, Agricultural Science Publis-hers, 1981, pgs. 46-52.

POLITO, V. S.; LUZA, J. G. -*Longevity of Pistachio pollen determined by in vitro germination*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113 (2), 214-217, 1988.

POLITO, V. S.;WEINBAUM, S. A. -*Intraclonal variation in pollen germinability in Kiwifruit, Pistachio and Walnut*

as influeced by tree age, Scientia Horticulurae, 36, 97-102, 1988.

PREIL, W. -*Observing the growth of pollen tubes in pistil and ovarian tissue by means of fluorescence microscopy*, Zeiss Information, 75, 24-25, 1970.

RABATÉ, E. -*Le prunier de Reine-Claude*, Montpellier, Imprimeurs du Progrés Agricole et Viticole, 1913.

RALLO, L.;MARTIN, G.C.;LAVEE, S. -*Relathionship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in Olive*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106 (6), 813-817, 1981.

REAL, L. -*Pollination Biology, Londres*, Academic Press, 1983, 222-225.

REMY, P. -*Contribution a l'etude du pollen des arbres fruitiéres a noyau, genre Prunus*, Station de Recherches Viticoles et d'Arboriculture Fruitiére du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye, 1953.

RENAUD, R -*L'éclaircissage chimique des boutons floraux et des fleurs du prunier domestique*, Ann. Amélior. Plantes, 22 (4), 405-414, 1972.

RENAUD, R. -*Les varietes de pruniers de Reine Claude*, Carennac, 1975.

RENAUD, R. -*Etude de la descendence de divers croisements intraspecifiques chez le Prunier Domestique*, Acta Horticulturae, 48, 79-82, 1976.

RENAUD, R. -*La Reine Claude*, Fruit Belgue, 382, 128-130, 1977.

RENAUD, R. -*Variétés de prunier*, Paris, Invuflec, 1978.

RICHARDS, A.J. -*Plant Breeding Systems*, Londres, George Allen & Unwin, 1986, 136-232.

ROSEN, W.G. -*Pollen-pistil interactions*, Biol. J. Linn. Soc., Suplemento nº1, 7, 153-164, 1975.

SADA, J.L.O. -*Flora de interes apicola y polinizacion de cultivos*, Madrid, Mundi-Prensa, 1987.

SALESSES, G. -*Connaissances cytogénétiques et hibridation interspécifique dans le sous-genre Prunophora, section Euprunus*, Ann. Amélior. Plantes, 17 (4), 397-408, 1967.

SALESSES, G. -*études cytologiques chez les prunus -I*, Ann. Amélior. Plantes, 20 (4), 469-483, 1970.

SALESSES, G. -études cytologiques chez les prunus -II, Ann. Amélior. Plantes, 23 (2), 145-161, 1973-b.

SALESSES, G. -*Mise au point d'une méthode de comtage des chromosomes chez les arbres fruitiéres a noyau*, Ann. Amélior. Plantes, 17 (2), 207-210, 1967.

SALESSES, G. -*Quelques donnes concernant la cytogenetique des pruniers et l'origine des pruniers domestiques*, Acta Horticulturae, 48, 59-65, 1974.

SANSDRAP, A. -*La fecondation des fleurs chez les arbres fruitiers*, Le fruit Belgue, 381 (46), 5-32, 1978.

SERVIÇO METEOROLαGICO NACIONAL -*Atlas climatológico de Portugal Continental*, Lisboa, Instituto Nacional de Meteorologia e Geofisica, 1974.

SHIVANA, K.R;HESLOP-HARRISON, J. -*Menbrane state and pollen viability*, Ann. Bot., 47, 759-770, 1981.

SOCIAS I COMPANY, R. -*Flower sterility in almond*, Acta Horticulturae, 139, 69-73, 1983.

SOCIAS I COMPANY, R.;KESTER, D.E.;BRADLEY, M.V. -*Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 10 (5), 1976, 490-493.

SOCIAS I COMPANY, R.;FELIPE, A.J. -*Pollen tube growth and fruit set in a self-compatible almond selection*, HortScience, 22 (1), 113-116, 1987.

SOCIAS, R.;FELIPE, A.J. -*La polinizacion del Almendro*, Hoja Tecnica I.N.I.A., Madrid, 1979.

SOKAL, R.R.;ROHLF, F.J. -*Biometry*, 2ª edição, San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1981.

SOLDATOV, I.V. -*Apomixie haploide chez les arbres fruitiers à noyau*, Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada, 123, 81-84, 1982.

SOULIE, M.H. -*Etude du caractere d'auto-fertilite d'hybrides et mutants de Prune d'Ente selon deux techniques: fecondation in vitru - fluorescence; autofecondation sous sachet*, Memoire de Fin d'Etude, Pont-de-la-Maye, Station d'Arboriculture Fruitiére -INRA, 1980.

SOUSA, L.O.M.C. -*Reflexões a propósito do conceito de incompatibilidade sexual nas plantas*, Separata dos Anais do Instituto Superior de Agronomia, 24, 251-262, 1967.

SOUTY, J. -*De la pollinization chez le prunier, Communication au Congrés de l'Association française pour l'Avancement des Sciences*, Clermond-Ferrand, 1949.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. -*Pollen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1974.

SURANYI, D. -*Characterization of the self-fertile capacity of stone-fruits by the flower index*, Acta Agronomica Academiae Scietiarum Hungariae, 17 (1-2), 181-187, 1971.

SURANYI, D. -*Sexual correlation in self-compatible and self-incompatible varieties of some Prunus*, Acta Agronomica Academiae Scietiarum Hungariae, 18 (1-2), 179-185, 1973.

SURANYI, D. -*Correlation between gynoecium and androecium in Prunoideae species*, Acta Agronomica Academiae Scietiarum Hungariae, 20 (3-4), 379-388, 1974.

SURANYI, D. -*Differentiation of self-fertility and self-sterilirty in Prunus by stamen number/pistil length ratio*, HortScience, 11 (4), 406-407, 1976.

SURANYI, D. -*A new method for determining self-fertility in plum varieties*, Acta Agronomica Academiae Scietiarum Hungariae, 27 (3-4), 247-257, 1978.

SURANYI, D. -*A study of some phenophases in plums, Acta Agronomica Academiae Scietiarum Hungariae*, 29 (3-4), 265-282, 1980.

SPERANZA, A.;CALZONI, G.L. -*Pollen germination and pollen-tube characteristics in a range of apple cultivars*, Journal of Horticultural Science, 47, 191- 198, 1972.

TABUENCA, M.C. -*Necessidades de frio invernal de variedades de ciruelo*, Annales Aula Dei, 8, 383-391, 1967.

TABUENCA, M.C. -*Necessidades de frio invernal y exigencias de calor previas a la floración de variedades de ciruelo europeo*, Annales Aula Dei, 15 (1-2), 148-159, 1980.

TABUENCA, M.C. -*Necessidades de frio de ciruelo*, Separata de Annales Aula Dei, 16, (3-4), 202-207, 1983.

TABUENCA, M.C.;HERRERO, J. -*Influencia de la temperatura en la época de floración de frutales*, Annales Aula Dei, 8 (1), 115-153, 1965.

TAMARO, D. -*Tratado de Fruticultura*, 4ª edição, Barcelona, 1920.

THOMPSON, M.M.;LIU, L.J. -*Pollination and erratic bearing in 'Italian prune'*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 97 (4), 489-491, 1972.

THOMPSON, M.M.;LIU, L.J. -*Temperature, fruit set, and embryo sac development in 'Italian' prune*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 98 (2), 193-197, 1973.

TORREGROSSA, J.P. -*La maôtrise de la pollinisation comme facteur de qualité*, L'Arboriculture Fruitiére, 396, 10-13, 1987.

TOWNSEND, C.E. -*Seasonal and temperature effects on selfcompatibility in tetraploid alsike clover, Trifolium hibridum L.*, Crop Science, 6, 409-441, 1968.

TUPY, J. -*Callose formation in pollen tubes and incompatibility*, Biologia Plantarum, 1 (3), 192-198, 1959.

U P O V -*Principes directeurs pour la conduite de l'exa-men des caracteres distinctifs, de l'homogeneite et de la stabilité*, documento UPOV TG /41/4, 1977.

UDACHINA, E. G. -*Etude de la croissance des tubes polliniques dans le pistil du cerisier par la methode de fluorescence sous microscope*, Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada, 101, 85-94, 1976.

VASCONCELOS, J.C.;COUTINHO, M.C.P. -*Noções sobre anatomia das plantas superiores*, Série Estudos e Informação Técnica -nº 29, Lisboa, Direcção-geral dos Serviços Agricolas, 1946.

VAN GASTEL, A.J.G.;NETTANCOURT, D. -*The effects of different mutagens on self-incompatibility in Nicotiana alata Link and Otto-I. chronic gamma irradiation*, Radiation Botany, 1974, 14, 43-50, 1974.

VASIL, I.K. -*Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth, in Pollen Physiology and Fertilization*, North-Holland Publishing Company, 1964, 107-119.

VASILAKAKIS, M.D.;PORLINGIS, I.C. -*Self-compatibility in 'Truoito' almond and the effect of temperature on selfed and crossed pollen tube growth*, HortScience, 19 (5), 659-661, 1984.

VISSER, T. -*Germination and storage of pollen*, Medel. Landb. Hoogesch., Wageningen, 55, 1955.

VISSER, T.;MARCUCCI, M.C. -*Pollen and pollination experiments.IX. The pioneer pollen effect in apple and pear related to the interval between pollinations and the temperature*, Euphytica, 32, 703-709, 1983.

VISSER, T.;OOST, E. H. -*Pollen and pollination experiments.V. An empirical basis for a mentor pollen effect observed on the growth of incompatible pollen tubes in pear*, Euphytica, 31, 305-312, 1982.

VITI, R.;VITAGLIANO, C.;BARTOLINI, S. -*Influenza di diversi trattamenti ad azione fitoregolatrice sulla germinabilità ed attitudine fecondativa del polline*, Rivista Ortoflorofrutt. Ital., 70, 53-63, 1986.

WELLS, J.M.;BUKOVAC, M.J. -*Effect of fruit thining on size and quality of 'Stanley' plum (Prunus domestica L.)*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103 (5), 612-616, 1978.

WEINBAUM, S. A.;POLITO, V.S.;KESTER, D.E. -*Pollen retention following natural self pollination in peach, almond, and peach x almond hybrids*, Euphytica, 35, 193-200, 1986.

