



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Mecanismo de acção do ácido 1-naftalenoacético (ANA) na monda de frutos de nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]

Catarina Alexandre Campos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Prof. Doutora Carmina Reig Valor

Co-orientador: Prof. Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira

Júri:

Presidente: Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel Agustí Fonfría, Professor Catedrático do Instituto Agroforestal Mediterráneo da Universidad Politécnica de Valencia, Espanha;

Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Carmina Reig Valor, Professora Auxiliar do Instituto Agroforestal Mediterráneo da Universidad Politécnica de Valencia, Espanha;

Doutora Maria Teresa Moreira Valdivieso, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2009

Agradecimentos

À Professora Doutora Carmina Reig Valor (Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia), minha orientadora, por todo o apoio, confiança, empenho, exigência e disponibilidade para solucionar os problemas com os quais nos fomos deparando.

À Professora Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira (Instituto Superior de Agronomia, UTL), minha co-orientadora, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do curso, pela força que me deu para que participasse no programa de intercâmbio Erasmus, e por todo o apoio que me deu durante estes anos. Agradeço também o seu rigor na co-orientação e revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Agustí Fonfría (Instituto Agroforestal Mediterraneo, Universidad Politécnica de Valencia), pela oportunidade que me deu, por todo o conhecimento transmitido, pela motivação e pela exigência sem as quais este trabalho não seria realizável. Pela sua paixão e contributo para a Agronomia Mundial.

A toda a equipa de trabalho do Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universidad Politécnica de Valencia), em especial a Amparo Martínez-Fuentes, Carlos C. Mesejo, Natalia Muñoz Fambuena e Bartolomé Dominguez, e à equipa de Entomologia pela disponibilidade, conselhos, incentivo e por ajudarem na minha integração num país diferente. Assim como à equipa de técnicos da Parcela Experimental da Cooperativa de Callosa d'En Sarriá.

À minha colega Diana Fernandes, que fez parte desta experiência inesquecível, e que me auxiliou sempre que possível nos ensaios de campo.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, que mesmo longe nunca deixaram de me apoiar, como têm feito durante toda a vida, mesmo que por vezes a muito custo.

A todos os meus amigos, do meu país e aos que conheci em Valencia, que estiveram sempre ao meu lado, espero poder retribuir todo o afecto que sempre me deram.

Resumo

Neste trabalho, estudou-se o mecanismo de acção do ácido 1-naftalenoacético (ANA) (20 mg/l) sobre a monda de frutos de nespereira, para tal analisou-se a acção do ANA sobre o gametófito masculino e feminino, procedendo-se à cultura de grãos de pólen e de óvulos *in vitro*. Paralelamente, foram feitos tratamentos com ANA *in vivo*, a panículas de diferentes estados fenológicos. As flores destas panículas foram observadas através de microscopia de fluorescência para avaliar o efeito do ANA no desenvolvimento dos óvulos e na germinação de grãos de pólen.

Os resultados mostram que o ANA, em condições *in vitro*, impede a germinação dos grãos de pólen, o crescimento do tubo polínico e o desenvolvimento de óvulos provenientes de flores de panículas no estado 609-700 da escala BBCH.

In vivo, o ANA impede a germinação de grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico durante 7 dias após o tratamento e nas flores próximas do estado 609 BBCH interrompe o desenvolvimento dos seus óvulos, levando ao aparecimento de calose na calaza do óvulo. Os óvulos em estados anteriores e posteriores a 605-700 BBCH são insensíveis ao tratamento com ANA, consequentemente, se este tratamento for efectuado antecipada ou tardiamente torna-se ineficaz.

Palavras-Chave: ANA, nespereira, germinação, grão de pólen, tubo polínico, óvulo.

Abstract

Title: The Mode of action of naphthaleneacetic acid (NAA) on fruit thinning of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.].

The mode of action of naphthaleneacetic acid (NAA) (20 mg/l) in fruit thinning of loquat was studied through the action of NAA on both female and male gametophyte of ovules and pollen grains cultured *in vitro*. Additionally, *in vivo* treatments with NAA to the panicles of different growth stages were carried out. The flowers of these panicles were observed with fluorescence microscopy in order to evaluate the effect of NAA in the ovule's development and in the pollen grain germination.

In vitro results showed that NAA prevents pollen germination, pollen tube growth and ovule's development from flowers of panicles in the stage 609-700 BBCH.

In vivo, NAA also prevents pollen germination and pollen tube growth for 7 days after the treatment. In flowers near the stage 609 BBCH, NAA interrupts the ovule's development, resulting in the emergence of callose in the chalazal part of the ovule. Ovules in previous or later stages than 605-700 BBCH are insensitive to NAA, therefore, if this treatment is carried out earlier or later becomes ineffective.

Keywords: NAA, loquat, germination, pollen grain, pollen tube growth, ovule.

Abstract

Title: The Mode of action of naphthaleneacetic acid (NAA) on fruit thinning of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.].

In loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.], the application of 20 mg/l of naphthaleneacetic acid (NAA) to a panicle with 2 or 3 fruit set (stage 609-700 BBCH) effectively thins fruits, preventing fertilization of the rest of the panicle's flowers, and consequently reduces the final number of fruits per panicle and thus, the cost of manual thinning of this specie (Agustí *et al.*, 2000).

The mechanism of action whereby NAA interferes in the loquat fruit set is unknown and was studied in this work. For this purpose, the effect of NAA both *in vivo* and *in vitro* on the male and female gametophyte of the flowers and on the fruits of different phenological stages, from 505 to 609 BBCH state and from state 701 to the 704 BBCH, respectively, was studied.

The results *in vitro* showed that NAA prevents both the pollen grain germination and pollen tube growth, and can also lead to their rupture once they have initiated their growth. Regarding ovules, NAA stops the growth of ovules of flowers in stages close to fruit set (609-700 BBCH). However, ovules in early stages (505-508 BBCH) or advanced stages of development (701-704 BBCH) are insensitive to the treatment.

In vivo, NAA also prevents pollen grain germination and pollen tube growth for about 7 days. After this time and according to the long period of stigmatic receptivity, the germination of new pollen grains and pollen tube growth is evident. This demonstrates the limited effectiveness of treatment due to its direct action on the pollen grains and pollen tubes and not on the stigma and style of the flower. When NAA is applied directly to the flowers near the fruit set or already fruit set (609 BBCH), significantly reduces the ovule's weight as a result of the interruption of its growth and / or causing the abortion of the embryo respectively, resulting in the appearance of callose in the chalazal part of the ovule.

The direct effect that NAA exercised individually on each of the ovules depends on their stage of maturity at the treatment date. In the earliest or advanced stages of development than 609 BBCH stage, treatment is ineffective and therefore, the percentage of fruit set is not affected. However, if NAA is applied during the anthesis (605 BBCH), the pollen germination, pollen tube growth and ovule's development can be affected, taking the risk of having no fruit set. If the treatment is applied in developing fruits, it will minimize the number of seeds per fruit without changing the number of fruits per panicle.

The action of NAA on the female gametophyte is determined by the ovules's maturity, which in turn depends on the state of development of the flower or fruit. This makes that the treatment

effectiveness stays restricted only to receptive ovules that haven't been fertilized or have been fertilized recently. Under this view, the optimum time of application should coincide with the development state of the flower with greater number of sensitive ovules and this corresponds with the stage 609 BBCH. This justifies the optimal treatment date previously established.

Keywords: NAA, loquat, germination, pollen grain, pollen tube growth, ovule.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Importância económica da cultura da nespereira	3
2.2 Características gerais da espécie <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	6
2.3 Floração da nespereira	9
2.4 Polinização da nespereira	11
2.5 Vingamento dos frutos de nespereira	12
2.6 Desenvolvimento do fruto da nespereira	13
2.7 Utilização do ácido 1-naftalenoacético para a monda de frutos de nespereira	14
2.8 Antecedentes sobre o modo de acção do ácido 1-naftalenoacético	18
3. Material e Métodos	20
3.1 Material Vegetal	20
3.2 Tratamentos Realizados	21
3.2.1 Aplicação de ácido 1-naftalenoacético <i>in vitro</i>	21
3.2.2 Aplicação de ácido 1-naftalenoacético <i>in vivo</i>	21
3.3 Características morfológicas de grãos de pólen	22
3.4 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito masculino	23
3.4.1 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre a germinação de grãos de pólen	23
3.4.2 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o crescimento do tubo polínico	24
3.5 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito feminino	25
3.5.1 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o desenvolvimento de óvulos <i>in vitro</i>	25
3.5.2 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o desenvolvimento de óvulos <i>in vivo</i>	27
3.5.3 Determinação da sensibilidade de óvulos de diferentes estados fenológicos à acção do ácido 1-naftalenoacético	30
3.6 Análise estatística de resultados	30
4. Resultados	31
4.1 Características morfológicas de grãos de pólen	31
4.2 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito masculino	33
4.2.1 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre a germinação de grãos de pólen	33
4.2.2. Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o crescimento do tubo polínico	36
4.3 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito feminino	38
5. Discussão	51
6. Conclusão	58
7. Referências Bibliográficas	59
Anexos	71

Lista de Figuras

- Figura 2.1** Produção de nespereiras em Callosa d'En Sarrià, Alicante (Agustí *et al.*, 2006). 4
- Figura 2.2** Cultura Protegida sob coberturas de plástico em Callosa d'En Sarrià, Alicante (Agustí *et al.*, 2006). 8
- Figura 2.3** A: Vista superior da flor de nespereira; B: Corte longitudinal de flor de nespereira (Agustí *et al.*, 2006). 9
- Figura 2.4** Grãos de pólen de nespereira. Microfotografia electrónica (3500x; barra=10 µm). 11
- Figura 2.5** Panícula no estado 703 da escala BBCH que foi sujeita a monda química no estado 609-700 BBCH, com sal potássico do ANA (Agustí *et al.*, 2006). 17
- Figura 3.1** Pomar A: Parcela de Fruticultura da Universidad Politécnica de Valencia; Pomar B: Parcela Experimental da Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià, Alicante. 20
- Figura 3.2** Flores no estado fenológico 605 BBCH das cultivares 'Algerie'(A), 'Piera'(B), 'Golden Nugget'(C), 'Moggi'(D) e 'Magdal'(E). 22
- Figura 3.3** Microfotografia óptica de varrimento (3500x; barra=10 µm) com localização dos parâmetros medidos na exina do grão de pólen. E.P: Eixo Polar; E.E.: Eixo Equatorial; L.M: Largura de Mesocolpo. 22
- Figura 3.4** Panícula no estado fenológico 609-700 da escala BBCH, com flores FF e flores F. 25
- Figura 3.5** Preparação de flores para observação no Microscópio de Fluorescência: A: Flores tratadas no estado 605 BBCH, conservadas em FPA; B: Gineceu da flor de nespereira; C: Óvulos de nespereira; D: Squash de óvulos; E: Preparação por flor com Squash de óvulos e de pistilos. 28
- Figura 4.1** Vista equatorial de grãos de pólen de diferentes cultivares de nespereira, mostrando a textura da exina. Microfotografia electrónica (3500x; barra=10 µm). A – 'Algerie'; B – 'Piera'; C – 'Golden Nugget'; D – 'Magdal'; E – 'Moggi'. 32

Figura 4.2 Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) ao meio de cultura sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares ‘Algerie’ e ‘Piera’ de nespereira. Cada valor é a média de 8 repetições. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), para as cultivares ‘Piera’ e ‘Algerie’, respectivamente, segundo o teste de Student-Newman-Keuls. O efeito da cultivar não foi estatisticamente significativo.

33

Figura 4.3 Germinação *in vitro* de grãos de pólen de nespereira das cultivares ‘Algerie’ em meio de cultura controlo (A) e em meio de cultura ANA (B) e da cultivar ‘Piera’ em meio de cultura controlo (C) e em meio de cultura ANA (D). Fotografias tiradas 24 horas após a cultura (40x).

34

Figura 4.4 Influência da aplicação de 20 mg/l de ANA ao meio de cultura sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen da cultivar ‘Algerie’. Cada valor é a média de 8 repetições. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

35

Figura 4.5 Germinação *in vitro* de grãos de pólen de nespereira da cultivar ‘Algerie’ em meio de cultura controlo (A) (40x) e em meio de cultura com 20 mg/l de ANA (B) (20x). Fotografias tiradas 24 horas após a cultura.

35

Figura 4.6 Efeito da aplicação do ANA (20mg/l) sobre o crescimento dos tubos polínicos da cultivar ‘Algerie’ em condições de cultura *in vitro*. A seta indica o momento do tratamento. Cada valor é a média de 4 placas de Petri. Em cada uma, mediram-se 50 tubos polínicos. As barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes para o mesmo tempo indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

36

Figura 4.7 Germinação de grãos de pólen e crescimento de tubos polínicos *in vitro* da cultivar ‘Algerie’, 48 h após a cultura em meio de cultura controlo (A) e em meio de cultura controlo ao qual se aplicou 20 mg/l de ANA às 24 h de cultura (B) (barra=0,2 mm).

37

Figura 4.8 Pormenor da rotura de um tubo polínico da cultivar ‘Algerie’ por acção da aplicação do ANA (20 mg/l) após 24h de cultura. Fotografia tirada às 48 horas após o tratamento (80x; barra=0,2 mm).

37

Figura 4.9 Peso final (μg) de óvulos FF cultivados em MS, sem tratamento, tratados no meio de cultura (MS+ANA) e tratados no campo e cultivados em MS, após 9 dias de cultura. O peso médio inicial dos óvulos FF era $66,7 \mu\text{g} \pm 2,55$. Cada valor é a média do peso de 16 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão. 38

Figura 4.10 Peso final (mg) de óvulos F cultivados em MS, sem tratamento, tratados no meio de cultura (MS+ANA) e óvulos F tratados no campo e cultivados em MS, após 9 dias de cultura. O peso médio inicial dos óvulos F era $2,83 \text{ mg} \pm 0,67$. Cada valor é a média do peso de 16 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão. 39

Figura 4.11 Evolução do peso fresco (mg) por flor F segundo os dias após o tratamento com ANA (20 mg/l). O tratamento realizou-se a 10 panículas nos estados 609-700 da escala BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do peso de 10 flores. 41

Figura 4.12 Fotografias de óvulo F com calose (\blacktriangledown) proveniente de uma flor de uma panícula tratada com ANA no estado 609-700 BBCH (A) e óvulo F sem calose de flor proveniente de uma panícula controlo no mesmo estado fenológico (B). 42

Figura 4.13 Evolução da germinação de grãos de pólen nos estigmas de flores de panículas tratadas com 20mg/l de ANA no estado fenológico 605 BBCH ao longo dos dias após tratamento. Foram deixadas panículas no mesmo estado de desenvolvimento sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do nº de estimas com germinação de 8 flores. As barras verticais representam o erro padrão. * Indica diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls. 43

Figura 4.14 Comportamento de grãos de pólen e tubos polínicos no estigma e estilete de flores de nespereira em ântese. Estigma sem grãos de pólen germinados de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (A) e estigma com grãos de pólen germinados de uma flor no mesmo estado fenológico de uma panícula controlo (B), dois dias após o tratamento. Germinação no estigma de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (C) e controlo (D), quatro dias após o tratamento. Grão de pólen germinado no estigma de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (E) e tubos polínicos em desenvolvimento no estilete de uma flor de uma panícula controlo no mesmo estado fenológico (F) sete dias após o tratamento. 44

Figura 4.15 Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) sobre o número de óvulos degenerados (com calose) por flor em ântese, em flores de panículas tratadas no estado 605 BBCH, sendo que foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do nº de óvulos degenerados de 36 flores. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls. 45

Figura 4.16 Fotografias de óvulos com calose (▼) de flores tratadas com ANA (20 mg/l) no estado 605 da escala BBCH (A e B) e óvulos fertilizados sem calose de flores controlo no mesmo estado fenológico, onde se pode ver o tubo polínico (▲) a entrar no micrópilo (C e D). 46

Figura 4.17 Peso de óvulos (mg) de frutos nos estados fenológicos 701, 703 e 704 da escala BBCH, após 20 dias de cultura. Os óvulos sem tratamento e tratamento no campo foram cultivados em MS e os óvulos tratados no meio de cultura foram cultivados em MS+ANA. O peso médio inicial dos óvulos foi de 3,3 mg, 60,5 mg e 81,8 mg para os estados fenológicos 701, 703 e 704 BBCH, respectivamente. Cada valor é o peso médio de 10 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão. 47

Figura 4.18 Efeito do tratamento com ANA (20mg/l) em diferentes estados fenológicos sobre a percentagem de flores vingadas. Cada valor é a média de 10 panículas. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) para os pomares A e B, respectivamente, segundo o teste de Student-Newman-Keuls. A avaliação realizou-se no estado fenológico 701 da escala BBCH, estado fenológico indicado para a monda manual. 50