WEINBAUM, S.A.;SHAW, D.V.;MURAOKA, T.T. -*Independence of self-compatibility and potentiality for self-pollination in peach x almond hybrids*, Euphytica, 41, 53-58, 1989.

WILLIAMS, R. R. -*The effect of nitrogen on the self-fruitfulness of certain varietes of cider apples*, J. Hort. Sci., 38, 52-60, 1963.

WILLIAMS, R.R. -*The effective pollination period for some apple and pear varieties*, A.R. Long Ashton Agric. Hort. Res. Sta., 136-138, 1966.

WILLIAMS, R:R: -*Factors affecting pollination in fruit trees,. in Physiology of trees crops*, Londres, Academic Press, 1970, 193-207.

WILLIAMS, R.R. et al -*Flower receptivity, pollen transfer and fruit set variations during a single flowering period of Cox's Orange Pippin apple*, Jour. Hort. Sci., 59 (3), 337-347, 1984.

WILLIAMS, R:R.;MAIER, M. -*Pseudocompatibility after self-pollination of the apple Cox's Orange Pippin*, J. Hortic. Science, 52, 475-483, 1972.

WILLIAMS, W. -*Genetics of incompatibility in Alsike clover, Trifolium hibridum*, Heredity, 5 (1), 51-73, 1951.

WILSON, D.;JONES, R.P.;REEVES, J. -*Selection for prolonged winter dormancy as a possible aid to improving yield stability in european plum* (Prunus Domestica L.), Euphytica, 24, 815-819, 1975.

WINKLER, S.H. -*The influence of pruning on the germinability of pollen and the set of berries in Vitis vinifera*, Hilgardia, 2, 107-124, 1926.

RESUMO

Conhecida e apreciada desde há muito na Europa meridional, a cultivar de ameixeira europeia 'Rainha Claudia Verde' existe em cultura numa pequena região do Alto Alentejo interior, onde constitui uma importante componente nos sistemas das pequenas explorações familiares.

Importada de França não se sabe bem quando, esta variedade deu origem a uma importante variabilidade genética na região, como resultado do tipo de propagação utilizado pelos agricultores -transplantação das pôlas. Por outro lado a reestruturação do velho pomar tradicional impõe o conhecimento e adaptação à região de algumas tecnologias de produção fundamentais, das quais o problema da polinização se afigura prioritário atendendo à auto-esterilidade da cultivar.

Paralelamente à prospecção e caracterização não só dos clones de 'Rainha Claudia Verde' mais interessantes, mas também de outros tipos de ameixeiras regionais, foi objectivo deste trabalho estudar o aspecto da fertilidade na cultivar sob os seguintes aspectos: viabilidade do pólen e sua relação com o factor temperatura; nível de incompatibilidade dos vários clones em auto-polinização e inter-polinização entre eles; eficácia de algumas cultivares como polinizadoras da 'Rainha Claudia Verde'; influência da temperatura no Periodo de Polinização Efectivo, através das alterações provocadas no crescimento do tubo polinico e na longevidade dos óvulos.

Prolongando-se durante quatro anos, os trabalhos experimentais decorreram parte no campo, parte no laboratório recorrendo-se às técnicas da germinação de pólen "in vitro", cultura de pistilos em ramos separados e sua observação ao microscópio em fluorescência.

Das observações efectuadas sobre a germinação e crescimento do tubo polinico "in vitro" verificou-se ser a viabilidade do pólen dos clones de 'Rainha Claudia Verde' bastante alta, superior mesmo às outras cultivares auto-férteis testadas. As percentagens de germinação mais elevadas, ao fim de 12 horas de incubação, registaram-se entre 15

e 20°C, enquanto que a velocidade de crescimento do tubo polinico foi superior a 25°C.

Todos os clones de 'Rainha Claudia Verde' estudados revelaram ser auto-incompativeis, quer nos ensaios de polinização nos pomares, quer nas observações do crescimento do tubo polinico "in vivo". A temperatura parece no entanto ser decisiva, para a maior ou menor rapidez com que a reacção de incompatibilidade se dá ao nível do estilete. A 15 e 20°C o fenómeno da paragem do tubo é bastante retardado, chegando a percorrer até 2/3 do estilete.

Contrariamente ao referido em outras regiões de produção, parece verificar-se um certo grau de compatibilidade entre clones morfológicamente diferentes, mas cujas caracteristicas são ainda as da 'Rainha Claudia Verde'. Nas observações efectuadas sobre 12 clones, houve cerca de 25% de combinações com um elevado numero de pistilos que atingiram os óvulos. Esta compatibilidade parcial, que poderá em parte dever-se não só às diferenças genéticas ao nível dos alelos S que comandam o mecanismo de incompatibilidade, mas também às temperaturas mais elevadas do laboratório, inclue-se perfeitamente naquilo que alguns autores denominam de pseudo-compatibilidade. Mesmo assim ela parece ser o principal responsável para a produção residual que se verifica na maioria dos pomares da região, que não possuem qualquer tipo de polinizadora eficaz.

A eficiência de polinizadora de quatro cultivares, 'Stanley', 'Prune d'Ente' e duas regionais, foi avaliada em relação à viabilidade do pólen, concordância de floração com a 'Rainha Claudia Verde' e compatibilidade com a mesma. De forma geral a cultivar mais interessante foi a 'Stanley', sendo a que proporcionou todos os anos um índice mais elevado de frutificação, assim como uma melhor concordância no periodo de floração.

A compatibilidade da 'Prune d'Ente' e da poliniza-dora regional P UE 13 foi também bastante boa, não se tendo observado um índice final de frutificação significativamente inferior ao da 'Stanley' em três dos quatro anos estudados. No entanto a concordância do periodo de floração destas cultivares em relação à 'Rainha Claudia Verde' foi bastante

aleatória ao longo dos anos, sendo mesmo quase inexistente em 1988 e 1989 relativamente à P UE 13.

A cultivar regional P UE 6 apesar de ter manifestado uma boa concordância no periodo de floração, assim com uma elevada viabilidade do pólen "in vitro", revelou ser uma deficiente polinizadora, não proporcionando em média mais que 6.4% de frutificação final.

Dos ensaios de polinização efectuados no laboratório a várias temperaturas, resultou bem evidente a importância que este elemento tem na duração do Periodo de Polinização Efectivo. Com efeito, embora as baixas temperaturas durante a floração, que retardam o crescimento do tubo polinico, não sejam em geral um problema na região em causa, anos há em que temperaturas demasiado elevadas podem provocar uma degenerescência precoce dos óvulos, diminuindo por consequência o PPE. No estudo por nós efectuado, temperaturas superiores a 25°C mostraram ter esse efeito sobre os pistilos. Assim o PPE aumenta com a taxa de crescimento do tubo polinico até à temperatura de 25°C, atingindo uma duração de 5 dias. Em contrapartida para 15°C o PPE reduz-se a 3 dias apenas.

SUMMARY

The European prune cultivar 'Rainha Claudia Verde' is known for centuries in meridional Europe. It is grown in a small region of the Alto Alentejo (south of Portugal), being an important source of cash income for the small familiar farms.

Originally from France it arrived in Portugal in an uncertain date. It gave rise to important genetic variability in this region, as a result of propagation used by suckers, which should be preserved. On the other hand, the convertion of the traditional and aged orchards needs knowledge and the adaptation of fundamental technology to this region, specially on subjects concerned with the pollinating problem due to the self-sterility of this cultivar.

The objectives of this work were:

- the prospection and caracterization of the 'Rainha Claudia Verde' clones more relevant in this region, and other less important regional prune cultivars.

-the study of the cultivar fertility in the following aspects: pollen viability and its relation with temperature; incompatibility level of the clones in self-pollinationa and inter-polinization; eficiency of some others cultivars used as pollinizers of 'Rainha Claudia Verde'; influence of temperature on the Efective Polinization Period (EPP), by the changes promoted on the growth of the pollen tube and ovule longevity.

During four years of field and laboratory research, we used "in vitro" techniques for pollen germination, culture of pistils in separeted small twigs and its observation using fluorescence tecnhique.

From "in vitro" observations of the pollen germination and pollen tube growth, it was stated that the pollen viability of 'Rainha Claudia Verde' clones is very hight, and even superior to the others cultivars self-fertile tested. Over a 12 hour incubation period, the highest pollen ger-

minability occured at 15°C and 20°C, while the growth of the pollen tube was faster at 25°C.

All the "Rainha Claudia Verde" clones studied reveled to be self-incompatible, both in the field studies with a 0% of fruit set in controled self-pollination, and in the observation of the pollen tube growth using fluorescence technique. Temperature seems to be the most important factor for the development of the incompatibility reaction at the style level. At 15°C and 20°C the brake on the growing of the tube is retarded reaching up to 2/3 of the style lenght.

In contrast to references from other production regions, there seems to be some degree of compatibility between different clones with the same caracteristiques of 'Rainha Claudia Verde'. On the observation of 12 clones, about 25% of the combinations showed a high number of tubes that reached the ovules. This partial compatibility can be explained, in some extent, by genetic differences at the S allels that govern the incompatibility mecanism refered by some authors. However this can be responsable for some of the residual production verified in the majority of the orchards of this region, which lack any kind of efficient pollinizers.

The cross-pollination efficiency of four cultivars, 'Stanley', 'Prune d'Ente' and two regional cultivars, was evaluated in relation to the pollen viability, and flowering concordance and cross-compatibility related to 'Rainha Claudia Verde'. In general terms the most interesting cultivar was the 'Stanley' that showed in each observed years, the highest fruit set as well as a better concordance of flowering period.

The compatibility of 'Prune d'Ente' and regional cultivar P UE 13 was also very good, with a final fruit set not significantly lower than the 'Stanley' in three of the four years studied. However the concordance of the flowering period of the above cultivars in relation to 'Rainha Claudia Verde' was very random over the years, being almost inexistent in 1988 and 1989 for the cultivar PUE 13.

The regional cultivar P UE 6 showed a good bloom period concordance as well as high pollen viability "in

vitro", but revealed to be a defficient pollinizer, giving not more than 6.4% of final fruit set.

Laboratory experiments were conducted to reveale the importance of temperature in the extension of EPP. Lower temperatures during bloom period which retarded the pollen tube growth are not frequent in this region. On the other hand, high temperatures may induce precoce senescence in ovules, with a consequent shortening of the EPP. This was evident at temperatures above 25°C. Consequently 25°C was found to be the optimum temperature at which the EPP reached 5 days. At 15°C the EPP was shortened to 3 days only.