Lista de Quadros

- Quadro 2.1** Principais zonas de produção de nespereira em Espanha (Caballero e Fernández, 2003). 3
- Quadro 2.2** Resumo das características principais dos estudos realizados sobre a utilização de ANA para a monda de frutos de Nespereira. A formulação de ANA como ácido livre, sal amida ou sal potássico expressa-se como ANA, ANAm e ANAs, respectivamente. 16
- Quadro 4.1:** Médias e desvios padrão (μm) das características morfométricas do grão de pólen de diferentes cultivares de nespereira. 31
- Quadro 4.2** Evolução do peso fresco (mg) por flor FF segundo os dias após o tratamento com ANA (20 mg/l). O tratamento realizou-se a 10 panículas no estado 609-700 da escala BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do peso de 10 flores. Não existem diferenças significativas entre os dias após o tratamento. 40
- Quadro 4.3 –** Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) sobre o número de óvulos degenerados (com calose) de flores FF e F, de panículas tratadas no estado 609-700 BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento para controlo. Cada valor é a média do número de óvulos degenerados de 32 flores. Letras diferentes na mesma linha ou na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls. 42
- Quadro 4.4** Peso de óvulos de flores tratadas *in vivo* nos estados fenológicos 505 e 508 da escala BBCH e de frutos tratados nos estados 701 e 703 da escala BBCH, cultivados durante 7 dias em MS (*in vivo*) e em MS+ANA (*in vivo+in vitro*). O tratamento no campo com 20 mg/l de ANA realizou-se 20 dias antes da preparação das culturas *in vitro*. Cada valor é a média de 5 óvulos. Letras diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls. 48

Lista de Abreviaturas

ANA	ácido 1-naftalenoacético (ácido livre);
BBCH	escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry;
TSS	teor de sólidos solúveis;
ANAs	sal potássico do ácido 1-naftalenoacético;
ANAm	sal amida do ácido 1-naftalenoacético;
SEM	microscópio electrónico de varrimento;
FF	flores que apesar de terem caído as pétalas e terem os estames secos têm as sépalas abertas e não apresentam sinais de fecundação;
F	flores num estado fenológico mais avançado com sépalas fechadas, tratando-se de uma flor vingada;
MS	meio de cultura Murashige and Skoog Basal Salt Mixture suplementado com sacarose (150 mM) e extracto de malte (500 mg/l);
MS+ANA	meio de cultura Murashige and Skoog Basal Salt Mixture suplementado com sacarose (150 mM) e extracto de malte (500 mg/l) ao qual foi adicionado 20 mg/l de ANA;
DNOC	4,6-dinitroresol.

1. Introdução

A nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] é uma espécie subtropical originária do sudeste da China, da família das Rosaceae, anteriormente considerada da subfamília Pomoidea (Lin *et al.*, 1999). De acordo com a classificação mais recente, baseada em análises filogenéticas, a nespereira pertence à subtribo das Pyrinae da família das Rosaceae, onde estão também incluídos os géneros *Malus* e *Pyrus* (Potter *et al.*, 2007). Esta espécie é cultivada na China, Japão, Paquistão, em toda a Bacia do Mediterrâneo, em países como Espanha, Itália, Argélia, Turquia e também Brasil e Chile.

A nespereira floresce profusamente em panículas comprimidas, apresentando taxas de vingamento, normalmente, inferiores a 10% (Goubran e Zeftawi, 1986). Apesar desta característica, os frutos produzidos têm frequentemente calibres inferiores aos exigidos pelos consumidores, por isso os produtores começaram a recorrer à monda manual para aumentar o tamanho do fruto, pois assim como acontece noutras espécies, existe uma relação inversa entre o número de frutos por panícula e o tamanho individual de cada fruto (Agustí *et al.*, 2000).

No entanto, os custos de mão-de-obra de produção desta cultura representam aproximadamente 60% dos custos totais, o que posiciona esta cultura como a cultura hortícola mais cara de Espanha (Caballero *et al.* 1992). A operação cultural de monda manual representa 25-30% dos custos de produção, uma vez que requer mão-de-obra especializada. Para garantir a viabilidade económica da cultura, a monda química foi realizada eficazmente com a aplicação de 20 mg/l de ácido 1-naftalenoacético (ANA) quando na panícula estão visíveis dois a três frutos recém-vingados. (Agustí *et al.*, 2000).

Actualmente esta técnica é regularmente utilizada pelos agricultores e contribui para a melhoria da qualidade dos frutos (Agustí *et al.* 2000; Cuevas *et al.*, 2004), aumentando o seu tamanho e acelerando a sua maturação (Agustí *et al.*, 2000; Amorós *et al.*, 2004).

Uma vez estudada a concentração e a época de tratamento (Agustí *et al.*, 2000), urge a necessidade de estudar qual o mecanismo de acção desta hormona sintética, para fundamentar fisiologicamente esta técnica.

Neste sentido, o objectivo do presente estudo é determinar o mecanismo de acção que o ácido naftalenoacético exerce na fisiologia reprodutiva desta espécie, levando à monda de frutos. Para isso, estudar-se-á a acção desta substância sobre:

1. A germinação do grão de pólen;
2. O crescimento do tubo polínico;
3. O desenvolvimento dos óvulos.

A presente dissertação foi desenvolvida segundo o Programa de Intercâmbio Erasmus na Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia, Espanha, num estudo desenvolvido no Instituto Agroforestal Mediterráneo em colaboração com a Cooperativa de Callosa d'En Sarrià, Alicante. Decorreu desde Setembro de 2008 até Julho de 2009.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Importância económica da cultura da nespereira

A nespereira é produzida comercialmente em muitos países, sendo os principais produtores China, Espanha, Paquistão, Japão e Turquia (Janick e Paul, 2008). A China é o maior produtor mundial com uma área cultivada de 120 000 ha e uma produção anual de 460 000 t (Lin *et al.*, 2007), sendo Sichuan a província mais importante (Lin, 2007). Da totalidade da produção, apenas 1% se destina à exportação para o sudoeste asiático, sendo o resto da produção para consumo interno.

O aumento da produção na China nos últimos anos, foi possível graças ao melhoramento genético, que deu origem às cultivares ‘Zaozhong No.6’ e ‘Dawuxing’, à utilização de enxertia em porta-enxerto franco e de covas de plantação de 1m³, à monda de flores e de frutos e ao “embolsamento” da panícula durante a maturação do fruto. Estas práticas permitiram obter frutos de maior calibre e qualidade, obtendo-se assim maior rendimento (Janick e Paul, 2008).

Espanha é o segundo produtor mundial, com uma produção anual de aproximadamente 42 000 t e uma área cultivada de 2900 ha, estando a produção concentrada em três regiões (Quadro 2.1), devido a razões económicas e às condições edafo-climáticas. Entre as três regiões destaca-se a Comunidade Valenciana pela sua maior importância (Caballero e Fernández, 2003).

Quadro 2.1 Principais zonas de produção de nespereira em Espanha (Caballero e Fernández, 2003).

Comunidade	Província	Área (ha)	Produção (t)
Andaluzia	Granada	725	10 875
	Málaga	416	6 160
Murcia	Murcia	40	400
Valencia	Alicante	1 483	22 016
	Castellón-Valencia	250	2 036
Total Espanha		2 914	41 487

A província de Alicante, mais concretamente a zona de Callosa d’En Sarrià (Figura 2.1), é a principal produtora, pois produz 60% da produção de Espanha, com 98% da produção da cultivar ‘Algerie’ e suas mutações, sendo as restantes cultivares usadas como polinizadoras (‘Golden Nugget’, ‘Peluches’ e ‘Cardona’) (Soler *et al.*, 2007).

Em segundo lugar, situa-se a região da Andaluzia com 39% da produção do país, concentrada principalmente nas cultivares 'Magdal' e 'Golden Nugget' (Soler *et al.*, 2007).



Figura 2.1 Produção de nespereiras em Callosa d'En Sarrià, Alicante (Agustí *et al.*, 2006).

Espanha é o maior exportador mundial, exportando entre 35% e 50% da sua produção, principalmente para países como Itália, Portugal e França. O consumo destes frutos é mais comum nos países mediterrânicos (Caballero e Fernández, 2003).

Embora ainda exista comercialização através dos produtores individuais, é cada vez mais importante a criação de associações para comercializar a produção, por isso os produtores surgem organizados em cooperativas que classificam e embalam a produção individual de cada um, sendo esta paga de acordo com critérios de qualidade. Nos últimos 20 anos em Espanha, a nespereira foi a cultura com menores perdas sobre o rendimento real, tendo uma margem de lucro bastante aceitável (Caballero e Fernández, 2003).

Apesar de Portugal ser um importante consumidor de nêspersas, a produção de nespereira encontra-se dispersa um pouco por todo o país, tendo uma área cultivada de 232 ha (INE) e uma produção de 686 t (INE) (G.P.P., 2006).

As cultivares mais utilizadas comercialmente são 'Argelina', 'Tanaka', e 'Golden Nugget', e as cultivares nacionais com importância são 'De Silves', 'De Lágrimas', 'Portuguesa' e 'Palhinha' (Caballero e Fernández, 2003).

O Algarve é a área de produção mais representativa, com 55% da produção nacional, seguida do Ribatejo e Oeste. Dado o baixo volume de produção, não existe um circuito de comercialização específico para a nêspersa, sendo o mercado nacional abastecido em mais de 90% por Espanha (G.P.P., 2006).

A maioria da produção provém de pomares mistos e de bordadura, onde não são feitos os tratamentos adequados, o que leva a que a qualidade dos frutos seja muito heterogénea. Constituindo excepção a produção obtida em estufa no Algarve, de boa qualidade e bem valorizada (G.P.P., 2006).

A área de produção tem diminuído devido à dificuldade de encontrar mão-de-obra para a monda e colheita dos frutos. A tendência mais provável para o futuro é a diminuição da superfície cultivada acompanhada de um aumento de produção, como consequência por um lado do desaparecimento de árvores dispersas e das plantações em más condições, e por outro lado das novas plantações intensivas no Algarve, embora persista a dificuldade de encontrar mão-de-obra qualificada para a monda e colheita de frutos (Caballero e Fernández, 2003).

2.2 Características gerais da espécie *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

A nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl] é uma espécie que floresce no Outono, vinga e desenvolve os seus frutos durante o Inverno e estes amadurecem na Primavera, o que a diferencia de outros pomos. Para além disso, durante o Inverno inicia o abrolhamento que não adquire importância até aos momentos após a colheita, quando apresenta um crescimento rápido, até que este se detém devido à dormência estival. Depois do Verão, o crescimento vegetativo é retomado, e ao mesmo tempo inicia-se um novo abrolhamento, maioritariamente de ramos antecipados (Reig e Agustí, 2006a).

A nespereira é uma árvore vigorosa, produtiva, de rápida entrada em produção (2-3 anos) e com tendência à verticalidade, podendo alcançar os 10 m de altura. As suas folhas são perenes, grandes e duras com margens serradas. As suas flores são pequenas e hermafroditas, distribuem-se em panículas terminais, têm pétalas brancas e cálice castanho pubescente. Os seus frutos de pomo são ovais de cor amarelo-alaranjado, com 2 a 4 sementes castanhas (Lin *et al.*, 1999).

A nespereira é uma espécie de clima subtropical ou temperado com Invernos suaves, uma vez que esta é a estação do ano em que inicia o seu ciclo reprodutivo (Gariglio *et al.*, 2002). Embora a planta tolere temperaturas até -10°C, os seus frutos são danificados a temperaturas de -3°C, podendo as temperaturas excessivamente altas ser também prejudiciais (Lin *et al.*, 1999). Os óvulos de frutos nos primeiros estados de desenvolvimento morrem quando expostos, mesmo que brevemente, a temperaturas de -4°C (Yang, 1963). Apesar de ser uma espécie subtropical, a cultura localiza-se hoje em dia entre os paralelos 25° e 38° Norte e Sul (Calabrese, 2006), e teve uma boa adaptação ao clima Mediterrâneo, expandindo-se rapidamente pelas zonas de produção de Citrinos (Llácer *et al.*, 1995), dando origem a frutos de boa qualidade quando cultivados junto ao mar, desde que a temperatura média seja superior a 15°C (Martínez-Calvo *et al.*, 2000a). No hemisfério Norte aconselha-se como altitude máxima de plantação os 400 m e uma orientação da plantação para sul ou sudeste (Rodríguez, 1983).

Esta espécie adapta-se bem a solos profundos de textura preferencialmente franco-arenosa ou franco-argilosa, com boa drenagem, conteúdo razoável de matéria orgânica e pH entre 5 e 8, sendo o pH óptimo de 6 (Lin, 2007). Embora seja uma espécie resistente à seca, quando a pluviosidade anual é inferior a 1200-2000 mm é necessário suplementar as necessidades hídricas com rega para obter boas colheitas (Gariglio *et al.*, 2002). Para reduzir as queimaduras solares durante a maturação dos frutos recorre-se à rega por aspersão (Lin *et al.*, 1999).

Esta espécie propaga-se actualmente por enxertia, sendo usado como porta-enxerto a nespereira de semente (franco), ou mais recentemente o marmeleiro. O primeiro tem a vantagem de ter grande afinidade com todas as cultivares, adapta-se a vários tipos de solo, dando origem a árvores muito vigorosas, com grande longevidade. No entanto, apresenta também alguns inconvenientes, como a variabilidade genética, o excesso de vigor que dificulta e encarece as operações culturais, é exigente em rega, sensível à asfixia radicular e salinidade (Rodríguez, 1983).

Devido principalmente às questões económicas relacionadas com o excesso de vigor e à falta de uniformidade das árvores enxertadas em pé franco, começou-se a utilizar como porta-enxerto o marmeleiro, dando origem a árvores com menor dimensão, que entram em produção mais rapidamente, produzem frutos de maior calibre, são mais resistentes à asfixia radicular e mais tolerantes à salinidade comparando com o porta-enxerto franco, mas devido à sua fraca afinidade, a vida produtiva da árvore reduz-se a 20 anos (Rodríguez, 1983; Fatta del Bosco e Fenech, 1984; Razeto, 1988; Carrera, 1990; Zuang, 1992; Calabrese, 1993).

As densidades de plantação mais comuns são entre 500 e 600 árvores/ha, embora nas cultivares mais vigorosas se use uma densidade de 450 árvores/ha, com um compasso de plantação de 5 m na entrelinha e 4 m entre árvores. Actualmente, utiliza-se o sistema de condução em vaso, embora se comece a plantar pomares com maior densidade, com sistema de condução em eixo central (Lin *et al.*, 2007). A poda é feita normalmente após a colheita, durante o Verão, quando os gomos florais estão visíveis (Lin, 2007).

A cultura protegida é uma prática cada vez mais utilizada pois facilita a gestão do pomar, diminui as perdas de produção devido a agentes ambientais, possibilita a realização de operações culturais, independentemente das condições ambientais, aumenta a percentagem de frutos comercializáveis, aumenta consistentemente a produção, e aumenta principalmente a precocidade e a rentabilidade (Fideghelli, 1990; Furukawa *et al.*, 1990). Como exemplos desta prática, temos a cultura sob coberturas de plástico em Callosa d'En Sarrià (Figura 2.2) que surgiu com o principal objectivo de proteger a cultura do vento (Lorente-Solanas *et al.*, 2002). No Japão, existe a produção de nespereira em estufa, para proteger as árvores dos danos causados pelo frio e vento, conseguindo-se assim, antecipar a colheita. Este efeito deve-se ao aumento da temperatura que promove o crescimento do fruto (Lin *et al.*, 1999).



Figura 2.2 Cultura Protegida sob coberturas de plástico em Callosa d'En Sarrià, Alicante (Agustí *et al.*, 2006).

A definição dos estados fenológicos da espécie encontra-se estabelecida de acordo com a escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) (Martínez-Calvo *et al.*, 1999), sendo esta escala apresentada em Anexo neste trabalho.

A doença mais importante desta cultura é o Pedrado, causada pelo fungo *Fusicladium eriobotryae*, atacando toda a árvore, embora cause maiores estragos nos frutos em desenvolvimento, depreciando-os comercialmente, diminuindo a produção significativamente. Outros inimigos importantes são os fungos do solo, como *Armillaria*, *Rosellinia*, *Phytophthora* e *Polyporus*. As pragas não têm muita importância, destacando-se os tripses e ácaros (Gisbert *et al.*, 2006).

O principal problema da nespereira é a mancha púrpura, uma desordem fisiológica, que apresenta como sintoma inicial uma mancha parda com superfície e contorno irregular que afecta unicamente a epiderme do fruto. À medida que o fruto amadurece, a mancha torna-se maior, podendo juntar-se a outras manchas, formando uma mancha grande de cor roxo-pardo, tornando inviável a comercialização do fruto. Este acidente fisiológico aparece durante a mudança de cor do fruto, estando relacionado com alterações nutricionais, principalmente com deficiências em Ca e excessos de N, mas também com alterações climáticas, como mudanças bruscas de humidade ou temperatura, com a posição do fruto na árvore, pois o fruto e o lado do fruto expostos ao sol são mais susceptíveis, e também o ataque de insectos pode aumentar a incidência desta desordem. No entanto, o factor com maior influência no grau de incidência deste acidente fisiológico é a temperatura mínima nocturna alcançada durante o período de mudança de cor (Gariglio *et al.*, 2002).

Os actuais objectivos do melhoramento de cultivares são obter cultivares mais temporãs, com maior qualidade, resistentes a doenças, à mancha púrpura e ao processo pós-colheita (Caballero e Fernández, 2003).

2.3 Floração da nespereira

A nespereira floresce em panículas de forma piramidal compostas por 5 a 10 ráculos primários de consistência não lenhosa, que por sua vez são formados por um número variável de flores e ráculos secundários, que agrupam 70 a 100 flores no total (Reig e Agustí, 2006a), chegando por vezes a ter mais de 100 flores (Lin *et al.*, 1999).

As flores de nespereira são hermafroditas, pubescentes, de pequenas dimensões (12-20mm), com um aroma muito intenso devido à presença de nectários no seu interior, que produzem excreções açucaradas, atraindo os insectos. O cálice persistente é formado por cinco sépalas soldadas de cor castanha e a corola é formada por 5 pétalas brancas livres. Possui entre 20 a 40 estames livres e 5 estigmas e estiletos que se unem basalmente a um ovário ínfero com 5 carpelos, cada um com dois óvulos (Figura 2.3) (Reig e Agustí, 2006a).



Figura 2.3 A: Vista superior da flor de nespereira; B: Corte longitudinal de flor de nespereira (Agustí *et al.*, 2006).

Nas condições ambientais do Mediterrâneo, as panículas desenvolvem-se entre o final do Verão e princípio de Outono (Reig e Agustí, 2006a).

Nas zonas temperadas, o período entre a diferenciação floral e a ântese floral é de três meses. A indução floral desta espécie tem lugar no final da primavera e a diferenciação floral inicia-se em meados do Verão, quando se desenvolve o eixo central das panículas, e quinze dias depois os seus eixos secundários (Fatta del Bosco, 1961). No final do Verão diferenciam-se as sépalas e pétalas, e no início do Outono os estames e pistilos (Reig e Agustí, 2006a). A meio do Outono, diferenciam-se os núcleos espermáticos (Li, 1982), ficando assim completamente formada a panícula. Os ramos antecipados diferenciam as suas inflorescências mais tarde, mas a ântese das suas flores ocorre simultaneamente com as inflorescências primárias e por isso dão origem a frutos de menor qualidade (Reig e Agustí, 2006a).

O período de floração da nespereira em climas temperados tem uma duração aproximada de 1,5 a 2,5 meses, excepcionalmente 3 meses (Reig e Agustí, 2006a), variando a época de floração consoante as condições climáticas e cultivar (Lin *et al.*, 1999). Sendo assim, nas condições climáticas mediterrâneas, a floração ocorre normalmente de Novembro a Janeiro, dependendo da temperatura média e da cultivar (Gariglio *et al.*, 2002).

A nespereira apresenta uma floração centrípeta, típica das Rosáceas, com desenvolvimento inicial das flores basais dos rácimos, progredindo até ao ápice da inflorescência (Reig e Agustí, 2006a).

O tempo necessário para a ântese de toda a panícula varia entre 2 e 4 semanas e a receptividade da flor entre 5 e 7 dias, segundo as condições climáticas (Rodríguez, 1983).

2.4 Polinização da nespereira

A polinização da nespereira é entomófila, sendo realizada principalmente por insectos do género *Apis* como *Apis dorsata* Fabr. e *Apis mellifera* L. e insectos do género *Bombus* (Reig e Agustí, 2006b). Durante a época de polinização, são comuns as condições climáticas menos favoráveis que diminuem a actividade das abelhas, o que afecta o vingamento (Eti *et al.*, 1990). Em determinadas condições, a actividade das abelhas pode ser drasticamente reduzida ou mesmo interrompida devido a temperaturas baixas, assim como a viabilidade e germinação dos grãos de pólen podem ser afectadas (Mellenthin *et al.*, 1972; Welsh e Klatt, 1971). Devido a estes factos e como a maioria da produção de Alicante se encontra sob coberturas, é muito frequente fazer-se largadas de insectos do género *Bombus* em plena ântese para facilitar a polinização, e assim aumentar o vingamento (Reig e Agustí, 2006b).

O grão de pólen maduro da nespereira é binucleado, de tamanho médio (25-30 μm), forma esférica e é constituído por três colpos alongados que formam um ângulo recto com o plano equatorial (Figura 2.4). O grão de pólen é formado por uma fina camada de celulose, denominada intina e esta encontra-se coberta pela exina, que se divide numa parte interna, a endexina que é lisa e cobre totalmente a intina e uma parte externa, a ectexina que por sua vez é estriada e está coberta de pequenos poros. (Reig e Agustí, 2006a).

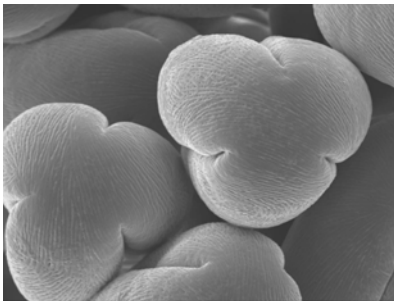


Figura 2.4 Grãos de pólen de nespereira.
Microfotografia electrónica
(3500x; barra=10 μm)

Quando o estigma está receptivo, o que ocorre normalmente depois da deiscência das anteras, produzem-se uma série de secreções acumuladas nas células do estigma abaixo da cutícula. Posteriormente, estas secreções distribuem-se por toda a superfície do tecido feminino (Herrero e Dickinson, 1980), promovendo a adesão dos grãos de pólen depositados ao estigma. Os grãos de pólen são humedecidos pelos exsudados produzidos no estigma, que contêm presumivelmente os promotores do crescimento do tubo polínico (Wolters-Arts *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 2001), permitindo a germinação e o crescimento do tubo polínico.

Pode-se considerar então, que o estado de maturação do estigma é alcançado quando este oferece um substrato adequado para a captura e adesão dos grãos de pólen, uma correcta germinação e a penetração do tubo polínico através das diferentes estruturas até alcançar o estilete.

2.5 Vingamento dos frutos de nespereira

Ao definir a receptividade floral apenas como a capacidade do estigma para permitir a germinação dos grãos de pólen (Heslop-Harrison, 2000), justificam-se frequentemente as baixas taxas de vingamento das espécies frutícolas, apenas com o problema da receptividade floral (Rodrigo e Herrero, 1996). No entanto, tanto a germinação do grão de pólen como o crescimento inicial do tubo polínico não dependem apenas das secreções do estigma, mas também das reservas acumuladas durante o desenvolvimento do grão de pólen, uma vez que a germinação do grão de pólen ocorre de um modo autotrófo (Herrero e Dickinson, 1981) e na nespereira, foram observadas diferenças nas reservas dos grãos de pólen de diferentes cultivares (Germana *et al.*, 2006).

Até há uns anos pensava-se que a maioria das cultivares era autocompatível, existindo algumas parcialmente incompatíveis e algumas mesmo autoincompatíveis, o que leva a taxas de vingamento baixas, não excedendo normalmente os 10%, inclusive em condições óptimas de polinização (Goubran e Zeftawi, 1986). Actualmente, Carrera *et al.* (2009) revelam que esta espécie é autoincompatível, conclusão obtida através do estudo da caracterização molecular das S-RNases. De acordo com este estudo, confirmou-se que a autoincompatibilidade é do tipo gametófito, como acontece nas espécies da família das Rosáceas, uma vez que as ribonucleases do estilete (S-RNases) inibem a função de reconhecimento do grão de pólen por parte do pistilo, sendo o desenvolvimento dos tubos polínicos inviável.

A capacidade de diferenciar entre pólen compatível ou incompatível ressalta a importância das células do estigma e do estilete na recepção do grão de pólen, do crescimento do tubo polínico e da interacção pólen-pistilo na reprodução de plantas (Heslop-Harrison *et al.*, 1975; Kandasamy *et al.*, 1994).

A produção intensiva de nespereiras revelou alguns problemas de baixas taxas de vingamento nalgumas regiões, e constatou-se que a presença de insectos polinizadores melhora substancialmente o rendimento da cultura (Kan *et al.*, 1986; Martinez-Calvo *et al.*, 2000b; Karadeniz, 2002; Cuevas *et al.*, 2003a).

Durante o vingamento da flor e o crescimento inicial do ovário, o teor hormonal em ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA) e citoquininas é máximo e aparece uma pequena produção de etileno (Ding e Zhang, 1988). Depois do vingamento não existe abscisão natural dos frutos, como existe para a maioria das espécies da família Rosaceae (Reig e Agustí, 2006b).

2.6 Desenvolvimento do fruto da nespereira

Blumenfeld (1980) propôs que o crescimento do fruto desta espécie era exponencial, embora a curva de crescimento do fruto exponencial não seja completa, uma vez que não contém a etapa inicial da maturação. No entanto, existem outros autores que defendem que os frutos crescem segundo um modelo sigmóide simples, característico dos frutos de pomo (Rodríguez, 1983; Cuevas *et al.*, 2003b).

De facto, durante as primeiras 6 semanas após o vingamento, a taxa de crescimento do fruto da nespereira é muito lenta (Atteyeh e Qrunflesh, 1998). A taxa de crescimento do fruto aumenta extraordinariamente na etapa final de desenvolvimento do fruto, pois em menos de 60 dias, desde o início de Março a finais de Abril, sob as condições climáticas mediterrâneas, o fruto aumenta mais de 12 vezes o seu peso, seguindo uma cinética de crescimento praticamente exponencial. Resumindo, durante os últimos 45 dias de crescimento do fruto ocorrem as principais alterações quantitativas, pois o fruto acumula 80% do seu peso seco e 85% do seu peso fresco, do qual 90% corresponde à acumulação de água na polpa (Reig e Agustí, 2006b).

O estudo comparativo da concentração de açúcares nos distintos órgãos do fruto revela que, durante o crescimento do fruto, a concentração de açúcares totais dos tecidos epidérmicos é aproximadamente 50% inferior à da polpa, e antes da mudança de cor, o teor na polpa triplica, enquanto que na película se mantém estável. A semente só acumula amido a partir da mudança de cor do fruto (Reig e Agustí, 2006b).

Em climas temperados-quentes, o crescimento do fruto inicia-se no início de Dezembro e a sua colheita começa no final de Abril, segundo a cultivar. Desde a floração até à colheita dos frutos passam entre 152 e 189 dias (Polat *et al.*, 2004). As diferenças entre tamanhos de frutos das diferentes cultivares deve-se a diferentes taxas de crescimento dos frutos e não à duração do seu período de crescimento (Reig e Agustí, 2006b). Durante a fase de maturação, há uma redução da acidez, desenvolvimento da cor, amolecimento dos tecidos da polpa, acumulação de açúcares e um rápido aumento do peso fresco da polpa (Lin *et al.*, 1999).

Relativamente ao comportamento do fruto durante a maturação, alguns autores, como Blumenfeld (1980) classificam a nespereira como um fruto não climatérico, uma vez que não tem pico respiratório climatérico e não tem pico de produção de etileno, nem na árvore nem após a colheita. Enquanto que, outros autores referem que encontraram produção de etileno ao longo do período de desenvolvimento do fruto (Gariglio *et al.*, 2002) e picos de produção de etileno e da taxa respiratória nas primeiras etapas de maturação (Hiari, 1980; Chachin *et al.* 1990; Gariglio *et al.*, 2002; Amorós *et al.* 2003), podendo ser considerado como um fruto climatérico.

No entanto, nenhum dos trabalhos citados estuda a actividade de ACC, ACC-sintase e ACC-oxidase, nem a evolução das enzimas que amolecem os tecidos, pectinametilesterase e poligalacturonase e sua dependência da produção de etileno, sendo este factor decisivo para determinar o tipo de maturação deste fruto. Por outro lado, a diminuição da acidez livre da polpa não se encontra coordenada com o aumento do teor em TSS, pois a acidez diminui após a mudança de cor, enquanto que o aumento de TSS só tem início quando a película perdeu praticamente todas as clorofilas (González *et al.*, 1994).

O peso do fruto é influenciado pelos dias até à maturação, soma de calor em graus-dias desde a floração, número de sementes e seu peso, mas não pelo número de folhas ou lançamentos (Lin *et al.*, 1999).

2.7 Utilização do ácido 1-naftalenoacético para a monda de frutos de nespereira

Para melhorar a qualidade de um fruto e assim satisfazer as exigências dos consumidores é essencial que o fruto tenha maior calibre e seja mais precoce. Nesse sentido, Westwood (1993) provou que a monda pode melhorar a qualidade dos frutos, aumentando o seu tamanho, em várias espécies, entre elas a nespereira. Os produtores realizavam a monda manual e com esta operação obtinham frutos melhor aceites pelos consumidores. No entanto, esta operação é normalmente muito cara, trabalhosa, necessita de muito tempo e requer trabalhadores especializados principalmente em pomares com densidades altas (Westwood, 1993). Para solucionar este inconveniente económico, surgiu a alternativa de usar biorreguladores, concretamente o ácido 1-naftalenoacético para a monda de frutos de nespereira, à semelhança do que acontece com macieiras, pereiras e oliveiras.

O ácido 1-naftalenoacético é uma auxina sintética, podendo ser usada para diferentes fins agronómicos, como favorecer o enraizamento, monda de frutos entre outros e assim aumentar a produtividade, melhorar a qualidade ou facilitar a colheita (Azcón-Biento, J. e Talón, M. 2000).

A eficácia dos fitorreguladores depende de factores como a cultivar, estado fenológico da planta, concentrações do produto e condições ambientais (Westwood, 1993).

No Quadro 2.2 apresentam-se resumidos os principais resultados obtidos por diferentes autores sobre o uso do ANA na monda de frutos de nespereira.

As diferenças entre as concentrações utilizadas pelos diferentes autores dever-se-ão à utilização de diferentes cultivares, árvores com diferentes vigores e condições climáticas diferentes (Cuevas *et al.*, 2004).

O ensaio realizado por Agustí *et al.* (2000) demonstrou que o sal potássico do ANA (ANAs), com uma concentração de 20mg/l, quando são visíveis 2 a 3 frutos por panícula é um tratamento eficaz, enquanto que a aplicação do sal amida do ANA (ANAm) provocou uma monda excessiva, o que difere dos resultados obtidos por Cuevas *et al.* (2004), pois os seus melhores resultados foram obtidos com esta formulação.

Se existe ambiguidade relativamente às concentrações e tipo de substância utilizada nos tratamentos, ela também está presente relativamente à época de aplicação, pois esta difere consoante os autores.

Os diferentes momentos de aplicação podem explicar os distintos resultados, uma vez que a época de aplicação pode variar consoante a substância aplicada. Por exemplo, em pêra e maçã, ANA é aplicado mais tarde do que ANAm. O que está de acordo com a época de aplicação calculada por Agustí *et al.* (2000) para a monda de nespereira da cultivar 'Algerie' com ANA, como 10 a 15 dias

após a plena floração, enquanto que os melhores resultados de Cuevas *et al.* (2004) são obtidos com a aplicação do ANAm, 8 a 9 dias após a plena floração.

O que parece claro é que a eficácia do ANA como agente de monda química diminui à medida que nos afastamos da data de plena floração e que a certo momento, o ANA provoca apenas monda, sem que promova a melhoria da qualidade dos frutos que permanecem na árvore, uma vez que estes já se encontram num estado de desenvolvimento muito avançado, sendo portanto crucial ajustar a concentração e época de tratamento para obter bons resultados (Hueso *et al.*, 2005).

Quadro 2.2 Resumo das características principais dos estudos realizados sobre a utilização do ANA para a monda de frutos de nespereira. A formulação do ANA como ácido livre, sal amida ou sal potássico expressa-se como ANA, ANAm e ANAs, respectivamente.