NOTA FINAL

O autor deseja expressar o seu agradecimento a todos quanto directa ou indirectamente contribuiram para a realização deste trabalho, de entre os quais entende dever destacar por o seu contributo ter sido relevante: o Prof. Cat. Miguel Pereira Coutinho do Departamento de Botânica do Instituto Superior de Agronomia, sob cuja orientação trabalhou, pela pronta colaboração e estimulo dispensados; o Prof. Cat. Carlos Martins Portas do Departamento de Fitotecnia do Instituto Superior de Agronomia, pelas sugestões recebidas e revisão da dissertação; os Investigadores R. Renaud e G. Salesses da 'Station d'Arboriculture Frutiére', INRA-Bordeaux, pela ajuda prestada na definição e aprendizagem de algumas técnicas utilizadas, bem como no delineamento dos ensaios efectuados; ao Prof. J. Antero Araujo do Departamento de Fitotecnia da Universidade de évora, pelo estimulo e facilidades de trabalho proporcionados no departamento, bem como pela revisão do texto; ao Investigador Joaquim A. P. Vacas de Carvalho, pelo precioso apoio na interpretação estatistica dos resultados; finalmente aos colegas e pessoal técnico do departamento de Fitotecnia da Universidade de évora, Station d'Arboriculture Fruitiére -INRA-Bordeaux, departamentos de Olivicultura e Pomoideas e Prunoideas da Estação Nacional de Fruticultura 'Vieira da Natividade', por toda a ajuda e facilidades dispensadas, que foram essenciais para a elaboração deste trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa Mobilizador de Ciência e Tecnologia -projecto nº 87 283, financiado pela Junta Nacional de Investigação Cientifica e Tecnologica.

O Instituto Nacional de Investigação Cientifica subsidiou as despersas de execução gráfica e impressão desta dissertação, ao abrigo do decreto-lei nº 414/80.

ANEXO 1- FICHA DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

1- RAMO DO ANO:

1.1-comprimento dos entre-nós -curtos ; médios; longos. (1,2,3)

1.2-pubescência -nula; fraca; média; forte. (1,2,3,4)

1.3-cochinetes -pouco salientes; salientes; muito salientes. (1,2,3,4)

2- PARTE TERMINAL FOLHOSA:

2.1-coloração -de verde amarelado a castanho esverdeado. (1,2,3,4,5)

3- FOLHA ADULTA:

3.1-relação comprimento-largura do limbo (em cm); 1-(1,1 a 1,3; 2-(1,31 a 1,4); 3-(1,41 a 1,5); 4-(1,51 a 1,6);5 -(>1,6)

3.2-maior largura do limbo-a partir da base. 1-(< de 1/2); 2-(a 1/2); 3(> de 1/2)

3.3-forma do limbo -arredondada; eliptica; oval; alongada. (1,2,3,4)

3.4-aspecto -plana; ondulada; curvada longitudinalmente. (1,2,3)

3.5-dentes -crenada; crenada / serrada; serrada. (1,2,3)

3.6-nervuras -pouco salientes; salientes; muito salientes. (1,2,3)

3.7-côr da pagina superior -verde claro; verde; verde escuro. (1,2,3)

3.8-pubescência da pagina inferior -glabra a muito pubescente. (1,2,3,4,5)

3.9-comprimento do peciolo (em cm); 1-(< 1); 2-(1 a 1,3); 3-(1,3 a 1,6); 4-(1,7 a 2); 5-(> 2).

3.10-pubescência do peciolo -glabro a muito pubescente. (1,2,3,4,5)

3.11-dimensão dos nectários -muito pequenos a grandes. 1-(< 0,5); 2-(0,5 a 1); 3-(> 2).

3.12-côr dos nectários -de amarelo claro a acastanhado. (1,2,3,4,5)

4- FLOR:

4.1-sépalas -de aplicadas contra a corola a muito inflectidas e tocando o receptáculo. (1,2,3,4)

4.2-relação comprimento-largura das sépalas (em cm). 1-(1 a 1,5); 2-(1,5 a 2) 3-(2 a 2,5); 3-(> 2,5)

4.3-pubescência das sépalas -de fraca a forte. (1,2,3)

4.4-cor da parte interna do recéptáculo -de amarelo pálido a verde. (1,2,3)

4.5-pubescência da parte externa do receptáculo -de glabro a forte. (1,2,3,4)

4.6-diâmetro da corola(em cm). 1-(<1,6); 2-(1,7 a 2); 3-(2,1 a 2,4); 4-(>2,4)

4.7-relação comprimento - largura das pétalas (em cm). 1-(< 1); 2-(1 a 1,25); 3-(> 1,25)

4.8-frequência de pétalas suplementares -de nula a forte. (1,2,3)

4.9-numero médio de estames. - 1-(< 10); 2-(10 a 13); 3-(13 a 16); 4- (> 16)

4.10-espessura do filete -de fino a grosso. (1,2,3)

4.11-cor das anteras -de amarelo palido a alaranjado. (1,2,3)

4.12-relação comprimento - largura das anteras (em mm). 1-(=1); 2-(1 a 1,5); 3-(> 1,5)

4.13-comprimento do pistilo(em cm). 1-(<10); 2-(10 a 13); 3-(13 a 16);4-(>16)

4.14-pubescência do ovário -de glabro a muito pubescente. (1,2,3)

4.15-posição do estigma em relação às anteras. 1-acima; 2-ao mesmo nivel; 3-abaixo.

4.16-posição do estigma em relação ao estilete-inclinado; perpendicular.(1,2)

4.17-comprimento do pedunculo(em cm).1-(<15); 2-(15 a 20); 3-(20 a 25);4(>25)

4.18-pubescência do pedunculo -de glabro a muito pubescente. (1,2,3,4)

5- FRUTO:

5.1-tamanho -de muito pequeno a muito grande,(em g). 1-(<10); 2-(10 a 30); 3-(30 a 50); 4-(>50)

5.2-forma visto de topo (relação largura-espessura) 1-(>1); 2-(=1); 3-(<1)

5.3-forma geral visto de perfil (relação comprimento/largura) - de achatado a muito alomgado. 1-(< 1); 2-(=1); 3-(1 a 1,3); 4-(> 1,3)

5.4-profundidade da sotura -de muito fraca a forte. (1,2,3)

5.5-simetria visto de face -simétrico; assimétrico. (1,2)

5.6-profundidade da cavidade peduncular (em mm) 1-(< 4); 2-(4 a 6); 3-(> 6)

5.7-cor - 1- amarelo; 2- amarelo esverdeado; 3- verde claro; 4- verde escuro; 5- rosado; 6- vermelho; 7- azulado; 8- azul violácio.

5.8-intensidade da pruina -de pouco abundante a muito abundante. (1,2,3)

5.9-comprimento do pedunculo(em cm). 1-(<1); 2-(1 a 1,5); 3-(1,5 a 2); 4-(>2)

5.10-espessura do pedunculo -fino; médio; grosso. (1,2,3)

5.11-pilosidade do pedunculo -de glabro a forte. (1,2,3)

5.12-espessura da epiderme -fraca; média ;forte. (1,2,3)

5.13-cor da polpa -de esbranquiçada a vermelha. (1,2,3)

5.14-consistencia da polpa -mole; media; dura. (1,2,3)

5.15-suculência da polpa -pouco; suculenta; muito; (1,2,3)

6- CAROÇO:

6.1-aderência do caroço à polpa -livre; semi-aderente; aderente. (1,2,3)

6.2-peso (em gramas). 1-(<0,5); 2-(0,5 a 1); 3-(1,1 1,5); 4-(>1,5)

6.3-forma geral visto de perfil -de circular a alongado.(relação largura/comprimento). 1-(> 0,8); 2-(0,8 a 0,7); 3-(0,7 a 0,6); 4-(< 0,6)

6.4-forma geral visto de face -globoloso; semi-globoloso; achatado. (relação espessura/comprimento). 1-(> 0,6); 2-(0,6 a 0,5); 3-(0,5 a 0,4); 4-(< 0,4)

6.5-forma geral visto de topo -arredondado a alongado. (relação largura/espessura). 1-(< 1,4); 2-(1,4 a 1,6); 3-(1,6 a 1,8); 4-(>1,8)

6.6-profundidade do sulco dorsal -de pouco a muito profundo. (1,2,3)

6.7-largura da zona ventral -estreita; média; larga. (1,2,3)

6.8-saliência das arestas laterais ventrais-fraca; média; forte. (1,2,3)

6.9-rugas na base da face lateral -de ligeira a fortemente enrugada. (1,2,3)