Autor	Formulação	Concentração	Época de Aplicação	Resultados
Kilavuz e Eti, 1993.	ANA, ANAm	25 mg/l		Aumento do tamanho final do fruto e antecipação da maturação.
Ateyyeh e Qrunfleh, 1997.	ANA	20 mg/l	75% de flores abertas	Aumento do peso e do volume dos frutos
Agustí <i>et al.</i> , 2000	ANA ANAm ANAs	20 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2-3 frutos visíveis /panícula ▪ Estado 609-700 BBCH ▪ 10-15 dias após plena floração 	Aumento do tamanho do fruto, redução do número de sementes, antecipação da maturação, menor dureza, maior teor em TSS e coloração mais intensa.
Razeto <i>et al.</i> , 2003	ANA	10 mg/l + 10 mg/l	1ª aplicação: Vingamento dos frutos basais 2ª aplicação: 28 dias depois	Aumento do tamanho do fruto, da % de polpa e do peso de sementes. Ligeiro atraso na maturação.
Cuevas <i>et al.</i> , 2004	ANAm	30 mg/l e 60 mg/l	8-9 dias após plena floração	Aumento do tamanho do fruto e antecipação da maturação.
Hueso <i>et al.</i> , 2005	ANAm e ANAs	45 mg/l e 50 mg/l	15 dias após plena floração	Aumento do teor em TSS e antecipação da maturação.

Os resultados de Agustí *et al.* (2000) afirmam que uma redução de 30% dos frutos por panícula leva a uma aumento de 10% do diâmetro dos frutos colhidos. Ao tratar uma panícula quando são visíveis 2-3 frutos recém vingados, são colhidos 4-5 frutos por panícula (Figura 2.5). A técnica proposta por este autor incorpora um manual de aconselhamento técnico para os produtores de nespereira da Comunidade Valenciana, que realizam a monda química como está descrita neste manual. Sendo assim, esta foi a referência utilizada para os tratamentos realizados durante este estudo.



Figura 2.5 Panícula no estado 703 da escala BBCH que foi sujeita a monda química no estado 609-700 BBCH, com sal potássico do ANA (Agustí *et al.*, 2006).

Para além do uso do ANA para a monda de frutos de nespereira, pode ser feita uma segunda aplicação desta auxina, no estado 703 da escala BBCH, com o fim de melhorar ainda mais o tamanho do fruto e conseqüentemente, a produção total e acelerar o desenvolvimento dos frutos, aumentando o valor económico da cultura (Amorós *et al.*, 2004). A incisão anelar de ramos (Agustí *et al.*, 2005) e a aplicação de 2,4DP (Agustí *et al.*, 2003) no estado 703 BBCH também melhoram o tamanho final do fruto.

2.8 Antecedentes sobre o modo de acção do ácido 1-naftalenoacético

A resposta à aplicação dos reguladores de crescimento por parte da planta, depende geralmente da sua absorção, do seu transporte desde e até ao órgão sensível, da formação de complexos com outras substâncias, sobretudo açúcares, e da sensibilidade da planta (Greene e Bukovac, 1972; Black *et al.*, 1995; Buban e Lakatos, 1997), sendo este último factor, o mais importante.

A acção dos fitorreguladores, concretamente na monda de frutos, é muito diversa, variando em função do tipo de fitorregulador utilizado e da espécie em questão, como indica a bibliografia.

Sendo assim, segundo Dennis (2000), os fitorreguladores utilizados na monda de macieiras intervêm em diferentes mecanismo fisiológicos como no aborto ou inibição do crescimento dos óvulos, na redução da capacidade de sumidouro e do transporte floémico para o fruto, na inibição da síntese e transporte de auxinas pelas sementes e inclusive no estímulo da biossíntese de etileno.

Luckwill (1953) percebeu que o aborto de sementes era comum nos frutos de macieira em desenvolvimento tratados com ANA, e que como consequência, havia uma diminuição da capacidade de sumidouro dos frutos, o que favorecia a sua abscisão. Também Murneek e Teubner (1953) observaram que os embriões de frutos da cv. 'Wealthy' de macieira tratados com ANAm tinham menores dimensões. No entanto, embora ANA induza o aborto de sementes em algumas cultivares, existem outras cultivares que podem ser mondadas sem que isto afecte o número de sementes dos seus frutos (Marsh *et al.*, 1960; Batjer e Thomson, 1962) e esta hormona pode também mondar frutos partenocárpicos, o que demonstra que a monda de frutos de macieiras não se deve unicamente à redução do número de sementes dos frutos (Williams, 1993).

Por outro lado, Struckmeyer e Roberts (1950) notaram que o tratamento com ANA atrasava a abscisão natural de frutos de macieira, levando a um aumento da capacidade de sumidouro dos frutos, mais desenvolvidos, aumentando o número de frutos que caem no final por competição com os remanescentes. No entanto, Teubner e Murneek (1955) observaram que os frutos de macieira, que eventualmente cairão para o seu crescimento logo após o tratamento, não podendo por isso competir pelos nutrientes com os frutos que persistem na árvore. Para além disso, o tratamento com ANA nem sempre atrasa a abscisão natural dos frutos (Batjer e Bilingsley, 1964).

Schneider e Lasheen (1973), verificaram que os tratamentos com ANA reduzem a concentração de açúcares nos frutos e o seu transporte a partir das folhas.

Por outro lado, Wertheim (2000) sugere que o modo de acção do ANAm na monda de frutos de macieira e pereira está relacionado com um desequilíbrio hormonal nos frutos em desenvolvimento, provocado pelo agente de monda, reduzindo o fluxo de auxinas e levando a menor acumulação de reservas nos frutos devido a uma redução da fotossíntese. Assim como Schroder e Bangerth (2006), referem que a monda dos frutos de macieira se deve a um processo de activação da zona de abscisão, provocado por uma repressão do fluxo de auxinas que aumenta a sensibilidade da zona de abscisão ao etileno, aumentando a abscisão de frutos.

Reconhece-se a diversidade de mecanismos que podem estar envolvidos na acção do ANA na monda de frutos (Williams, 1999).

Como se pode concluir, não há concordância entre os autores sobre o mecanismo de acção do ANA na monda de macieiras. Contrariamente aos diferentes estudos realizados sobre a monda de frutos de macieira e de pereira, no caso da nespereira, a aplicação do ANA tem efeito sobre o vingamento do fruto, não actuando sobre a abscisão do fruto já vingado, por isso este estudo centra-se essencialmente na fisiologia reprodutiva desta espécie.

3. Material e Métodos

3.1 Material Vegetal

Os ensaios realizaram-se em árvores adultas de nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] das cultivares ‘Algerie’ e ‘Piera’ localizadas em dois pomares experimentais (Figura 3.1).

Caracterização do Pomar A:

O pomar A corresponde à parcela de Fruticultura da Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos localizada na Universidad Politécnica de Valencia, com um solo franco-argiloso calcário, fertirrigação, compasso de plantação de 4 x 5 m, sistema de condução em vaso e porta-enxerto de marmeleiro.

Este pomar apresenta várias espécies de Prunóideas, Pomóideas e Citrinos.

Caracterização do Pomar B:

O pomar B corresponde à parcela experimental da Cooperativa Agrícola de Callosa d’En Sarrià, Alicante, com uma área de 2,2 ha (sendo 0,7 ha sem cobertura), solo franco-argiloso, fertirrigação, compasso de plantação de 3-4 x 5 m, sistema de condução em vaso, porta-enxerto em nespereira de semente (franco), árvores cobertas por uma malha de poliéster esmerilado.



Figura 3.1 Pomar A: Parcela de Fruticultura da Universidad Politécnica de Valencia.

Pomar B: Parcela Experimental da Cooperativa Agrícola de Callosa d’En Sarrià, Alicante.

3.2 Tratamentos Realizados

3.2.1 Aplicação de ácido 1-naftalenoacético *in vitro*

Aplicaram-se 20 mg/l de ácido 1-naftalenoacético na forma de sal potássico (ANAs)¹, a partir de uma formulação comercial do ANA [8,5% (m/v)] como líquido solúvel, à qual se adicionou um coadjuvante não iónico miscível. Os tratamentos efectuaram-se com um pulverizador manual, pulverizando o produto directamente sobre as placas de Petri onde se procedeu à cultura de grãos de pólen e de óvulos, deixando igual número de placas sem tratamento para servirem de controlo.

3.2.2 Aplicação de ácido 1-naftalenoacético *in vivo*

Aplicaram-se 20 mg/l de ácido 1-naftalenoacético na forma de sal potássico (ANAs)¹, a partir de uma formulação comercial do ANA [8,5% (m/v)] como líquido solúvel, à qual se adicionou um coadjuvante não iónico miscível. Os tratamentos efectuaram-se com um pulverizador manual, pulverizando o produto directamente sobre 10 panículas de diferentes estados fenológicos (estados 505, 507-600, 605 e 609-700 da escala BBCH) de modo a deixar cada panícula completamente molhada. Foram deixadas 10 panículas de cada estado fenológico sem tratamento para serem usadas como controlo.

¹Nota: Nos tratamentos realizados foi sempre utilizado o sal potássico do ANA (ANAs), embora durante a restante dissertação se refira a este apenas com a abreviatura ANA.

3.3 Características morfológicas de grãos de pólen

Para o estudo das diferenças morfológicas entre grãos de pólen de diferentes cultivares, foram recolhidas flores no estado fenológico 605 da escala BBCH das cultivares: 'Algerie', 'Piera', 'Golden Nugget', 'Moggi' e 'Magdal' no Pomar B (Figura 3.2). As flores foram transportadas à temperatura ambiente para o laboratório, onde se extraíram as anteras que foram conservadas a 4°C durante 2-3 h para a re-hidratação dos grãos de pólen.

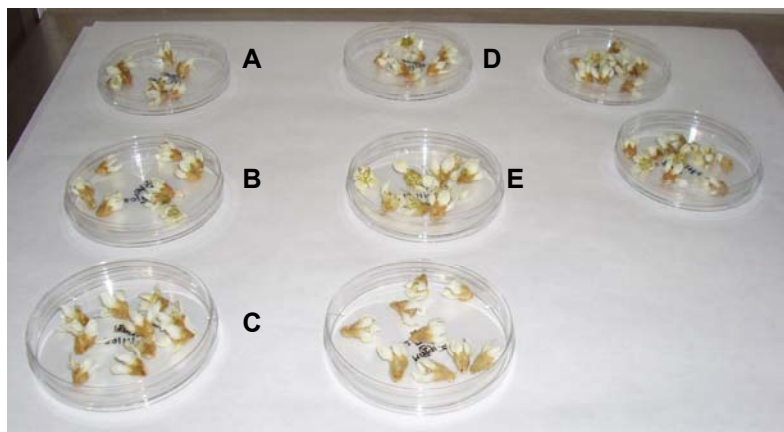


Figura 3.2 Flores no estado fenológico 605 BBCH das cultivares 'Algerie'(A), 'Piera'(B), 'Golden Nugget'(C), 'Moggi'(D) e 'Magdal'(E).

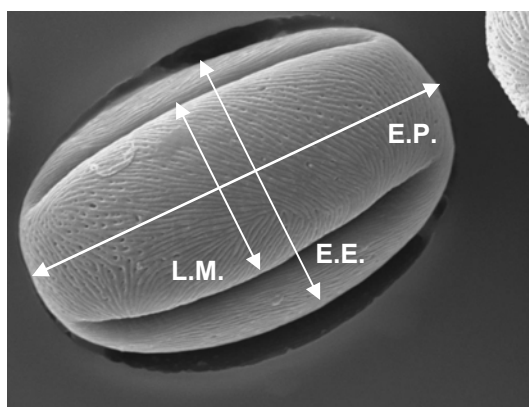
Posteriormente, as anteras foram colocadas sobre um suporte de cobre que se submergiu em N₂ líquido para sua congelação, mediante o sistema de transferência de frio CT-1000C (Oxford Instruments, Oxford, UK) ligado ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) JSM-5410 (JEOL Ltd. Tóquio, Japão). Em seguida, a água de superfície condensada da amostra foi sublimada pelo aquecimento controlado a -90°C. Posteriormente, a amostra foi coberta com ouro (Polaron E-6100), por pulverização catódica. Finalmente procedeu-se à observação no SEM com uma voltagem de aceleração de 10KeV, com as ampliações 2000x e 3500x. As imagens foram digitalizadas directamente no computador conectado ao microscópio, permitindo assim medir o Eixo Polar, o Eixo Equatorial, a relação Eixo Polar/Eixo Equatorial e a Largura de Mesocolpo (Figura 3.3), utilizando o programa Photoshop 5.0 e considerando a escala de referência do microscópio electrónico.

Figura 3.3 Microfotografia óptica de varrimento (3500x; barra=10 µm) com localização dos parâmetros medidos na exina do grão de pólen.

E.P.: Eixo Polar;

E.E.: Eixo Equatorial;

L.M.: Largura de Mesocolpo.



3.4 Estudo da acção do ácido1-naftalenoacético sobre o gametófito masculino

3.4.1 Acção do ácido1-naftalenoacético sobre a germinação de grãos de pólen

Os grãos de pólen foram extraídos de 20 a 25 anteras maduras de flores no estado fenológico 605 da escala BBCH das cultivares 'Piera' e 'Algerie' do Pomar A, com o auxílio de bisturis e pinças, observando através de uma lupa binocular (Nikon 120, Tóquio, Japão). Os grãos de pólen foram mantidos em água destilada numa placa de Petri para mantê-los hidratados até à sua preparação.

Para o cultivo de grãos de pólen utilizaram-se dois meios de cultura diferentes. O meio de germinação de Brewbaker e Kwack (1963), modificado, constituído por 100 mg/l H_3BO_3 , 300 mg/l $Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ e 100 mg/l KNO_3 , ao qual se adicionou sacarose 10% (m/v) e se ajustou o pH a $5,4 \pm 0,1$ representa o meio de cultura Controlo. O outro meio de cultura utilizado foi o mesmo meio que o anterior, mas ao qual se adicionou 20mg/l de ANA. Estes meios de cultura foram usados para cada cultivar com 8 repetições.

Em ambos os casos adicionou-se agarosa (EEOmedia), a 1%, para solidificar o meio. Os meios foram dissolvidos no microondas até à ebulição. Foram pipetados 100 μ l das soluções aquosas que continham grãos de pólen das duas cultivares para placas contendo os dois meios de cultura. As placas foram seladas e mantidas na ausência de luz a $25 \pm 1^\circ C$ numa estufa, até ao momento das observações.

As placas foram observadas com uma lupa binocular (Leica, MZ16A, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipada com uma câmara digital (DFC420), às 24, 48 e 72 h após a sua preparação, sendo avaliada a taxa de germinação através da contagem aleatória de 300-400 grãos de pólen por placa, considerando-se como grão de pólen germinado, aquele em que a longitude do tubo polínico era superior ao diâmetro do grão de pólen (Stanley e Linskens, 1974). Este ensaio foi repetido 30 dias depois, apenas com a cultivar 'Algerie'.

3.4.2 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o crescimento do tubo polínico

Foram cultivados grãos de pólen da cultivar 'Algerie', em 8 placas de Petri, conforme foi descrito no ponto 3.4.1. Após 24h de cultura de grãos de pólen foram avaliados aleatoriamente o comprimento de 50 tubos polínicos de cada placa com uma lupa binocular (Leica, MZ16A) equipada com uma câmara digital (DFC420).

Posteriormente aplicaram-se 20 mg/l de ANA, mediante pulverização com spray na superfície de quatro placas, deixando as restantes como controlo.

As placas foram incubadas na estufa e nas 24 h e 48 h seguintes ao tratamento avaliou-se novamente o comprimento dos tubos polínicos das placas tratadas (ANA) e controlo e se os tubos apresentavam algum sinal de interrupção de desenvolvimento.

3.5 Estudo da acção do ácido1-naftalenoacético sobre o gametófito feminino

3.5.1 Acção do ácido1-naftalenoacético sobre o desenvolvimento de óvulos *in vitro*

Para avaliar a acção do ANA no desenvolvimento de óvulos *in vitro* procedeu-se à aplicação de 20 mg/l de ANA a 10 panículas no estado fenológico 609-700 da escala BBCH, de uma árvore adulta da cultivar 'Algerie' presente no Pomar A. Foram também marcadas 10 panículas no mesmo estado de desenvolvimento, que não foram tratadas para servirem de controlo.

Dois dias após o tratamento colheram-se flores destas panículas, que se classificaram segundo o seu estado de desenvolvimento em (Figura 3.4):

- FF: flores que apesar de terem caído as pétalas e terem os estames secos, têm as sépalas abertas e não apresentam sinais de fecundação;
- F: flores num estado fenológico mais avançado com sépalas fechadas, tratando-se de uma flor vingada.



Figura 3.4 Panícula no estado fenológico 609-700 da escala BBCH, com flores FF e flores F.