ANEXO 2

P UE 1	P UE 2	P UE 6	P UE 13
1-RAMO DO ANO:			
1.1 - médios	médios	médios	médios
1.2 - ligeir.	glabros	média	ligeir.
1.3 - salientes	salientes	salientes	salientes
2-PARTE TERMINAL FOLHOSA:			
2.1 - vermelha	verde amarelada	verde acast.	vermelha
3-FOLHA ADULTA:			
3.1 - 7.0-5.0	7.5-4.2	6.0-3.7	6.0-5.0
3.2 - a 1/2	a 3/5	a 1/2	a 3/5
3.3 - eliptica	alongada	eliptica	arredondada
3.4 - plana	plana	curv.longitud.	plana
3.5 - crenada	serrada	serrada	serrada
3.6 - muito sal.	salientes	salientes	muito salientes
3.7 - verde esc.	verde	verde	verde escuro
3.8 - muito pouco	pouco	média	pouco
3.9 - 1.4	1.7	1.2	1.4
3.10- pouco	alguns	média	muito pouco
3.11- muito pequenos	muito pequenos	pequenos	pequenos
3.12- avermelhados	verde claros	amarelo acast.	avermelhados
4-FLOR:			
4.1 - aplicadas	inflectidas	aplicadas	inflectidas
4.2 - 5.0-2.5	4.0-1.8	4.5-2.2	4.0-1.8
4.3 - ligeir.	ligeir.	ligeir.	ligeir.
4.4 - verde amarel.	alaranjado	verde amar.	verde escuro
4.5 - médio	médio	médio	ligeir.
4.6 - 2.3	2.5	2.3	2.1
4.7 - 0.9-0.7	1.1-0.8	0.9-0.7	0.9-0.7
4.8 - nula	fraca	nula	fraca
4.9 - 24	23	26	28
4.10- fino	muito fino	médio	fino
4.11- amar. enxofre	amar. alaranj.	amar. alaranj.	amare. alaranj.
4.12- 0.9-0.8	0.8-0.7	0.9-0.8	0.9-0.8
4.13- 1.3	1.3	1.2	1.2
4.14- glabro	glabro	glabro	glabro
4.15- lig. abaixo	acima	lig. acima	igual
4.16- inclinado	inclinado	inclinado	inclinado
4.17- 1.3	1.5	1.4	1.7
4.18- ligeiramente	médio	médio	ligeiramente
5-FRUTO:			
5.1 - pequeno	médio	pequeno	pequeno
5.2 - 30-31	28-25	32-31	33-32
5.3 - arredon.achat.	alongada	arredondada	arredondado
5.4 - média	média	fraca	muito fraca
5.5 - simétrico	lig. assimé.	lig. assimé.	simétrico
5.6 - 4	3	4	3
5.7 - verde escuro	verde claro	azul violácio	azul violácio
5.8 - abundante	média	média	média
5.9 - 1.3	1.3	1.4	1.5
5.10- médio	fino	grosso	médio
5.11- glabro	glabro	alguns pêlos	alguns pêlos
5.12- média	fina	média	fraca
5.13- verde	amarela	verde	verde amarela
5.14- mole	média	mole	mole
5.15- pouco	suculenta	pouco	pouco
6-CAROÇO:			
6.1 - semi-ader.	livre	semi-ader.	semi aderente
6.2 - 0.6	0.5	1.0	0.6
6.3 - arredondado	alongado	elipt.arredond.	arredondado
6.4 - elipt.achat.	achatado elipt.	achat. eliptico	achatado
6.5 - elipt.arred.	eliptico	elipt.arred.	eliptico arred.
6.6 - médio	pouco prof.	médio	médio
6.7 - estreita	estreita	larga	médio
6.8 - fraca	fraca	média	fraca
6.9 - ligeiramente	ligeiramente	ligeiramente	ligeiramente

ANEXO 3

P UE 9	P UE 3	P UE 4	P UE 7
1-RAMO DO ANO:			
1.1 - médios	médios	médios	médios
1.2 - fraca	ligeir.	ligeira.	ligeira.
1.3 - salientes	salientes	salientes	salientes
2-PARTE TERMINAL FOLHOSA:			
2.1 - cast. averm.	cast.averm.	cast.averm.	cast.averm.
3-FOLHA ADULTA:			
3.1 - 10-5.2	10 - 5	11 - 5.5	7.5-5.5
3.2 - a 1/2	a 1/2	a 3/5	a 1/2
3.3 - elipt.al.	eliptica	elipt. along.	eliptica
3.4 - curv.long.	curv.long.	dobra. base	curv. longit.
3.5 - crenada	crenada	crenada	crenada
3.6 - salientes	salientes	salientes	salientes
3.7 - verde escuro	verde escuro	verde	verde
3.8 - fraca	alguma	fraca	pouca
3.9 - 1.4	1.7	1.8	1.5
3.10- fraca	fraca	fraca	média
3.11- médios	médios	médios	pequenos
3.12- amarelos	amarelos	amarelos	amer. acast.
4-FLOR:			
4.1 - inflectidas	inflectidas	inflectidas	inflectidas
4.2 - 5.0-3.0	5.5-3.1	5.0-3.0	5.0-2.5
4.3 - ligeira	média	ligeira	ligeira
4.4 - verde amar.	verde	amar. alaran.	verde amar.
4.5 - ligeir	média	ligeir.	glabro
4.6 - 27	30	26	25
4.7 - 13-10	14-9.0	12-9.9	12-9.0
4.8 - nula	nula	fraca	nula
4.9 - 26	27	28	28
4.10 -fino	médio	médio	médio
4.11 -amare alar.	amarelo	amar.enxofre	amar.enxofre
4.12 -1.0-0.9	0.8-0.7	1.0-0.9	1.0-0.9
4.13 -1.3	1.5	1.3	1.3
4.14 -glabro	média	glabro	glabro
4.15 -lig.superior	1/3 superior	superior	superior
4.16 -inclin.	inclin.	inclin.	geral.inclin.
4.17 -1.5	1.3	1.2	1.0
4.18 -ligeiramente	ligeiramente	ligeiramente	ligeiramente
5-FRUTO:			
5.1 - muito grande	grande	médio	médio
5.2 - 42-40	37-35	35-35	36-37
5.3 - oblongo	oblonga	arredon.achat.	arred. achat.
5.4.- fraca	média	média	média
5.5 -assimétrico	lig.assimé.	simétrico	lig assimét.
5.6 - 5	5	4	4
5.7 -verde averm.	verde	verde rosado	verde rosado
5.8 - média	média	abundante	abundante
5.9 - 1.6	1.2	1.2	1.3
5.10 - médio	grosso	médio	média
5.11 - glabro	alguns pêlos	glabro	glabro
5.12 - média	média	média	média
5.13 - amarel. alar.	verde claro	verde amarel.	verde amarel.
5.14.- média	média	média	dura
5.15 - pouco	suculenta	suculenta	suculenta
6-CAROÇO:			
6.1 - semi-ader.	semi-ader.	pouco ader.	pouco aderente
6.2 - 1.2	2.0	1.1	1.0
6.3 - elipt.arred	elipt.arred.	elipt.arred.	elipt. arred.
6.4 - elipt.achat.	elipt.achat.	elipt.achat.	elipt. achat.
6.5 - elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.	elipt. arred.
6.6 - pouco	profundo	médio	média
6.7 - média	larga	larga	larga
6.8 - média	salientes	salientes	média
6.9 - ligeir.	enrugada	ligeir.	ligeiramente

ANEXO 4

P. UE 10	P. UE 11	P. UE 46	P. UE 45
1-RAMO DO ANO:			
1.1 - médios	médios	médios	médios
1.2 - ligeir	ligeir.	ligeir.	ligeir.
1.4 - salientes	salientes	salientes	salientes
2-PARTE TERMINAL FOLHOSA			
2.1 - cast.averm.	cast.averm.	cast. averm.	cast. averm.
3-FOLHA ADULTA			
3.1 - 7.5-5.5	8.0-5.3	9.7-5.3	7.9-5.1
3.2 - a1/2	a 1/2	a 2/3	a 1/2
3.3 - eliptica	eliptica	eliptica	eliptica
3-4 -curv.longit.	curv.long.	plana	curv. long.
3.5 - crenados	crenados	crenados	crenados
3.6 - salientes	salientes	salientes	salientes
3.7 - verde	verde	verde	verde
3.8 - pouca	pouca	alguma	pouca
3.9 - 1.5	1.5	1.5	1.4
3.10 - média	média	média	média
3.11 - pequenos	pequenos	pequenos	pequenos
3.12 -amar.acast.	amar.acast.	amar.acast.	amar. acast.
4-FLOR			
4.1 - inflect.	inflect.	inflect.	inflect.
4.2 - 5-2.5	5-3	5-2.5	5-2.5
4.3 - ligeir.	ligeir.	ligeir.	ligeir.
4.4 -verde ama.	verde alar.	verde ama.	verde ama.
4.5 - ligeir.	ligeir.	ligeir.	ligeir.
4.6 - 25	25	23	24
4.7 - 1.2-0.9	1.2-0.8	1.1-0.8	1.1-0.8
4.8 - forte	fraca	nula	fraca
4.9 - 30	28	26	26
4.10 -médio	médio	médio	médio
4.11 -amare alar.	amar.enx.	amare.enx.	amare.enx.
4.12 -1.0-1.0	1.0-0.9	1.0-0.9	1.0-0.9
4.13 -1.4	1.3	1.2	1.2
4.14 -glabro	glabro	glabro	glabro
4.15 -lig.sup.	lig.sup.	igual	igual
4.16 -inclin.	direito	direito	direito
4.17 -13	12	14	14
4.18 -ligeir.	ligeir.	ligeir.	ligeir.
5-FRUTO			
5.1 - médio	médio	médio	médio
5.2 - 38-37-37	36-38-39	36-38-39	36-38-39
5.3 - lig.oblongo	arred.achat.	arred.achat.	arred.achat.
5.4 - média	média	média	média
5.5 -lig.assimé.	lig.assimé.	lig.assim.	ligeir. assim.
5.6 - 0.3	0.4	0.4	0.4
5.7 - verde	verde rosado	verde rosado	verde rosado
5.8 -muito abund.	abundante	abundante	abundante
5.9 - 1.3	1.3	1.3	1.3
5.10 - média	média	média	média
5.11 -glabro	glabro	ligeir.	glabro
5.12 - média	média	média	média
5.13 - verde amar.	verde amar.	verde amar.	verde amare.
5.14 - dura	média	média	média
5.15 - suculenta	suculenta	suculenta	suculenta
6-CAROÇO			
6.1 -pouco ader.	pouco ader.	pouco ader.	pouco ader.
6.2 - 1.0	1.0	1.3	1.0
6.3 - elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.
6.4 - elipt.achat.	elipt.achat.	elipt.achat.	elipt.achat.
6.5 - elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.
6.6 - médio	médio	médio	médio
6.7 - larga	larga	larga	larga
6.8 - forte	média	média	média
6.9 - ligeir.	ligeir.	ligeira	ligeira

ANEXO 5

P. UE 29	P. UE 31	P. UE 53	P. UE 54
1-RAMO DO ANO:			
1.1 - médios	médios	médios	médios
1.2 - média	forte	glabro	glabro
1.3 - salientes	salientes	salientes	pouco salientes
2-PARTE TERMINAL FOLHOSA:			
2 1 -cast.avermelhada	vermelha	verde acastanhada	verde acastanhada
3-FOLHA ADULTA:			
3.1 - 6.8 - 3.8	7.0 - 3.9	9.0 - 5.5	8.5 - 4.7
3.2 - a 1/2	a 1/2	a 2/3	a 2/3
3.3 - alongada	alongada	arredondada	alongada
3.4 - curv.long.	curv.long.	involuta	plana
3.5 - serrada	serrada	crenada	crenada
3.6 - salientes	salientes	muito salientes	salientes
3.7 - verde	verde	verde escura	verde
3.8 - pouco	média	pouco	pouco
3.9 - 1.2	1.2	1.5	2.0
3.10- pouco	média	média	pouco
3.11- pequenos	pequenos	esboço	pequenos
3.12- amarelos	amarelos	amarelos	verdes claros
4-FLOR:			
4.1 - inflectidas	inflectidas	inflectidas	inflectidas
4.2 - 5 - 2,5	5 - 2,5	4,5 - 2,2	4 - 1,7
4.3 - fraca	fraca	fraca	fraca
4.4 - verde amarel.	verde amarel.	alaranjado	alaranjado
4.5 - média	média	ligeiramente	ligeiramente
4.6 - 2.5	2.2	2,3	2,2
4.7 - 1 - 0,8	1,1 - 0,9	0.9 - 0,4	1 - 0,9
4.8 - nula	nula	nula	nula
4.9 - 28	27	24	23
4.10- médio	médio	fino	fino
4.11- amarelo	amarelo	amarelo	alaranjado
4.12- 0,9 - 0,8	1 - 0,9	0,8 a 0,7	0,9 a 0,8
4.13- 1,5	1,4	1,2	1,3
4.14- glabro	glabro	glabro	glabro
4.15- lig. acima	lig. acima	igual	acima
4.16- inclinado	inclinado	inclinado	inclinado
4.17- 1.2	1.2	1,4	1,7
4.18- média	média	média	média
5-FRUTO:			
5.1 - médio	médio	pequeno	pequeno
5.2 - 33-32	35-33	25-25	22-20
5.3 - oblongo	arredon. achat.	oblongo	alongado
5.4 - muito fraca	muito fraca	muito fraca	muito fraca
5.5 - assimétrico	simétrico	assimétrico	assimétrico
5.6 - 4	4	3	2
5.7 - vermelho	verde	azul violácio	vermelho
5.8 - média	média	média	pouco abundante
5.9 - 1.5	1.3	0.8	0.9
5.10- médio	médio	fino	fino
5.11- glabro	glabro	fraco	médio
5.12- média	média	fraca	média
5.13- verde	verde claro	amarela	amarela
5.14- média	média	mole	média
5.15- pouco	suculenta	pouco	pouco
6-CAROÇO:			
6.1 - aderente	aderente	aderente	semi-aderente
6.2 - 1.0	1.1	1.25	0.75
6.3 - elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.	alongado
6.4 - elipt.achat.	elipt.achat.	elipt.achat.	elipt.achat.
6.5 - elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.	elipt.arred.
6.6 - médio	médio	médio	pouco
6.7 - média	larga	larga	média
6.8 - fraca	fraca	forte	fraca
6.9 - ligeiramente	ligeiramente	forte	ligeiramente

ANEXO 6

(Combinações lineares das primeiras 7 componentes)

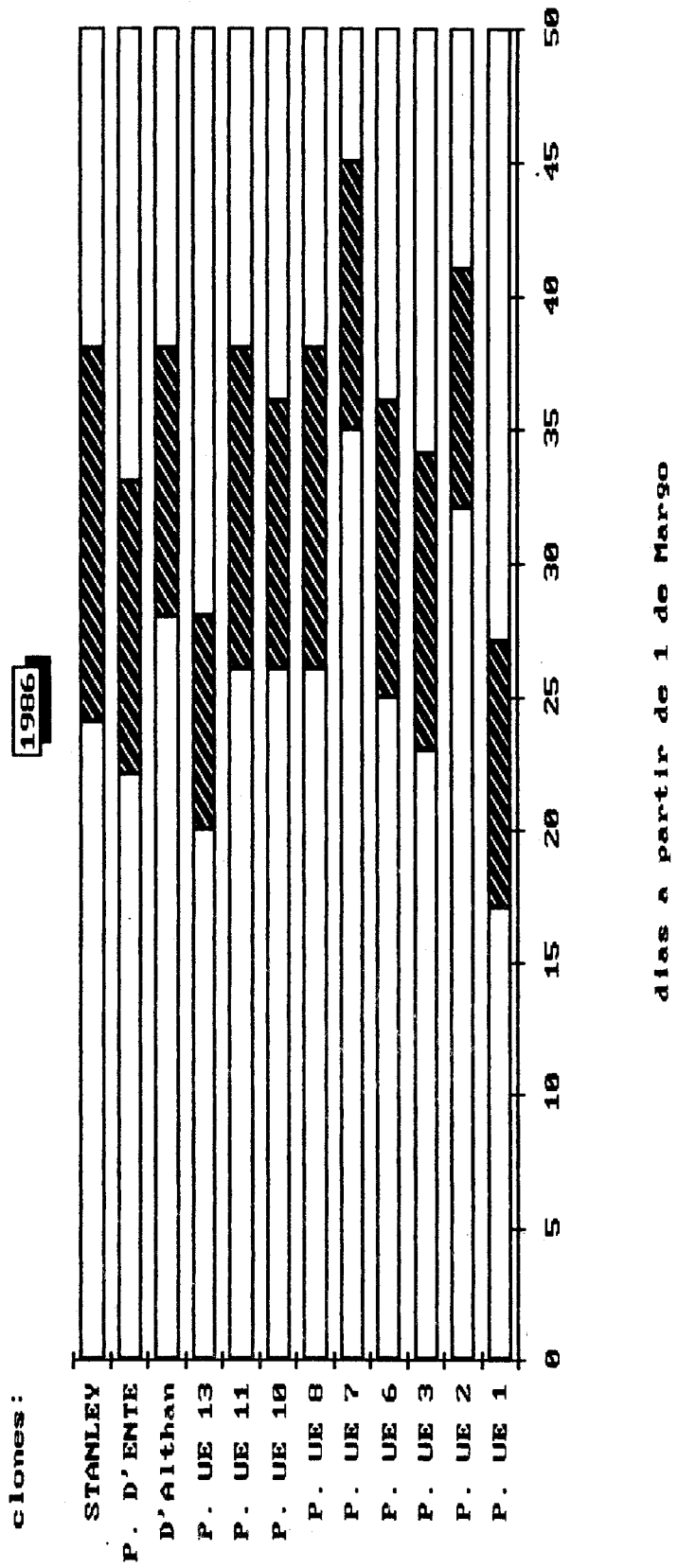
Caracteristicas	1ªComp.	2ªComp.	3ªComp.	4ªComp.	5ªComp.	6ºComp.	7ªComp.
FOLHA:							
Comp/larg.	0.004	-0.359	0.206	-0.038	0.136	-0.232	0.442
Aspecto geral	0.210	-0.046	-0.169	0.033	0.553	0.106	-0.222
Pubesc. pág. inf.	-0.049	-0.211	-0.014	-0.215	-0.466	-0.067	-0.428
FLOR:							
Comp./larg sépalas.	0.051	-0.041	-0.377	-0.271	-0.054	0.014	0.297
freq. pét. suplem.	-0.198	-0.056	-0.358	-0.213	-0.080	0.061	-0.153
comp. estig. Vs ant.	0.104	0.233	-0.034	0.243	-0.286	-0.566	0.003
FRUTO:							
tamanho	-0.301	-0.181	0.202	0.094	0.131	-0.024	-0.288
forma de perfil	0.312	-0.220	0.113	-0.264	0.043	0.107	-0.174
côr da epiderme	0.327	0.230	0.041	-0.089	-0.071	0.254	0.249
pilos. pedunculo	0.219	0.196	0.150	-0.411	-0.072	-0.073	0.058
côr da polpa	-0.272	0.036	0.199	0.365	0.085	-0.039	0.158
consistência polpa	-0.380	-0.213	-0.116	0.000	-0.059	0.237	0.109
suculência polpa	-0.382	-0.070	-0.154	-0.208	0.071	-0.231	0.141
FRUTO:							
peso caroço	-0.040	0.189	0.356	-0.245	0.296	-0.321	-0.196
forma de perfil	0.082	-0.461	0.163	-0.095	0.159	0.071	-0.074
forma de face	0.148	-0.342	0.269	-0.076	-0.168	-0.266	0.082
forma de topo	0.061	0.011	0.376	0.258	-0.244	0.438	0.014
prof. sulco dorsal	-0.198	0.370	0.126	-0.133	0.173	0.036	-0.245
larg. zona ventral	-0.232	0.157	0.223	-0.233	0.124	0.119	0.338
sal. ares. lat. vent	-0.259	0.114	0.266	-0.266	-0.276	0.164	-0.020

ANEXO 7

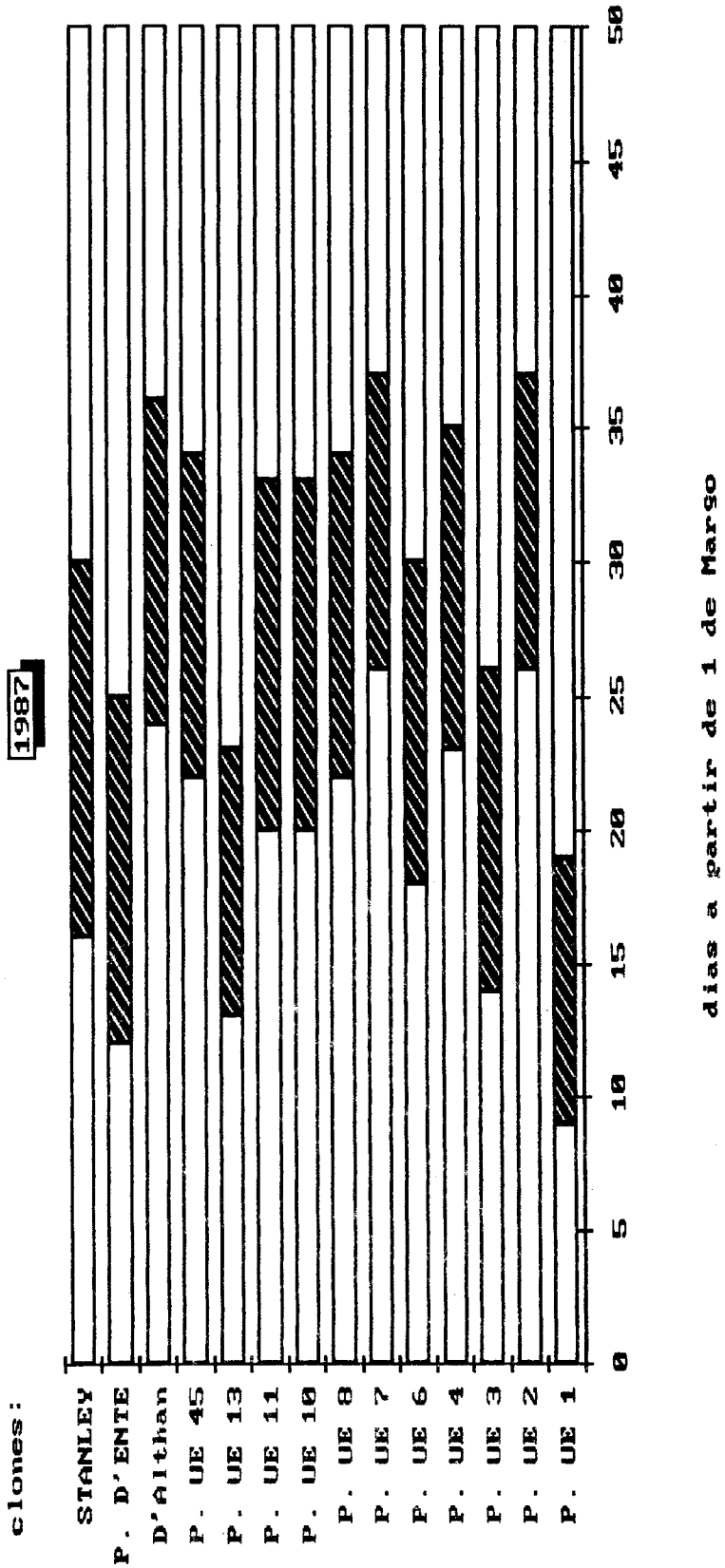
(Caracterização fisiológica)