As flores foram transportadas para o laboratório à temperatura ambiente e conservadas a 4°C até ao momento da extracção dos óvulos. As flores foram desinfectadas por imersão numa solução de hipoclorito sódico a 2%. Posteriormente, os óvulos foram extraídos sob a observação de uma lupa binocular (Nikon 120, Tóquio, Japão), com o auxílio de bisturis e pinças, sendo feito um corte transversal no ovário das flores e recolhidos os óvulos nos diferentes estados de desenvolvimento. Os óvulos também foram desinfectados com hipoclorito sódico a 2% e colocados no respectivo meio de cultura. O material foi várias vezes desinfectado com etanol a 96%.

Os meios de cultura utilizados foram por um lado, Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS), suplementado com sacarose (150 mM) e extracto de malte (500 mg/l), solidificado com agar a 1% (Carimi *et al.*, 1998) e por outro lado, o meio de cultura igual ao anterior, mas que ao qual se adicionou 20 mg/l de ANA (MS+ANA).

Ambos os meios de cultura foram esterilizados numa Autoclave Selecta Autester-E-Dry 75L (JP Selecta, Barcelona, Espanha), segundo um ciclo de 30 minutos a 120°C e foram distribuídos por placas de Petri esterilizadas numa câmara de fluxo laminar Gelaire BSB4A (Flow Laboratories, Ohio, USA) sob condições assépticas. Os óvulos das flores dos dois estados de desenvolvimento (FF) e (F) das panículas controlo foram cultivados nos meios de cultura MS (Sem tratamento) e MS+ANA (Tratado no meio de cultura). No entanto, os óvulos procedentes de flores FF e F das panículas tratadas com ANA foram cultivadas apenas com o meio de cultura MS (Tratado no campo). Em todos os casos, foram colocados 4 óvulos por placa, com 4 placas por tratamento seladas com parafilme e incubadas numa estufa a 25±1°C em condições de ausência de luz.

A avaliação do desenvolvimento dos óvulos foi feita com recurso à observação em lupa binocular (Leica, MZ16A) equipada com uma câmara (DFC420), 9 dias após a preparação das placas, observando-se se havia formação de callus e pesando os óvulos numa balança de precisão. Os pesos dos óvulos do meio de cultura foram comparados com os pesos de óvulos de flores FF e F provenientes de panículas controlo sem serem cultivados.

Paralelamente avaliou-se a sensibilidade ao tratamento com ANA dos óvulos de frutos de estados fenológicos mais avançados, seguindo o mesmo procedimento. Neste ensaio foram utilizados óvulos de frutos nos estados fenológicos 701, 703 e 704 BBCH, provenientes de panículas controlo que foram cultivados em meio de cultura MS (Sem tratamento) e em MS+ANA (Tratado no meio de cultura) e de panículas tratadas com 20 mg/l de ANA que foram cultivados em MS (Tratados no campo). Neste caso, usaram-se árvores do pomar B e foram cultivados 3 óvulos por placa com 3 repetições.

A avaliação do desenvolvimento dos óvulos foi feita com recurso à observação em lupa binocular (Leica, MZ16A) equipada com uma câmara digital (DFC420), 20 dias após a preparação das placas, observando-se se havia desenvolvimento de callus e pesando os óvulos numa balança de precisão.

3.5.2 Acção do ácido1-naftalenoacético sobre o desenvolvimento de óvulos *in vivo*

Para avaliar a acção do ANA sobre o desenvolvimento de óvulos *in vivo* procedeu-se ao tratamento com 20 mg/l de ANA de 10 panículas dos dois pomares de cada um dos seguintes estados fenológicos:

- 505 BBCH: Flores completamente fechadas;
- 507-600 BBCH: Flores em estado intermédio;
- 605 BBCH: Flores completamente abertas;
- 609-700 BBCH: Momento óptimo de aplicação comercial do ANA.

Foram deixadas 10 panículas sem tratamento para servirem de controlo.

Foram feitas amostragens a cada 2-3 dias de 8 a 10 flores de uma panícula de cada estado fenológico. Em cada amostragem, as flores foram pesadas e fixadas em FPA (5% de formaldeído, 5% de ácido propiónico, 90% de etanol a 70%) dentro de tubos de plástico que foram mantidos na escuridão para sua conservação até que as amostras fossem observadas em microscópio de fluorescência (Figura 3.5 A). Nas panículas tratadas no estado 609-700 BBCH, os órgãos colhidos foram divididos em FF e F, segundo a classificação usada no ponto 3.5.1.

Aquando das observações, foram separados os estigmas, estiletos e ovário junto com os seus óvulos de 70 flores previamente fixadas em FPA dos estados fenológicos 605 e 609-700 da escala BBCH com bisturi e pinça, observando através de uma lupa binocular (Nikon, Tóquio, Japão) (Figura 3.5 B e C). De seguida, as estruturas foram lavadas duas vezes com água destilada durante 1 h e colocadas numa solução de NaOH 4N durante outra hora. Posteriormente, foram lavadas em água destilada até que a superfície dos óvulos escurecesse e montadas para observação em microscópio (Sanzol, 2001).

Para isso, colocaram-se num extremo da lâmina os estigmas com os seus respectivos estiletos e no outro extremo os óvulos, perfeitamente separados do ovário. Adicionaram-se umas gotas de azul de anilina a 0,1% em K_3PO_4 0,1N (Linskens e Esser, 1957), cobriu-se com uma lamela, evitando a formação de bolhas de ar e realizou-se um *squash*, separando assim os tegumentos do óvulo do nucelo e permitindo a abertura do estilete (Figura 3.5 D e E).

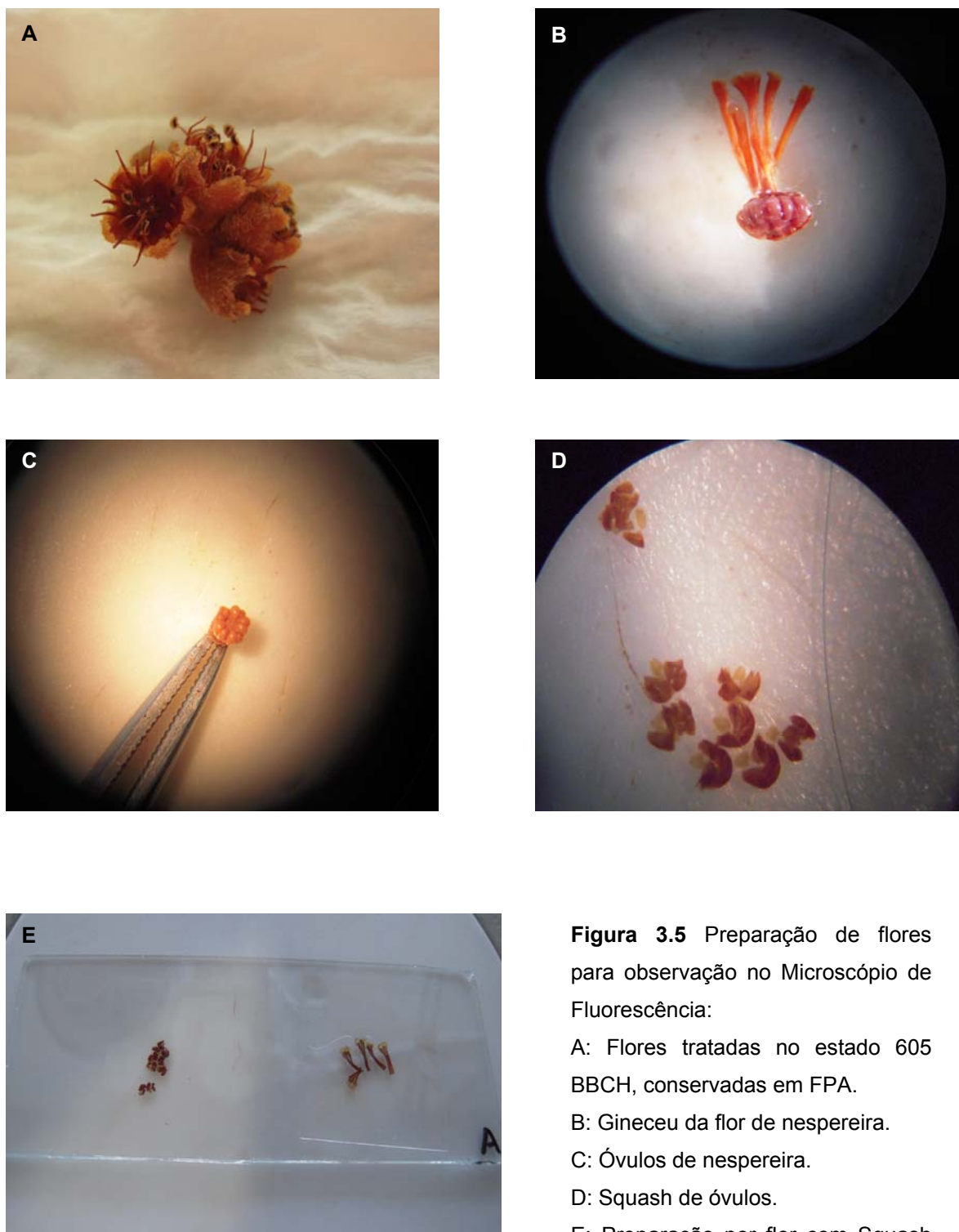


Figura 3.5 Preparação de flores para observação no Microscópio de Fluorescência:

A: Flores tratadas no estado 605 BBCH, conservadas em FPA.

B: Gineceu da flor de nespereira.

C: Óvulos de nespereira.

D: Squash de óvulos.

E: Preparação por flor com Squash de óvulos e de pistilos.

Em seguida, observaram-se as preparações num microscópio de fluorescência (Nikon E600, Tóquio, Japão) com uma fonte de ultravioleta equipado com um filtro DAPI. Por um lado foi avaliada a germinação de grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos nos estigmas e estiletos isolados e por outro lado, a presença ou não de calose na calaza do nucelo dos óvulos.

A avaliação qualitativa da germinação dos grãos de pólen e do crescimento dos tubos polínicos foi possível graças ao azul de anilina que tingem a calose que se deposita nas paredes dos tubos polínicos durante o seu crescimento, em forma de placas e com intervalos irregulares. A calose ao ser iluminada por luz ultravioleta emite fluorescência, permitindo observar a germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos.

Os óvulos classificaram-se como degenerados ou vivos em função da presença ou ausência de calose na calaza do nucelo, uma vez que, como acontece nos tubos polínicos, a calose cora-se de azul de anilina e após ser iluminado com luz ultravioleta emite fluorescência, permitindo a sua observação.

Quando as panículas tratadas se encontravam no estado fenológico 701 da escala BBCH, momento em que é feita a monda manual de frutos, foi avaliada a taxa de vingamento de cada panícula tratada nos diferentes estados fenológicos e das panículas controle.

3.5.3 Determinação da sensibilidade de óvulos de diferentes estados fenológicos à acção do ácido 1-naftalenoacético

Para avaliar a sensibilidade dos óvulos ao tratamento com ANA, marcaram-se 5 panículas de 5 árvores adultas da cultivar 'Algerie' do pomar B nos seguintes estados fenológicos: 505, 508, 701 e 703 da escala BBCH.

Colheram-se flores e frutos de panículas nos mesmos estados de desenvolvimento que as marcadas. Estes foram transportados à temperatura ambiente para o laboratório, onde foram pesados e em seguida foram extraídos os seus óvulos, que também foram pesados. Posteriormente, todas as panículas marcadas foram tratadas com 20 mg/l de ANA.

Vinte dias após o tratamento foram colhidas amostras de flores e frutos das panículas tratadas e transportados à temperatura ambiente para o laboratório, onde foram conservados à temperatura de 4°C até que foram utilizados os seus óvulos para cultura *in vitro*.

Para extracção dos óvulos e sua cultura foi utilizado o método descrito em 3.5.1. Neste caso, os óvulos cultivados em meio de cultura MS foram tratados apenas no campo (*in vivo*), enquanto que os óvulos cultivados em meio de cultura MS+ANA, foram tratados no campo e no meio de cultura (*in vivo+in vitro*). Foram usadas três repetições, com 4 óvulos por placa em média.

As placas foram observadas com uma lupa binocular (Leica, MZ16A) equipada com uma câmara digital (DFC420), para avaliar o desenvolvimento de callus e após 7 dias de cultura, os óvulos foram também pesados.

3.6 Análise estatística de resultados

Aos resultados obtidos aplicou-se a análise de variância, utilizando o programa Statsgraphics Plus 5.1, aplicando o teste de Student-Newman-Keuls para a separação de médias. Para os valores percentuais foi aplicada a transformação \sqrt{p} para normalizar a amostra.

4. Resultados

4.1 Características morfológicas de grãos de pólen

Os grãos de pólen das 5 cultivares de nespereira observados ('Algerie', 'Piera', 'Golden Nugget', 'Magdal' e 'Moggi') são constituídos por três mesocolpos alongados que formam um ângulo recto com o plano equatorial, apresentando a forma de esférico prolato (Chen *et al.*, 2007), embora vistos de frente pareçam ligeiramente arredondados.

O tamanho médio dos grãos de pólen, assim como a largura dos mesocolpos, variou ligeiramente em função da cultivar, apresentando valores médios de eixo polar e equatorial de 34,0 μm e 21,4 μm respectivamente, e de 13,1 μm para a largura dos mesocolpos.

O grão de pólen da cultivar 'Algerie' apresenta maiores dimensões, com um eixo polar de 36,6 μm e um eixo equatorial de 22,6 μm , enquanto que o grão de pólen da cultivar 'Magdal' tem menores dimensões, pois apresenta um eixo polar e um eixo equatorial de apenas 30,9 μm e 19 μm , respectivamente.

Não obstante, os mesocolpos com maior tamanho pertencem à cultivar 'Golden Nugget', com uma largura de 15 μm , sendo por isso o grão de pólen com menor relação eixo polar/eixo equatorial, apresentando por isso uma forma mais arredondada.

A relação entre o eixo polar e o eixo equatorial apresentou algumas diferenças, estabelecendo-se um intervalo de 1,51 a 1,64 μm para as cultivares estudadas (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Médias e desvios padrão (μm) das características morfométricas do grão de pólen de diferentes cultivares de nespereira.

Cultivar	Eixo Polar μm	Eixo Equatorial μm	Eixo Polar/ Eixo Equatorial	Largura de Mesocolpo μm
'Algerie'	36,6	22,6	1,62	12,2
'Piera'	33,7	21,7	1,55	12,2
'Golden Nugget'	33,7	22,3	1,51	15,0
'Magdal'	30,9	19,0	1,63	13,0
'Moggi'	35,0	21,4	1,64	12,9
Média	34,0	21,4	1,59	13,1
Desvio Padrão	2,1	1,4	0,1	1,2

Embora não se tenha estudado detalhadamente a estrutura da exina dos grãos de pólen, observou-se que as 5 cultivares estudadas apresentam exinas totalmente estriadas e encontram-se cobertas de pequenos poros (Figura 4.1).

Contudo, podem-se apreciar ligeiras diferenças entre as texturas da exina das diferentes cultivares, embora esta característica não esteja suficientemente clara para classificar os tipos de texturas como foi realizado nos estudos de Chen *et al.* (2007) para outras cultivares.

Dada a morfologia polínica das diferentes cultivares e uma vez que há coincidência em praticamente todos os parâmetros estudados, estas cultivares poderiam ser agrupadas no mesmo tipo polínico.