	fecund.	matur.	vigor	porte	ramif.	produt.	altern.	monilia
P UE 1	autocomp.	8 Jul.	médio	erecto	média	elevada	fraca	resist.
P UE 2	autocomp.	25Jul.	médio	1/2ere	média	boa	fraca	sensivel
P UE 3	autocomp.	15Ago.	forte	erecto	média	boa	fraca	resist.
P UE 4	autoinc.	20Jul.	fraco	prost.	boa	fraca	média	resist.
P UE 6	autocomp.	30Jul.	fraco	prost.	boa	elevada	nula	sensivel
P UE 7	autoinc.	20Jul.	médio	aberto	média	fraca	acent.	sensivel
P UE 9	autocomp.	30Ago.	bom	aberto	boa	boa	fraca	resist.
P UE 10	autoinc.	5 Ago.	bom	aberto	fraca	média	acent.	resist.
P UE 11	autoinc.	20Jul.	bom	aberto	média	boa	média	resist.
P UE 29	-	20Jul.	médio	prost.	fraca	fraca	fraca	resist.
P UE 31	-	20Jul.	fraco	prost.	fraca	fraca	fraca	resist.
P UE 45	autoinc.	20Jul.	bom	erecto	média	boa	média	resist.
P UE 46	autoinc.	25Jul.	fraco	erecto	média	fraca	média	resist.
P UE 53	-	8 Ago.	fraco	prost.	boa	média	fraca	resist.
P UE 54	-	15Ago.	fraco	prost.	média	elevada	fraca	sensivel

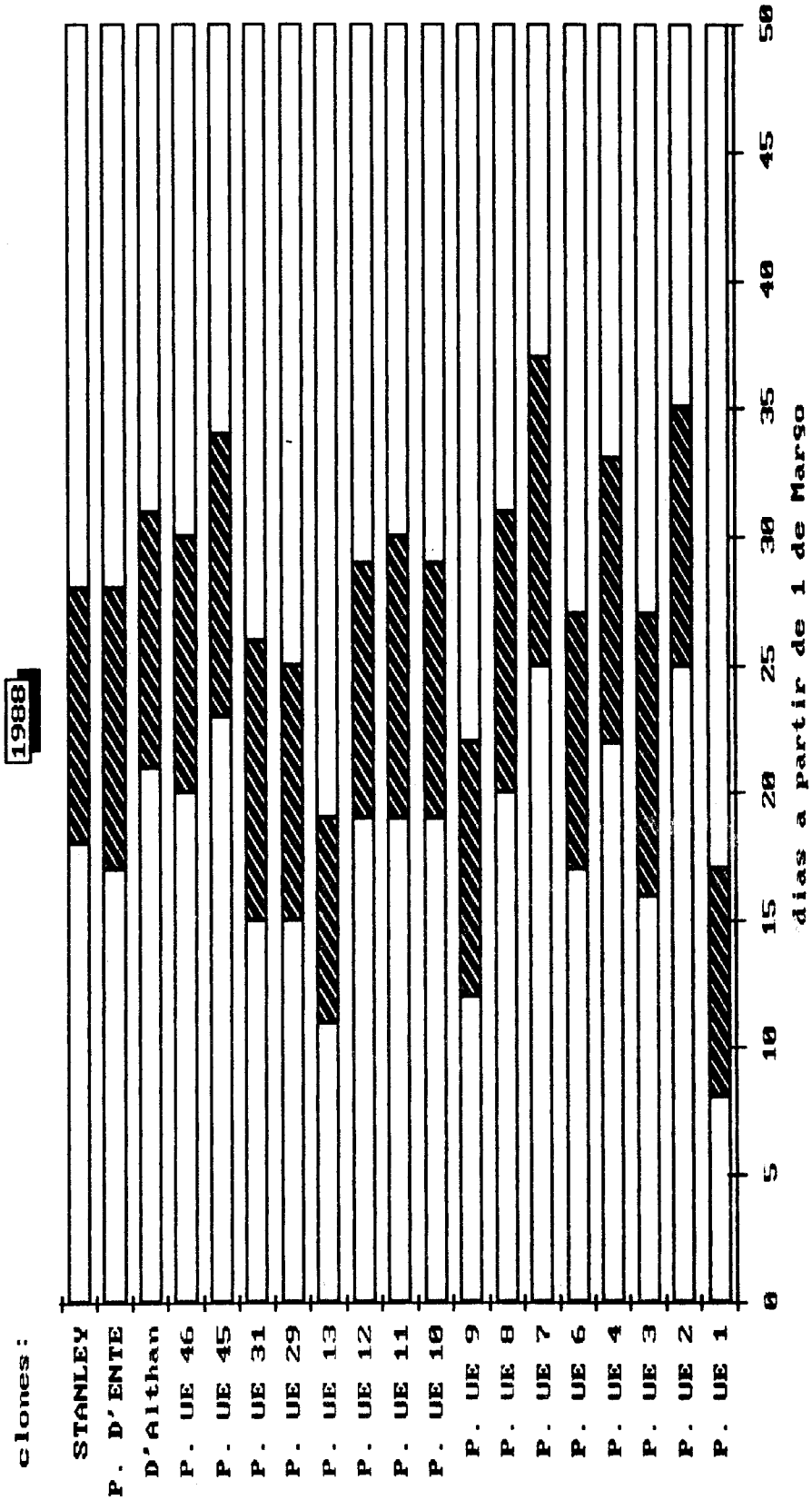
ANEXO 8 - PERIODOS DE FLORAÇÃO



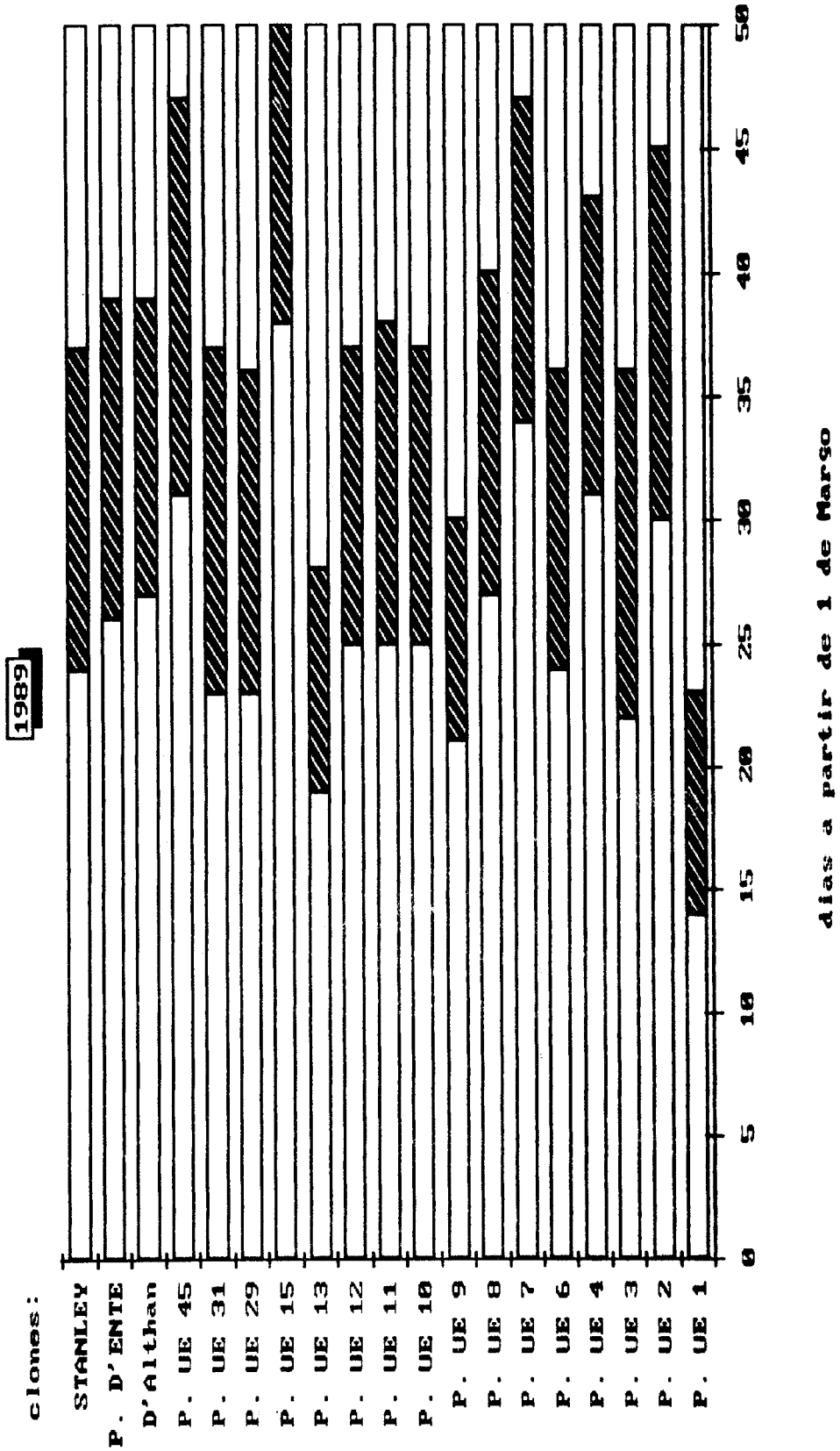
ANEXO 9 - PERIODOS DE FLORAÇÃO



ANEXO 10 - PERIODOS DE FLORAÇÃO



ANEXO 11 - PERIODOS DE FLORAÇAO



ANEXO 12

A - Percentagem de germinação:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F.
Factores principais	9	6407.84	126.98 **
Variedades	4	2503.59	49.61 **
Temperaturas	5	9531.24	188.88 **
Interacções	20	798.32	15.82 **
Varied. x Temp.	20	798.32	15.82 **
Erro	240	50.46	
Total	269		

B - Comprimento tubo polinico:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F.
Factores principais	9	1521491	204.46 **
Variedades	4	187224	25.16 **
Temperaturas	5	2588906	347.90 **
Interacções	20	133528	17.94 **
Varied. x Temp.	20	133528	17.94 **
Erro	240	7441	
Total	269		

ANEXO 13

A -Percentagem de germinação do pólen 'in vitro' em função da temperatura de incubação, para os diversos clones.

	germinação (% de grãos)		
Varied.	Função (x=temperat. de incubação)	n	r2
Stanley	Y = -16.682 + 5.227x - 0.139x2	6	0.72 ns
P UE 6	Y = -20.771 + 4.442x - 0.098x2	6	0.93 *
P UE 10	Y = -23.175 + 5.235x - 0.138x2	6	0.81 ns
P UE 11	Y = -42.578 + 8.949x - 0.212x2	6	0.85 ns
P UE 45	Y = -44.288 + 9.553x - 0.252x2	6	0.67 ns

B -Comprimento do tubo polinico em função da temperatura de incubação, para os diversos clones.

	germinação (% de grãos)		
Varied.	Função (x=Temperat. de incubação)	n	r2
Stanley	Y = -103.15 + 70.24x - 1.632x2	6	0.93 *
P UE 6	Y = -307.08 + 80.16x - 1.673x2	6	0.94 *
P UE 10	Y = -293.38 + 95.88x - 2.489x2	6	0.95 *
P UE 11	Y = -632.41 + 155.04x - 3.927x2	6	0.88 *
P UE 45	Y = -698.31 + 149.19x - 3.667x2	6	0.92 *

ns - p > 0.05 * - P < 0.05

ANEXO 14 -Percentagem de germinação do pólen "in vitro" em função do tempo de incubação, para várias temperaturas.

		germinação (% de grãos)		
Temp.	Varied.	Função (x=horas após a sement.)	n	r2
	Stanley	Y = 19.78 exp(-6.14/x)	7	0.97 **
	P UE 6	Y = -1.612 + 0.601x - 0.006x2	7	0.98 **
10°C	P UE 10	Y = -0.849 + 0.619x - 0.0085x2	7	0.93 **
	P UE 11	Y = 0.432 + 0.457x - 0.0035x2	7	0.97 **
	P UE 45	Y = 0.0270 + 0.189x + 0.00005x2	7	0.99 **
	Stanley	Y = x/ (0.0462 + 0.0223x)	7	0.97 **
	P UE 6	Y = 24.88 exp(-6.56/x)	7	0.98 **
15°C	P UE 10	Y = 0.0182 + 1.2x -0.0126x2	7	0.99 **
	P UE 11	Y = 57.92 exp(-7.82/x)	7	0.98 **
	P UE 45	Y = -9.966 + 3.601x - 0.0432x2	7	0.99 **
	Stanley	Y = x/ (0.201 + 0.0307x)	7	0.94 **
	P UE 6	Y = 32.64 exp(-4.38/x)	7	0.98 **
20°C	P UE 10	Y = 60.798x / (18.37 + x)	7	0.97 **
	P UE 11	Y = 69.64 exp(-3.82/x)	7	0.90 *
	P UE 45	Y = x/ (0.1058 + 0.0237x)	7	0.99 **
	Stanley	Y = x/ (0.0519 + 0.0457x)	7	0.99 **
	P UE 6	Y = x/ (0.0650 + 0.0265x)	7	0.99 **
25°C	P UE 10	Y = x/ (0.1138 + 0.0631x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = x/ (0.0433 + 0.0204x)	7	0.99 **
	P UE 45	Y = x/ (0.0079 + 0.0312x)	7	0.99 **
	P UE 6	Y = x/ (0.0402 + 0.0466x)	7	0.99 **
30°C	P UE 10	Y = x/ (0.0665 + 0.0772x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = x/ (0.0302 + 0.0298x)	7	0.99 **
	P UE 45	Y = x/ (0.0048 + 0.0525x)	7	0.99 **

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

ANEXO 15 -Crescimento do tubo polimico "in vitro" em função do tempo de incubação, para várias temperaturas.

		comprimento do tubo (um)		
Temp.	Varied.	Função (x=horas após a sement.)	n	r2
	Stanley	Y = x / (0.0069 + 0.0021x)	7	0.97 **
	P UE 6	Y = -25.78 + 17.72x - 0.187 x2	7	0.93 **
10°C	P UE 10	Y = 709.8 exp(-13.2/x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = 441.74 exp(-11.54/x)	7	0.97 **
	P UE 45	Y = 301,08 exp(-11.23/x)	7	0.99 **
	Stanley	Y = x/ (0.0011 + 0.0016x)	7	0.99 **
	P UE 6	Y = 559.97 - (1116.3/x)	7	0.99 **
15°C	P UE 10	Y = 617.96 exp(-4.18/x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = 6.22 + 35.31x - 0.401x2	7	0.97 **
	P UE 45	Y = x/ (0.011 + 0.0011x)	7	0.85 *
	Stanley	Y = x/ (0.008 + 0.0015x)	7	0.98 **
	P UE 6	Y = 638.31 exp(-3.88/x)	7	0.99 **
20°C	P UE 10	Y = 670.5 exp(-2.87/x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = x/ (0.0049 + 0.001x)	7	0.99 **
	P UE 45	Y = x/ (0.0048 + 0.001x)	7	0.97 **
	Stanley	Y = x/ (0.0063 + 0.0017x)	7	0.97 **
	P UE 6	Y = x/ (0.0052 + 0.0015x)	7	0.99 **
25°C	P UE 10	Y = x/ (0.0064 + 0.0018x)	7	0.98 **
	P UE 11	Y = x/ (0.0282 + 0.0112x)	7	0.99 **
	P UE 45	Y = x/ (0.0012 + 0.0012x)	7	0.99 **
	Stanley	Y = x/ (0.003 + 0.0016x)	7	0.99 **
	P UE 6	Y = x/ (0.0033 + 0.0015x)	7	0.99 **
30°C	P UE 10	Y = x/ (0.0021 + 0.0024x)	7	0.99 **
	P UE 11	Y = x/ (0.0011 + 0.0024x)	7	0.98 **
	P UE 45	Y = x/ (0.0019 + 0.0024x)	7	0.98 **

*- $p < 0.05$ **- $p < 0.01$

ANEXO 16 - Crescimento do tubo polinico "in vivo" em função do tempo de incubação para várias temperaturas-1988.

		Comprimento (% do estilete)		
Trat.	Temp.	Função (x=horas após a polinização)	n	r2
	10°	$Y = -29.18 + 0.73x - 0.0021x^2$	4	0.99 **
P UE 11	15°	$Y = -262.29x / (-880.42 + x)$	4	0.99 ns
x	20°	$Y = 118.1x / (146.61 + x)$	4	0.99 *
P UE 11	25°	$Y = x/ (0.507 + 0.017x)$	4	0.99 **
	30°	$Y = -30.57 + 2.983x - 0.031x^2$	4	0.91 ns
	10°	$Y = 100 - 182.6 * \exp(-0.013x)$	4	0.99 ns
P UE 11	15°	$Y = 100 - 394.9 * \exp(-0.028x)$	4	0.96 ns
x	20°	$Y = 100 - 183.7 * \exp(-0.028x)$	4	0.99 **
Stanley	25°	$Y = 100 - 127.7 * \exp(-0.020x)$	4	0.96 ns
	30°	$Y = 100 - 131.5 * \exp(-0.023x)$	4	0.99 *

** - $P < 0.01$ * - $P < 0.05$ ns - $P > 0.05$

ANEXO 17 - Crescimento do tubo polinico "in vivo" em função do tempo de incubação para várias temperaturas - 1989.

		Comprimento (% do estilete)		
Trat.	Temp.	Função (x=horas após a polinização)	n	r2
	10°	Y = 50.3 * exp(-92.8/x)	5	0.99 **
10 x 10	15°	Y = 78.48 * exp(-56.5/x)	5	0.89 ns
	20°	Y = x/ (0.347 + 0.017x)	5	0.96 *
	25°	Y = X/ (0.67 + 0.024x)	5	0.95 *
	10°	Y = 100/ 1 + 17.076 * exp(-0.018x)	5	0.92 **
11 x St.	15°	Y = 100 - 122.977 * exp(-0.015x)	5	0.99 **
	20°	Y = 100 - 75.793 * exp(-0.019x)	5	0.74 ns
	25°	Y = 100 - 73.847 * exp(-0.02x)	5	0.81 **
	10°	Y = -10.22 + 0.393 -0.0007x2	5	0.99 **
11 x 11	15°	Y = -10.67 + 0.89x - 0.0027 x2	5	0.97 *
	20°	Y = 12.629 + 0.473x - 0.0006x2	5	0.99 **
	25°	Y = x/ (0.675 + 0.024x)	5	0.91 ns
	10°	Y = 100/ 1 + 6.297 * exp(-0.017x)	5	0.83 ns
10 x St.	15°	Y = 100 - 119.462 * exp(-0.016x)	5	0.94 **
	20°	Y = 100 - 93.878 * exp(-0.024x)	5	0.92 *
	25°	Y = 100 - 105.425 * exp(-0.019x)	5	0.82 **
	10°	Y = 100/ 1 + 43.554 * exp(-0.021x)	5	0.97 *
6 x 6	15°	Y = 100 - 134.828 * exp(-0.015x)	5	0.98 *
	20°	Y = 100 - 124.586 * exp(-0.023x)	5	0.94 *
	25°	Y = 100 - 101.596 * exp(-0.028x)	5	0.96 *
	10°	Y = 100/ 1 + 15.469 * exp(-0.017x)	5	0.99 **
6 x St.	15°	Y = 100 - 136.456 * exp(-0.015x)	5	0.99 **
	20°	Y = 100 - 150.958 * exp(-0.021x)	5	0.95 *
	25°	Y = 100 - 124.586 * exp(-0.024x)	5	0.92 *
	10°	Y = 100/ 1 + 15.599 * exp(-0.018x)	5	0.97 *
média	15°	Y = 100 - 129.153 * exp(-0.015x)	5	0.99 **
das	20°	Y = 100 - 109.618 * exp(-0.021x)	5	0.98 **
compat.	25°	Y = 100 - 100.083 * exp(-0.022x)	5	0.95 **