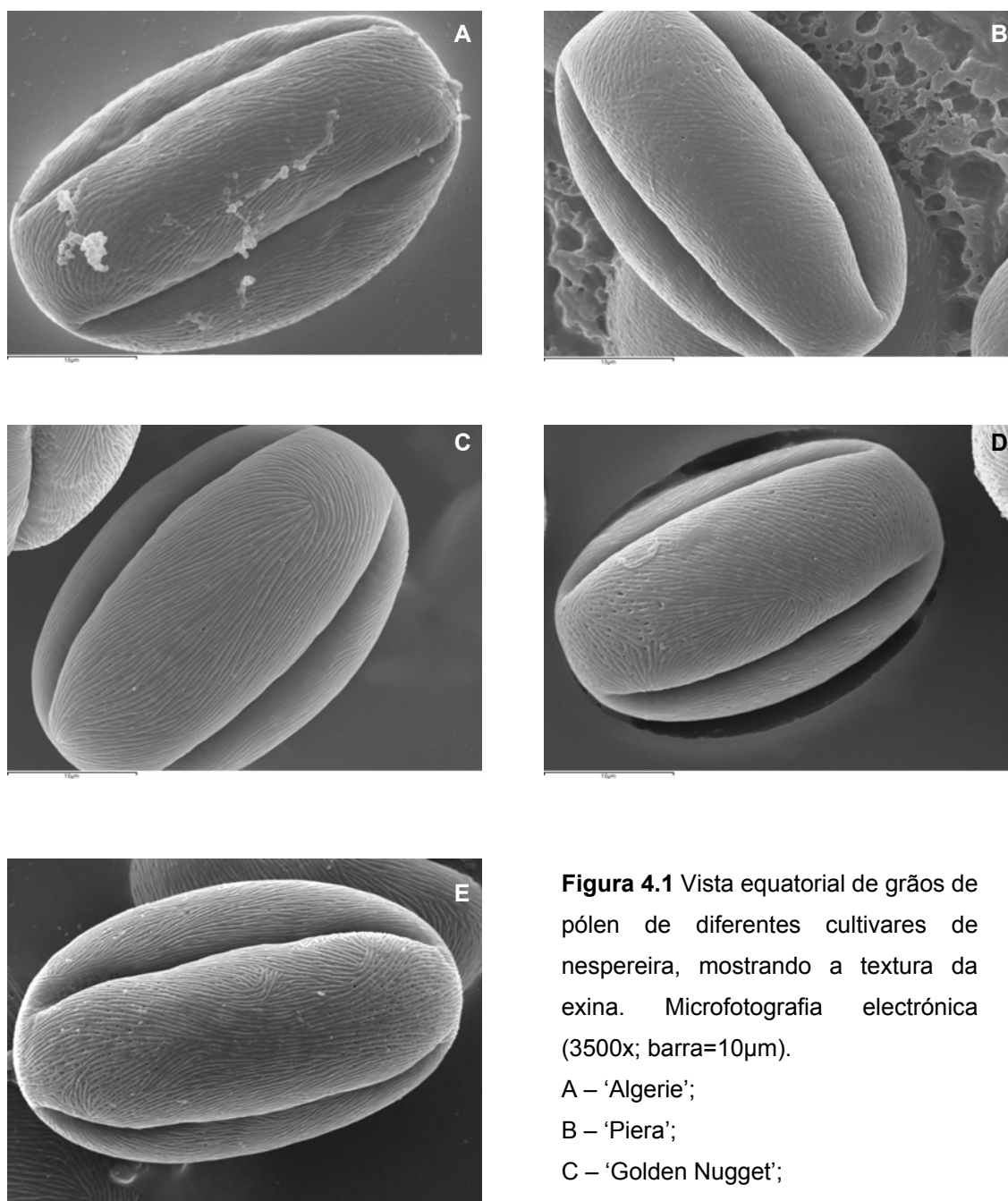


Figura 4.1 Vista equatorial de grãos de pólen de diferentes cultivares de nespereira, mostrando a textura da exina. Microfotografia electrónica (3500x; barra=10µm).

- A – ‘Algerie’;
- B – ‘Piera’;
- C – ‘Golden Nugget’;
- D – ‘Magdal’;
- E – ‘Moggi’.

4.2 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito masculino

4.2.1 Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre a germinação de grãos de pólen

A aplicação de 20 mg/l de ANA ao meio de cultura impediu a germinação *in vitro* dos grãos de pólen das cultivares 'Algerie' e 'Piera' de nespereira.

Vinte e quatro horas após a cultura, já se observavam diferenças significativas na percentagem de germinação dos grãos de pólen das duas cultivares estudadas comparativamente com os controlos, pois os grãos de pólen da cultivar 'Algerie' e da cultivar 'Piera' cultivados no meio de cultura controlo germinaram 57,9% e 64,6%, respectivamente, enquanto que nos grãos de pólen cultivados no meio de cultura ao qual foi adicionado ANA, a germinação foi praticamente nula para ambas as cultivares ('Algerie'- 0,9% e 'Piera' – 0,5%).

As taxas de germinação mantiveram-se praticamente estáveis com o tempo, com excepção para os grãos de pólen da cultivar 'Algerie' em meio de cultura controlo, cuja taxa de germinação aumentou para os 70%, após 48 h de cultura. No entanto, continuaram a não haver diferenças significativas relativamente à taxa de germinação obtida pela cultivar 'Piera' (64,8%) nesse mesmo momento (Figura 4.2).

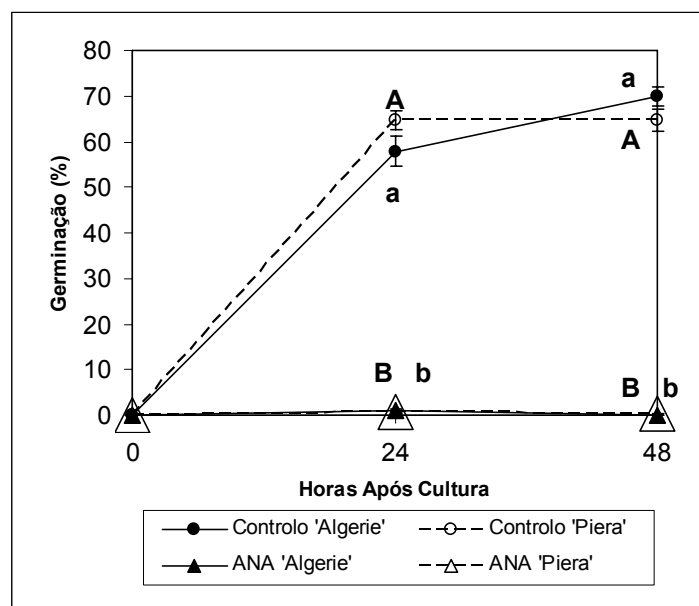


Figura 4.2 Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) ao meio de cultura sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares 'Algerie' e 'Piera' de nespereira. Cada valor é a média de 8 repetições. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), para as cultivares 'Piera' e 'Algerie', respectivamente, segundo o teste de Student-Newman-Keuls. O efeito da cultivar não foi estatisticamente significativo.

Como consequência destes resultados, às 24h após a cultura observaram-se diferenças no crescimento dos tubos polínicos dos grãos de pólen. Enquanto que os tubos polínicos das cultivares 'Algerie' e 'Piera' em meio de cultura controlo cresceram, alcançando uma longitude média de 1,08 mm e 0,84 mm, respectivamente (Figura 4.3), os tubos polínicos dos grãos de pólen germinados em meio de cultura ANA apresentavam menores dimensões. Às 48 h após a cultura, os grãos de pólen cultivados em ANA continuaram sem germinar.

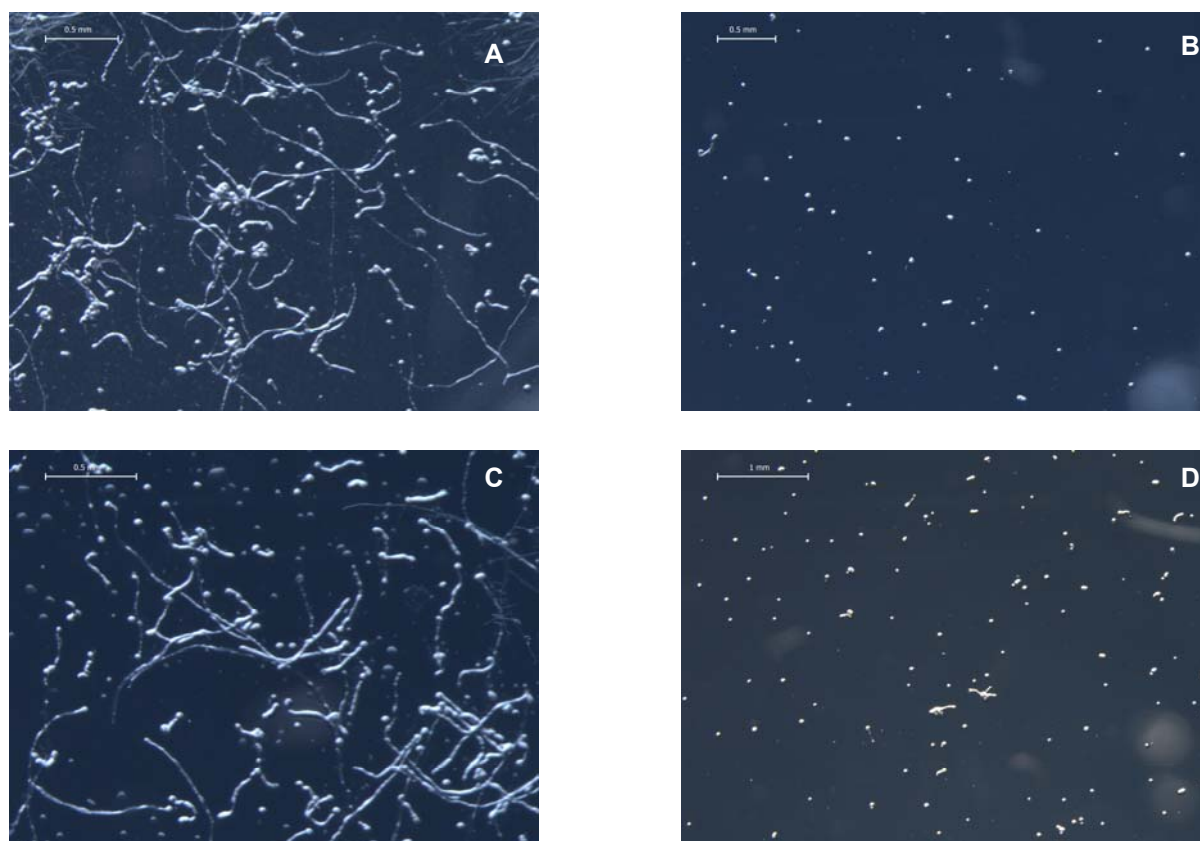


Figura 4.3 Germinação *in vitro* de grãos de pólen de nespereira das cultivares 'Algerie' em meio de cultura controlo (A) e em meio de cultura ANA (B) e da cultivar 'Piera' em meio de cultura controlo (C) e em meio de cultura ANA (D). Fotografias tiradas 24 horas após a cultura (40x).

Na repetição do ensaio, foi utilizada apenas a cultivar 'Algerie' uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre as taxas de germinação das duas cultivares no 1º ensaio.

Neste caso, verificaram-se os mesmos resultados, pois 24 h após a cultura, germinaram 56,8 % dos grãos de pólen cultivados em meio de cultura controlo, o que difere significativamente dos grãos de pólen cultivados em meio de cultura ANA que praticamente não germinaram, sendo a taxa de germinação destes de 0,8% (Figura 4.4).

Foi obtida uma resposta semelhante ao primeiro ensaio tanto relativamente à germinação de grãos de pólen, como indirectamente sobre o crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen que germinaram. As diferenças eram evidentes logo após 24 h de cultura, pois os grãos de pólen cultivados em meio de cultura controlo desenvolveram um tubo polínico com aproximadamente 1 mm de comprimento, enquanto que os grãos de pólen cultivados em meio de cultura ANA continuaram sem germinar (Figura 4.5).

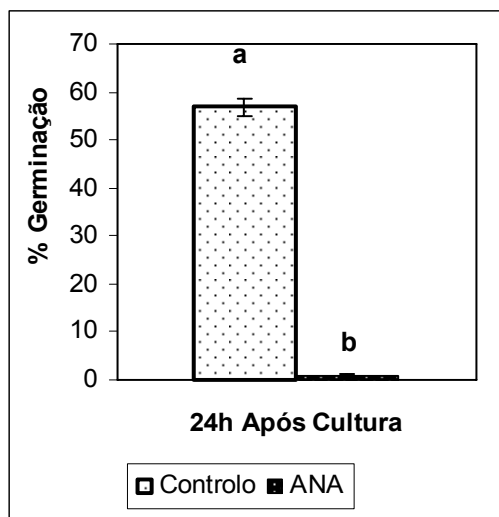


Figura 4.4 Influência da aplicação de 20 mg/l de ANA ao meio de cultura sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen da cultivar 'Algerie'. Cada valor é a média de 8 repetições. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

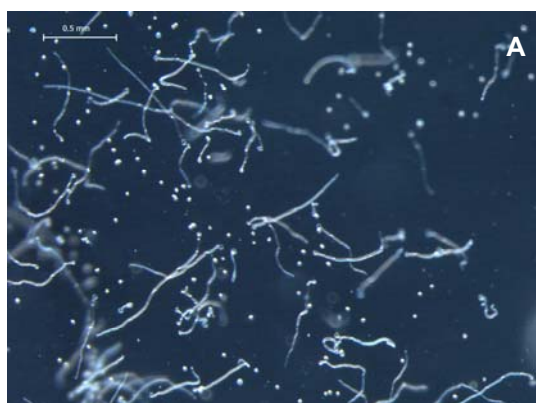


Figura 4.5 Germinação *in vitro* de grãos de pólen de nespereira da cultivar 'Algerie' em meio de cultura controlo (A) (40x) e em meio de cultura com 20 mg/l de ANA (B) (20x). Fotografias tiradas 24 horas após a cultura.

É interessante, portanto, destacar o efeito que o ANA exerce sobre a germinação dos grãos de pólen da nespereira em condições *in vitro*. De maneira que, independentemente das ligeiras diferenças observadas na morfologia dos grãos de pólen, o tratamento mostrou-se eficaz para as duas cultivares estudadas.

4.2.2. Acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o crescimento do tubo polínico

A aplicação de 20 mg/l de ANA a grãos de pólen da cultivar 'Algerie' germinados *in vitro*, quando estes tinham desenvolvido um tubo polínico de, aproximadamente 0,26 mm de comprimento, conseguiu deter o crescimento dos tubos polínicos.

A resposta à aplicação do ANA (20 mg/l) foi imediata e 24 h após o tratamento observaram-se diferenças significativas no crescimento dos tubos polínicos, sendo estas mais acentuadas às 48 h após o tratamento.

Os tubos polínicos dos grãos de pólen sem tratamento cresceram progressivamente com o tempo, alcançando às 24 h e 48 h depois do tratamento, um comprimento médio de 0,33 e 0,40 mm, respectivamente. Contrariamente ao que aconteceu aos tubos polínicos tratados que não conseguiram crescer (Figura 4.6).

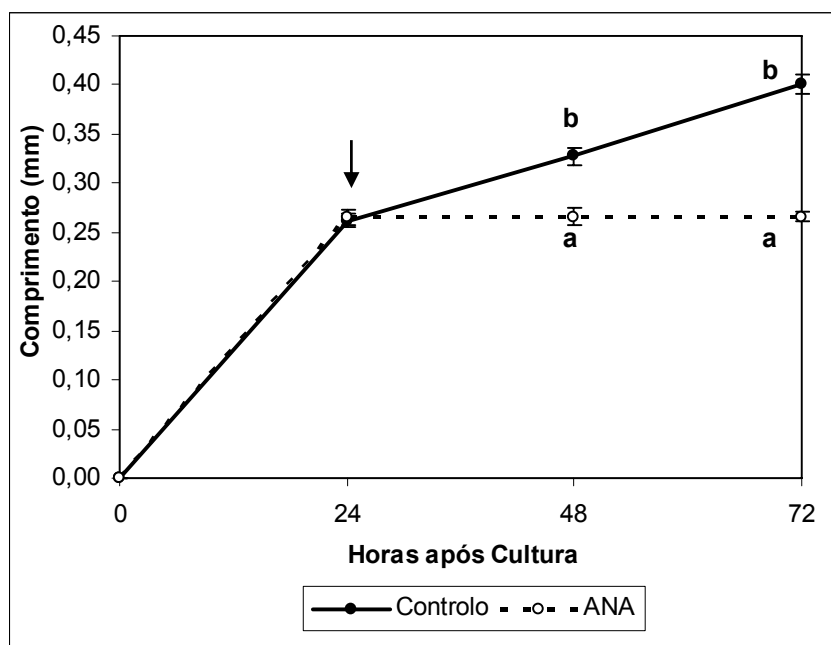


Figura 4.6 Efeito da aplicação do ANA (20mg/l) sobre o crescimento dos tubos polínicos da cultivar 'Algerie' em condições de cultura *in vitro*. A seta indica o momento do tratamento. Cada valor é a média de 4 placas de Petri. Em cada uma, mediram-se 50 tubos polínicos. As barras verticais indicam o erro padrão. Letras diferentes para o mesmo tempo indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

A aplicação do ANA (20 mg/l) ao meio de cultura, quando os tubos polínico tinham crescido em média 0,26 mm, deteve por um lado o crescimento dos tubos polínicos, e por outro lado, impediu a germinação dos restantes grãos de pólen, conforme os resultados obtidos no ponto 4.2.1 (Figura 4.7).

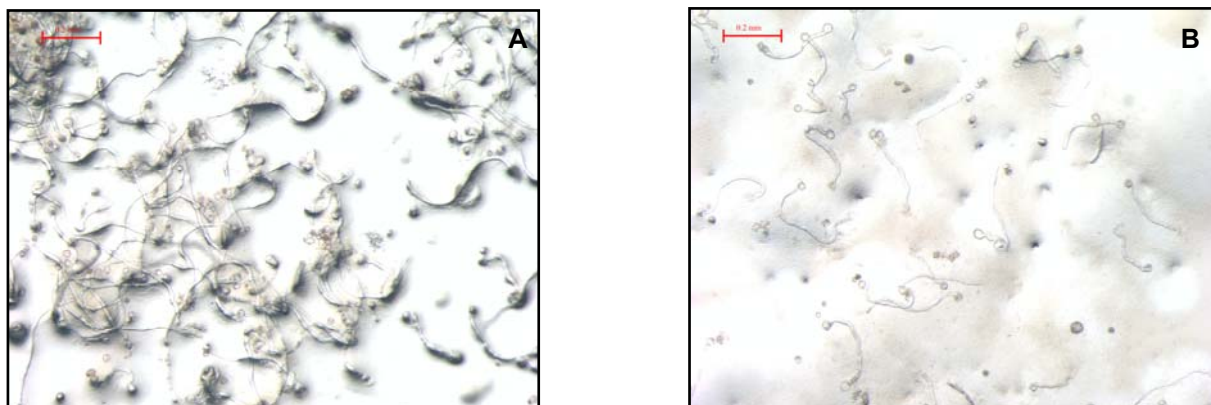


Figura 4.7 Germinação de grãos de pólen e crescimento de tubos polínicos *in vitro* da cultivar 'Algerie', 48 h após a cultura em meio de cultura controlo (A) e em meio de cultura controlo ao qual se aplicou 20 mg/l de ANA às 24 h de cultura (B) (barra=0,2 mm).

Estes resultados mostram apenas a acção do ANA interrompendo o crescimento dos tubos polínicos em condições *in vitro*, não mostrando a acção do ANA sobre a possível rotura dos mesmos. No entanto, a aplicação do ANA (20 mg/l) directamente sobre os tubos polínicos em crescimento *in vitro* provocou a rotura de alguns destes na zona terminal (Figura 4.8), detendo assim o seu crescimento.



Figura 4.8 Pormenor da rotura de um tubo polínico da cultivar 'Algerie' por acção da aplicação do ANA (20 mg/l) após 24h de cultura. Fotografia tirada às 48 horas após o tratamento (80x; barra=0,2 mm).

4.3 Estudo da acção do ácido 1-naftalenoacético sobre o gametófito feminino

A aplicação de 20 mg/l de ANA a óvulos FF (provenientes de flores FF) em desenvolvimento reduziu significativamente o peso dos mesmos, tanto quando a aplicação foi realizada directamente ao meio de cultura em condições *in vitro*, como quando se realizou directamente sobre a panícula em condições *in vivo*, sendo a resposta mais eficaz no primeiro caso. Assim, nove dias depois da cultura em MS, o peso dos óvulos FF, sem tratar e tratados no campo, foi de 455,6 μg e 244,4 μg , respectivamente. No entanto, os óvulos FF tratados no meio de cultura (MS+ANA) detiveram o seu crescimento relativamente ao seu peso inicial (66,7 μg) (Figura 4.9).

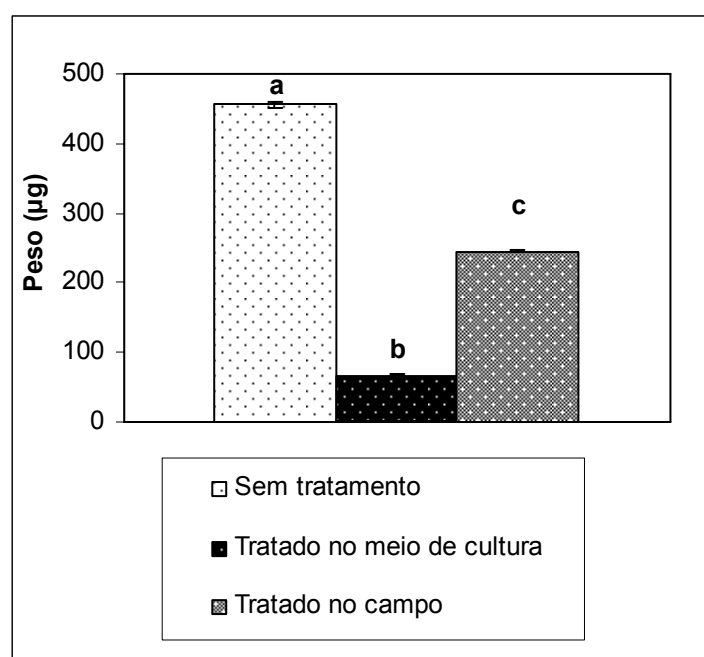


Figura 4.9 Peso final (μg) de óvulos FF cultivados em MS, sem tratamento, tratados no meio de cultura (MS+ANA) e tratados no campo e cultivados em MS, após 9 dias de cultura. O peso médio inicial dos óvulos FF era $66,7 \mu\text{g} \pm 2,55$. Cada valor é a média do peso de 16 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão.

Resulta interessante destacar 1) a sensibilidade dos óvulos FF ao tratamento e 2) a menor resposta em condições de campo, consequência da floração escalonada desta espécie, pois numa panícula existem flores em estados de desenvolvimento diferentes.

A aplicação de 20 mg/l de ANA a óvulos num estado de desenvolvimento mais avançado (F, provenientes das flores F), também reduziu significativamente o peso dos mesmos, tanto quando se aplicou directamente ao meio de cultura como quando a aplicação foi realizada no campo. O peso dos óvulos F não tratados, 9 dias após a sua cultura, foi de 11,17 mg, enquanto que o peso dos óvulos tratados no meio de cultura e no campo foi de 4,34 mg e 2,83 mg, respectivamente.

A resposta dos óvulos F ao tratamento foi semelhante independente de se a aplicação foi realizada *in vitro* ou *in vivo* e, em ambos os casos, deteve-se o crescimento dos óvulos relativamente ao seu peso inicial (2,83 mg) (Figura 4.10), contrariamente ao que foi observado nos óvulos FF (Figura 4.9).

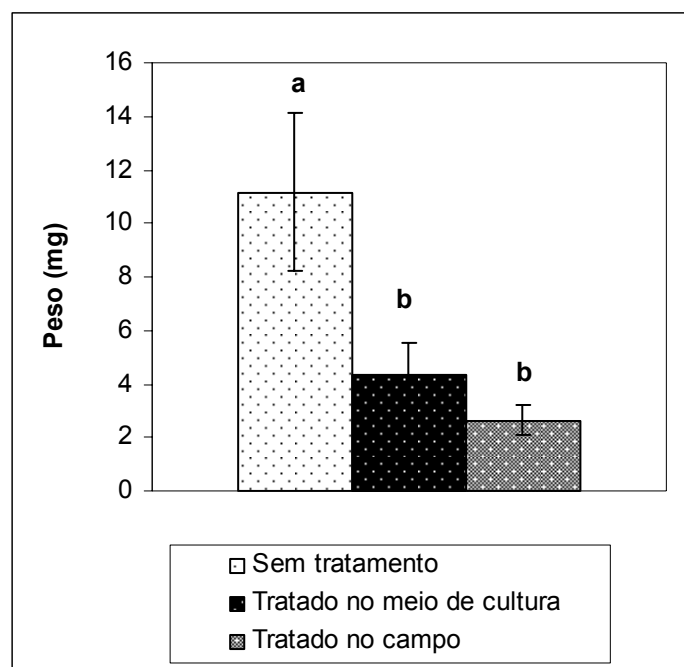


Figura 4.10 Peso final (mg) de óvulos F cultivados em MS, sem tratamento, tratados no meio de cultura (MS+ANA) e óvulos F tratados no campo e cultivados em MS, após 9 dias de cultura. O peso médio inicial dos óvulos F era 2,83 mg \pm 0,67. Cada valor é a média do peso de 16 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão.

Também neste caso, resulta interessante destacar 1) a sensibilidade dos óvulos F ao tratamento e 2) a semelhança da resposta nas condições *in vitro* e *in vivo*, apesar da floração escalonada desta espécie.

As flores F de uma panícula têm no mínimo um óvulo fecundado, facilmente distinguível pelo seu tamanho, ao contrário das flores FF cujos óvulos têm um tamanho uniforme, sendo a identificação dos óvulos fecundados no caso das flores FF muito complicada, encontrando-se a maioria dos óvulos cultivados por fecundar.

Para além disso, os frutos têm naturalmente 2-4 sementes, embora provenham de flores com dez óvulos (Lin *et al.*, 1999), por isso ao cultivar óvulos F de uma flor, sabemos que a maioria destes não se encontram fecundados. Por isso, ao serem cultivados não se desenvolvem nem os óvulos tratados *in vivo* nem *in vitro*, o que torna evidente a sensibilidade dos óvulos no estado inicial de desenvolvimento, isto é, quando estão receptivos a ser fecundados, independentemente do estado da flor.

Consequentemente, a resposta ao tratamento *in vitro* varia em função do número de óvulos sensíveis ou, dito de outro modo, dos óvulos receptivos não fecundados e postos em cultura. Por isso determinou-se o início da frutificação como modo indirecto de determinar o grau de fecundação dos óvulos, através do controlo do peso das flores/frutos nos dois estados de desenvolvimento, FF e F.

Deste modo, o peso das flores FF que não se trataram no campo foi significativamente maior, ao longo do tempo que o peso das flores tratadas. Quatro dias após o tratamento, as flores tratadas no campo com 20 mg/l de ANA pesavam 31,78 mg menos que as flores não tratadas. Contudo, esta diferença de peso não foi constante ao longo do tempo, atingindo o valor máximo de 37,02 mg, 14 dias após o tratamento e o valor mínimo de 13,42 mg, seis dias depois. No entanto, estas diferenças não obtiveram significação estatística (Quadro 4.2), isto é, não existem diferenças significativas entre o peso de flores ao longo do tempo, independentemente do tratamento.

Quadro 4.2 Evolução do peso fresco (mg) por flor FF segundo os dias após o tratamento com ANA (20 mg/l). O tratamento realizou-se a 10 panículas no estado 609-700 da escala BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do peso de 10 flores. Não existem diferenças significativas entre os dias após o tratamento.

Dias após o tratamento	Controlo (mg)	ANA (mg)	Significância
4	73,83	42,05	*
7	69,17	34,29	*
9	75,42	57,98	*
12	56,14	34,46	*
14	70,42	33,40	*
20	59,45	46,03	*

* Indica diferença significativa ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

Por outro lado, as flores F registaram um aumento gradual do peso ao longo do tempo, não havendo diferenças significativas entre as flores tratadas com ANA e as flores controlo. Embora o peso das flores tratadas fosse geralmente superior, este não teve diferenças estatisticamente significativas.

Dois dias após o tratamento, o peso das flores F tratadas era já superior ao peso das flores não tratadas, 118 mg frente a 94,5 mg. Esta diferença de peso aumentou com o tempo e, aos 35 dias após o tratamento, o peso das flores tratadas e controlo era de 569 mg e 436 mg, respectivamente (Figura 4.11). Embora existam algumas variações de peso ao longo do tempo, estas não têm efeito estatístico.

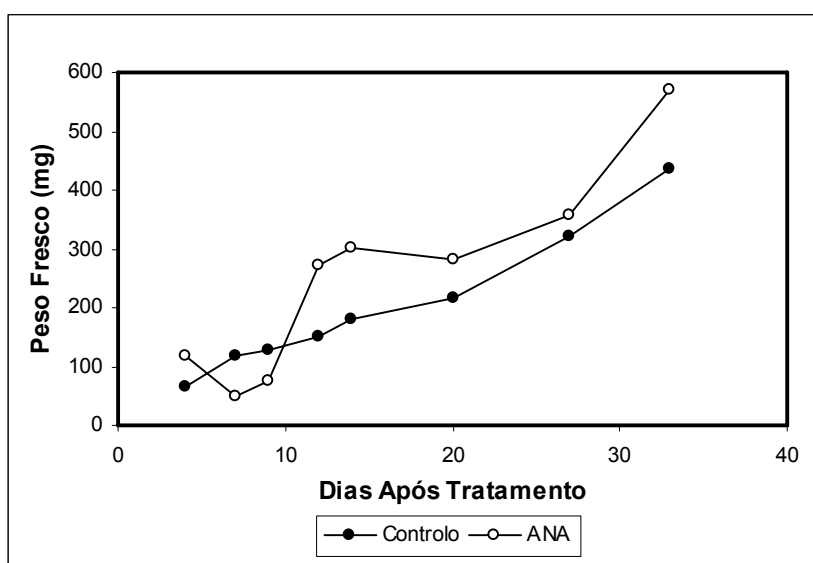


Figura 4.11 Evolução do peso fresco (mg) por flor F segundo os dias após o tratamento com ANA (20 mg/l). O tratamento realizou-se a 10 panículas nos estados 609-700 da escala BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do peso de 10 flores.

Por outro lado, tanto as flores FF como as flores F tratadas no campo apresentaram maior número de óvulos degenerados, isto é, com calose, que as respectivas flores controlo (Figura 4.12). De modo que, independentemente do estado da flor, o tratamento aumentou significativamente o número de óvulos degenerados. Para além disso, o número de óvulos com calose nas flores FF foi significativamente maior que nas flores F, com um valor médio de 9,4 frente a 7,2, respectivamente (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 – Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) sobre o número de óvulos degenerados (com calose) de flores FF e F, de panículas tratadas no estado 609-700 BBCH. Foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento para controlo. Cada valor é a média do número de óvulos degenerados de 32 flores. Letras diferentes na mesma linha ou na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

	Controlo	ANA	
	Nº de óvulos degenerados	Nº de óvulos degenerados	
FF			
Nº de óvulos degenerados	9,2	9,6	9,4 a
F			
Nº de óvulos degenerados	6,8	7,6	7,2 b
	8,0 a	8,6 b	

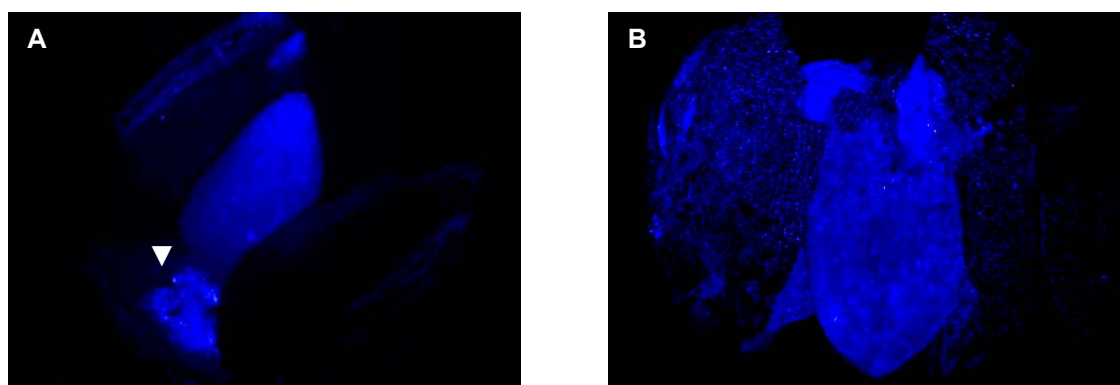


Figura 4.12 Fotografias de óvulo F com calose (▼) proveniente de uma flor de uma panícula tratada com ANA no estado 609-700 BBCH (A) e óvulo F sem calose de flor proveniente de uma panícula controlo no mesmo estado fenológico (B).

De tudo isto, podem-se retirar dois efeitos ligados à acção do ANA que embora sejam diferentes, encontram-se relacionados entre si. Por um lado e, como demonstram as Figuras 4.9 e 4.10 e o Quadro 4.2, a aplicação do ANA sobre os óvulos receptivos não fecundados detém o crescimento dos óvulos e das respectivas flores, impedindo assim o início da frutificação, provocando a queda de flores, o que reduz a percentagem de vingamento. Por outro lado, a aplicação do ANA sobre flores com algum óvulo fecundado (Figura 4.11), factor suficiente nesta espécie para que haja frutificação, não pára o crescimento desses óvulos, e portanto, do ovário, não havendo promoção da queda dessas flores, que acabam por originar frutos. No entanto, a aplicação do ANA é capaz de impedir a fecundação de outros óvulos menos desenvolvidos (equivalentes a FF) presentes nas flores F, reduzindo assim o número de sementes por fruto sem modificar a percentagem de vingamento da panícula, como se observa na Figura 4.12 e no Quadro 4.3.

Do mesmo modo, quando a aplicação do ANA (20 mg/l) foi realizada em estados de desenvolvimento mais precoces, como no estado 605 da escala BBCH, quando os óvulos pesavam aproximadamente 55,4 µg, o efeito foi redobrado. Em primeiro lugar, e de acordo com os resultados obtidos no ponto 4.2.1, reduziu-se significativamente a germinação dos grãos de pólen, de maneira que dois dias após o tratamento não se encontrou germinação em nenhum estigma de flores tratadas, enquanto que nas flores controlo foi encontrada germinação de grãos de pólen em 1,5 dos estigmas (Figura 4.13, 4.14 A e B).