**- P < 0.01 *- P < 0.05 ns- p > 0.05

ANEXO 18

Vingamento pós-floração:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	228.29	12.330 **
Anos	3	303.62	16.398 **
Locais	1	10.45	0.565 ns
Polinizadoras	4	226.26	12.220 ns
Interacções	19	10.54	0.569 ns
Anos x Locais	3	2.23	0.121 ns
Anos x Poliniz.	12	13.67	0.738 ns
Locais x Poliniz.	4	7.37	0.398 ns
Erro	132	18.52	
Total	159		

Vingamento final:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	324.62	37.831 **
Anos	3	74.04	8.629 **
Locais	1	1.09	0.127 ns
Polinizadoras	4	593.43	69.158 **
Interacções	19	27.18	3.168 **
Anos x Locais	3	2.84	0.331 ns
Anos x Poliniz.	12	27.82	3.242 **
Locais x Poliniz.	4	43.54	5.074 **
Erro	132	8.58	
Total	159		

ANEXO 19

Vingamento pós-floração:

	1986	1987	1988	1989
Borba	23.47 ab	18.61 c	18.75 c	23.11 ab
Elvas	24.56 a	19.34 bc	18.82 c	23.31 ab
Stanley	26.26 ab	20.44 bcde	21.13 abcde	26.23 ab
D'Ente	26.05 abc	20.92 abcde	20.98 abcde	28.64 a
P UE 13	23.74 abcd	19.42 bcde	17.64 de	19.75 bcde
P UE 6	23.51 abcde	18.14 cde	18.61 bcde	23.00 abcde
Livre	20.50 bcde	15.89 de	15.57 e	18.42 bcde

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	23.45 ab	24.28 a	19.06 bc	20.55 abc	17.59 c
Elvas	23.58 ab	24.01 ab	21.21 abc	21.08 abc	17.61 c

- Vingamento final:

	1986	1987	1988	1989
Borba	11.94 abc	10.60 abc	10.34 bc	13.10 ab
Elvas	11.32 abc	10.98 abc	9.70 c	13.30 a
Stanley	17.29abc	15.02abcd	13.16 cdef	18.69ab
D'Ente	12.50 cdef	12.63 cdef	11.91 cdef	19.79a
P UE 13	13.59 bcde	11.39 def	11.84 def	12.70 cdef
P UE 6	10.90 defg	9.32 efgh	7.79 fghi	9.20 efghi
Livre	3.88 i	5.59 ghi	5.41 hi	5.61 ghi

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	16.09 a	14.13 abc	12.52 bc	7.81 de	6.91 e
Elvas	15.99 a	14.28 ab	12.23 bc	10.80 cd	3.33 f

ANEXO 20

Queda de vingamento:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	4154.32	21.53 ***
Anos	3	600.55	3.11 *
Locais	1	431.32	2.24 ns
Polinizadoras	4	7750.40	40.17 ***
Interacções	19	410.38	2.13 **
Anos x Locais	3	37.23	0.19 ns
Anos x Poliniz.	12	260.48	1.35 ns
Locais x Poliniz.	4	1139.96	5.91 ***
Erro	132	192.95	
Total	159		

Queda de Junho:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	2606.17	11.39 ***
Anos	3	1795.14	7.67 ***
Locais	1	646.01	2.76 ns
Polinizadoras	4	3704.49	15.83 ***
Interacções	19	456.82	1.95 *
Anos x Locais	3	341.61	1.46 ns
Anos x Poliniz.	12	530.89	2.27 *
Locais x Poliniz.	4	320.98	1.37 ns
Erro	132	233.96	
Total	159		

ANEXO 21

Frutos em Junho:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	296.67	52.836 **
Anos	3	79.68	14.190 **
Locais	1	1.46	0.261 ns
Polinizadoras	4	533.22	94.964 **
Interacções	19	22.47	4.001 **
Anos x Locais	3	2.03	0.362 ns
Anos x Poliniz.	12	30.76	5.478 **
Locais x Poliniz.	4	12.92	2.301 ns
Erro	132	5.61	
Total	159		

Frutos à colheita:

Origem da variação	g. l.	Q. M.	F
Factores principais	8	269.67	47.648 **
Anos	3	68.91	12.176 **
Locais	1	1.43	0.252 ns
Polinizadoras	4	487.31	86.102 **
Interacções	19	21.10	3.728 **
Anos x Locais	3	4.37	0.772 ns
Anos x Poliniz.	12	27.76	4.904 **
Locais x Poliniz.	4	13.69	2.419 ns
Erro	132	5.66	
Total	159		

ANEXO 22

- Frutos pós-queda de Junho:

	1986	1987	1988	1989
Borba	9.90 ab	8.14 abcd	6.89 d	10.23 a
Elvas	9.28 abc	7.74 bcd	7.32 cd	10.05 ab
Stanley	14.20abc	11.80 bcd	9.66 def	15.93ab
D'Ente	10.24 cdef	9.45 def	9.71 def	16.96a
P UE 13	11.38 cde	8.50 defg	8.52 defg	9.38 def
P UE 6	8.98 defg	7.39 efgh	4.96 ghi	6.25 fghi
Livre	3.15 hi	2.54 i	2.66 i	2.16 i

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	12.54 a	11.92 ab	9.54 bc	6.28 de	3.65 ef
Elvas	13.25 a	11.26 ab	9.35 bc	7.51 cd	1.61 f

-Frutos à colheita:

	1986	1987	1988	1989
Borba	9.40 a	7.81 abc	6.59 c	9.19 ab
Elvas	8.67 abc	7.05 bc	6.78 c	9.73 a
Stanley	13.50abc	11.45 bcd	9.50cdef	14.04ab
D'Ente	9.46 cdef	8.71 defg	9.16cdef	16.34a
P UE 13	10.98 bcde	7.91 defg	7.84 defg	9.05 def
P UE 6	8.46 defg	6.90 efgh	4.50 ghi	5.91 fghi
Livre	2.78 hi	2.16 i	2.41 i	1.95 i

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	11.52 ab	11.34 ab	9.11 b	5.96 de	3.30 ef
Elvas	12.73 a	10.50 ab	8.77 bc	6.33 cd	1.35 f

ANEXO 23

Queda de vingamento:

	1986	1987	1988	1989
Borba	48.93 a	42.89 a	44.66 a	42.53 a
Elvas	54.77 a	44.30 a	48.27 a	44.81 a
Stanley	33.81 defg	25.54 g	37.54 defg	27.41 fg
D'Ente	50.24 bcdefg	39.60 cdefg	41.10 cdefg	31.10 efg
P UE 13	41.14 cdefg	41.14 cdefg	31.95 efg	32.70 defg
P UE 6	53.08 bcdef	47.70 bcdefg	58.11abcd	56.21abcde
Livre	80.99a	64.00abc	63.62abc	70.91ab

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	30.16 d	41.51 cd	33.41 cd	59.37 b	59.31 b
Elvas	31.99 d	39.51 cd	40.05 cd	48.18 bc	80.46a

Queda de Junho:

	1986	1987	1988	1989
Borba	15.47 c	24.71abc	35.80a	23.30abc
Elvas	20.02 bc	33.71ab	31.48ab	30.14abc
Stanley	17.63 de	21.28 de	26.36 bcde	14.41 de
D'Ente	17.44 de	24.89 cde	18.94 de	13.48 e
P UE 13	15.68 de	25.35 cde	26.36 bcde	27.16 bcde
P UE 6	17.38 de	18.25 de	42.30abcd	28.69abcde
Livre	20.59 de	56.28a	54.23ab	49.85abc

	Stanley	D'Ente	P UE 13	P UE 6	Livre
Borba	22.50 bc	16.32 c	23.13 bc	22.09 c	40.04ab
Elvas	17.34 c	21.05 c	24.14 bc	31.21 bc	50.43a

* Os valores seguidos das mesmas letras não diferem significativamente segundo o teste de TUKEY para $p < 0.05$

ANEXO 24

		Anos				Polinizadoras					
		1986	1987	1988	1989	Stan.	Ente	P.13	P.6	L-Borba	L-Elvas
Ving. pós-floração Queda de ving.	Coef.	-0.07	-0.16	0.05	-0.09	0.31	0.23	0.51	0.39	0.36	0.32
	Sign.	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	**	ns	ns
Ving. final Queda de Junho	Coef.	-0.04	-0.39	-0.58	0.31	-0.17	-0.08	0.02	-0.12	0.67	0.10
	Sign.	ns	**	**	**	ns	ns	ns	ns	**	ns
Ving. pós-floração Frutos à colheita	Coef.	0.58	0.65	0.40	0.50	0.68	0.54	0.53	0.31	0.00	0.01
	Sign.	**	**	**	**	**	**	**	**	**	ns
Queda de ving. Queda de Junho	Coef.	0.08	0.40	0.57	0.24	-0.00	0.02	-0.03	0.11	-0.63	-0.08
	Sign.	ns	**	**	**	ns	ns	ns	ns	**	ns
Ving. final Frutos à colheita	Coef.	0.96	0.91	0.91	0.90	0.75	0.89	0.81	0.85	0.42	0.76
	Sign.	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Frutos em Junho Frutos à colheita	Coef.	0.99	0.99	0.99	0.96	0.81	0.99	0.99	0.99	0.97	0.96
	Sign.	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
		n = 40				n = 32				n = 16	

n - tamanho da amostra ** - $p < 0.01$ * - $p < 0.05$ ns - não significativa