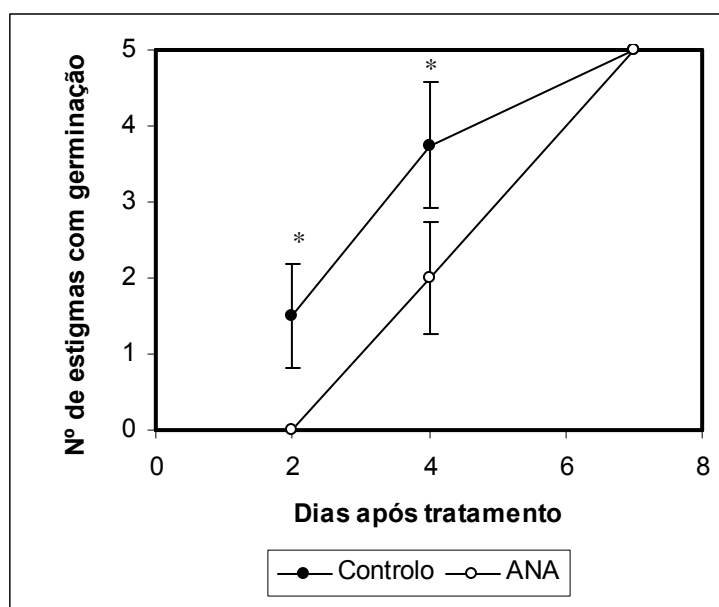


Figura 4.13 Evolução da germinação de grãos de pólen nos estigmas de flores de panículas tratadas com 20mg/l de ANA no estado fenológico 605 BBCH ao longo dos dias após tratamento. Foram deixadas panículas no mesmo estado de desenvolvimento sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do nº de estigmas com germinação de 8 flores. As barras verticais representam o erro padrão. * Indica diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

Não obstante, a eficácia do tratamento reduz-se ao longo do tempo e, aos quatro dias de tratamento já se encontrou germinação de grãos de pólen nos estigmas de flores tratadas. Apesar disso, o número de estigmas com germinação foi significativamente menor nas flores tratadas (1,7) que nas flores controlo (3,7) (Figura 4.13 e 4.14 C e D).

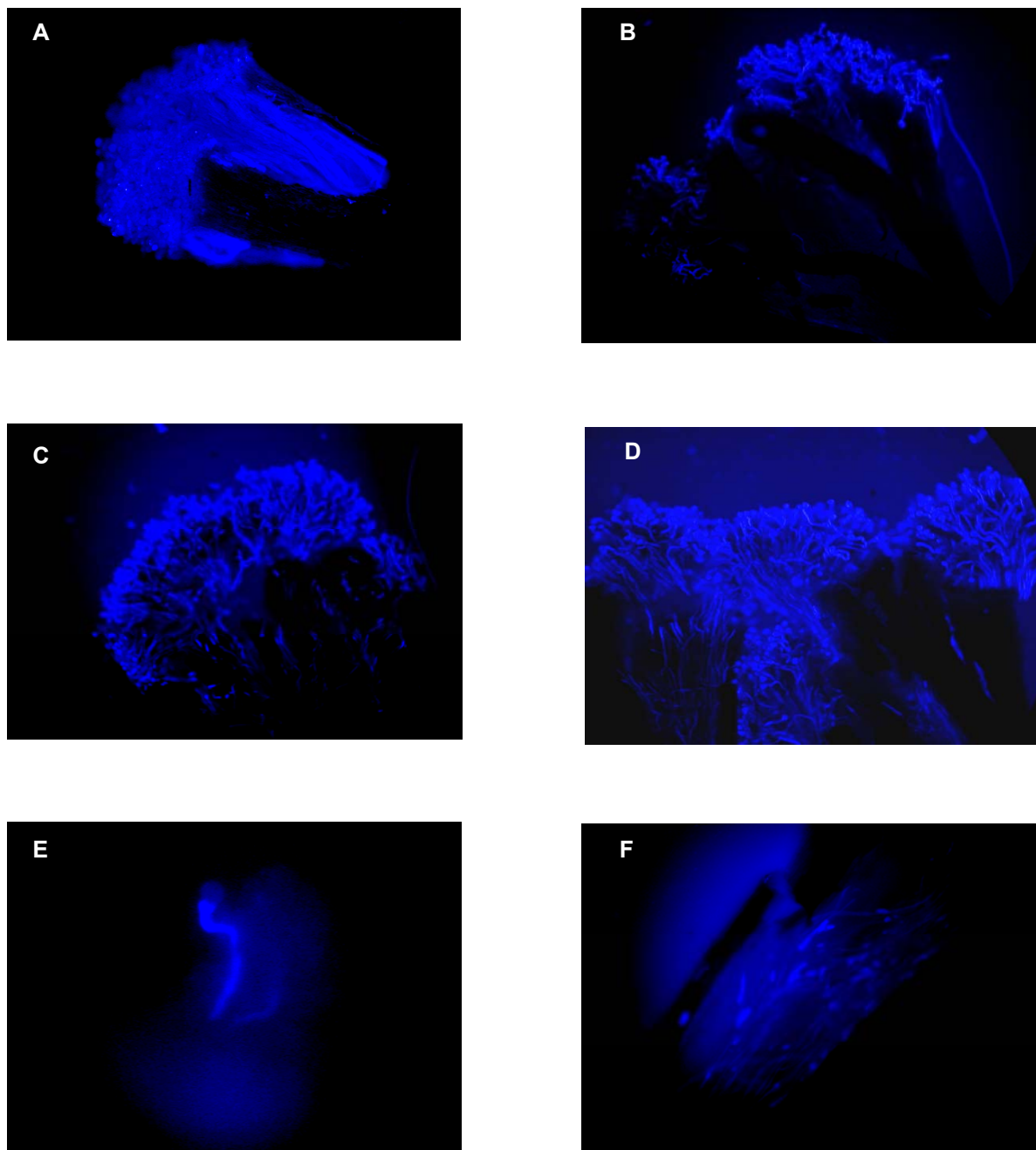


Figura 4.14 Comportamento de grãos de pólen e tubos polínicos no estigma e estilete de flores de nespereira em ântese. Estigma sem grãos de pólen germinados de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (A) e estigma com grãos de pólen germinados de uma flor no mesmo estado fenológico de uma panícula controlo (B), dois dias após o tratamento. Germinação no estigma de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (C) e controlo (D), quatro dias após o tratamento. Grão de pólen germinado no estigma de uma flor de uma panícula tratada no estado 605 BBCH com 20 mg/l de ANA (E) e tubos polínicos em desenvolvimento no estilete de uma flor de uma panícula controlo no mesmo estado fenológico (F) sete dias após o tratamento.

A eficácia do tratamento perdeu-se completamente aos 7 dias após o tratamento, data em que os 5 estigmas, tanto de flores tratadas como das flores controlo, apresentavam germinação de grãos de pólen e inclusive foram encontrados tubos polínicos em desenvolvimento ao longo do estilete (Figuras 4.13 e 4.14 E e D). Resulta interessante destacar que o tratamento não danificou as papilas estigmáticas nem o tecido transmissor do estigma, pois estes continuaram aptos a promover a germinação de grãos de pólen que não tinham sido afectados pelo tratamento.

Em segundo lugar, o tratamento também aumentou significativamente o número de óvulos degenerados (9,3) por flor relativamente às flores controlo (8,2) (Figura 4.15), o que indica a alta sensibilidade dos óvulos de flores abertas (receptivos mas não fecundados) ao tratamento com ANA (20 mg/l) pois esta substância consegue degenerar praticamente todos os óvulos da flor neste estado fenológico (Figura 4.16).

Estes resultados coincidem com os resultados observados anteriormente, pois o tratamento com ANA pode interromper a polinização e/ou fecundação de flores no estado 605 da escala BBCH. Neste caso, estar-se-á a alterar o mecanismo de vingamento, como se verá mais adiante.

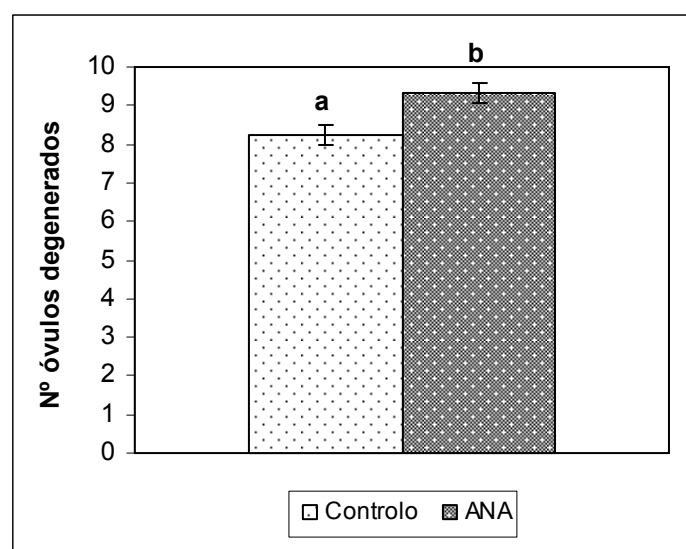


Figura 4.15 Efeito da aplicação do ANA (20 mg/l) sobre o número de óvulos degenerados (com calose) por flor em ântese, em flores de panículas tratadas no estado 605 BBCH, sendo que foram deixadas panículas no mesmo estado fenológico sem tratamento como controlo. Cada valor é a média do nº de óvulos degenerados de 36 flores. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

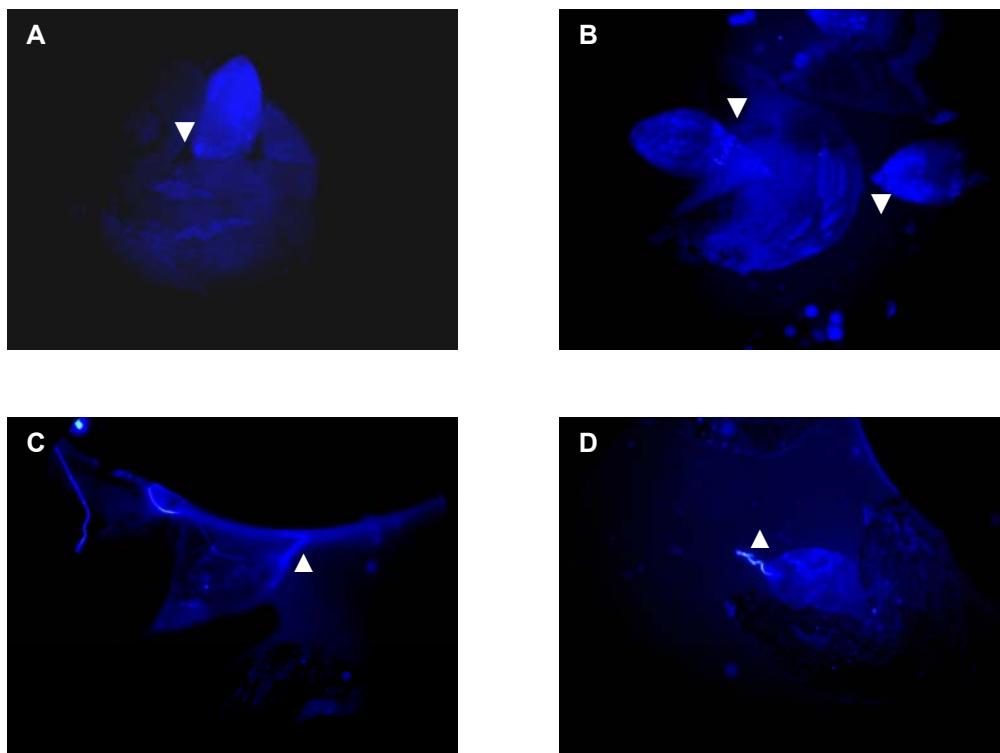


Figura 4.16 Fotografias de óvulos com calose (▼) de flores tratadas com ANA (20 mg/l) no estado 605 da escala BBCH (A e B) e óvulos fertilizados sem calose de flores controlo no mesmo estado fenológico, onde se pode ver o tubo polínico (▲) a entrar no micrópilo (C e D).

Quando o tratamento foi realizado em estados fenológicos mais avançados, designadamente nos estados 701, 703 e 704 da escala BBCH, os óvulos foram insensíveis à acção do ANA e, em nenhum caso se conseguiu deter o crescimento dos óvulos relativamente aos seus pesos iniciais, após 20 dias de cultura. Assim, o peso alcançado pelos óvulos de um mesmo estado fenológico, após 20 dias de cultura foi praticamente o mesmo, independentemente se foram tratados, *in vivo* ou *in vitro*, ou não foram tratados. O peso dos óvulos tratados no campo ou no meio de cultura no estado 701 da escala BBCH foi de 15,6 mg e 8,4 mg, respectivamente e o peso dos óvulos sem tratamento foi de 10,1 mg, enquanto que os óvulos tratados nos estados 703 e 704 da escala BBCH e, para os mesmos tratamentos, o peso foi de 69,5 mg, 76,8 mg e 68,1 mg e de 85,4 mg, 113,9 mg e 136,2 mg, respectivamente (Figura 4.17).

Contudo, ao comparar o peso dos óvulos nos diferentes estados fenológicos encontraram-se diferenças significativas, independentemente do tratamento realizado. O peso dos óvulos nos três tratamentos realizados, aumentou progressivamente com o estado de desenvolvimento com valores médios de 11,4 mg para o estado 701 BBCH até 71,5 mg e 111,83 mg para os estados fenológicos 703 e 704 BBCH, respectivamente, mostrando-se uma relação clara e directa entre o peso dos óvulos e o seu estado de desenvolvimento.

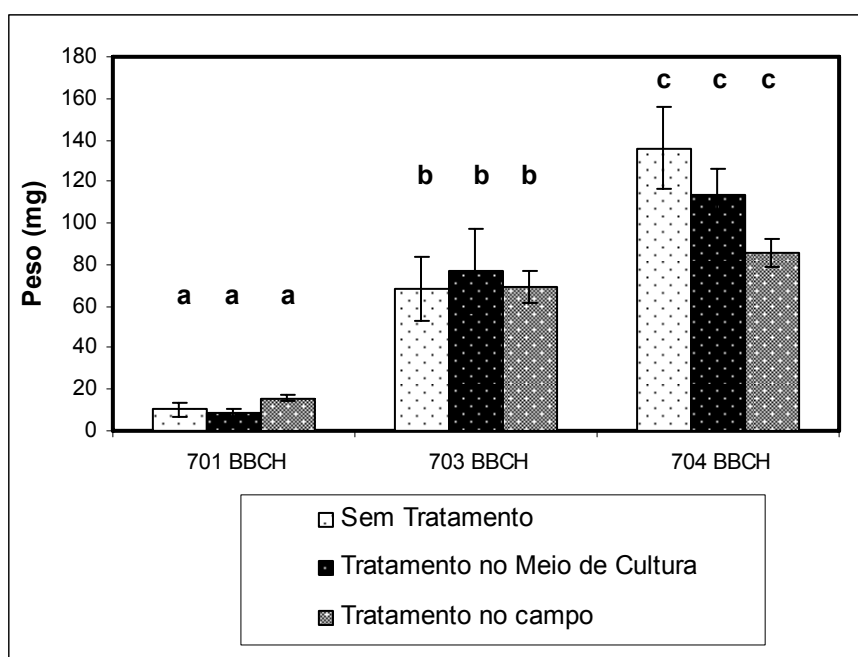


Figura 4.17 Peso de óvulos (mg) de frutos nos estados fenológicos 701, 703 e 704 da escala BBCH, após 20 dias de cultura. Os óvulos sem tratamento e tratamento no campo foram cultivados em MS e os óvulos tratados no meio de cultura foram cultivados em MS+ANA. O peso médio inicial dos óvulos foi de 3,3 mg, 60,5 mg e 81,8 mg para os estados fenológicos 701, 703 e 704 BBCH, respectivamente. Cada valor é o peso médio de 10 óvulos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) segundo o teste de Student-Newman-Keuls, correspondendo as barras verticais ao erro padrão.

Comparando os resultados obtidos até este momento, revela-se que a aplicação de 20 mg/l de ANA *in vitro* ou *in vivo*, em fases mais precoces (605 BBCH) ou mais avançadas (701, 703 e 704 BBCH) que o momento óptimo de sensibilidade determinado (609-700 BBCH), tem um efeito de monda máximo ou nulo, respectivamente, o que está relacionado tanto com a sensibilidade dos óvulos dos diferentes estados fenológicos como com a ação do ANA sobre a germinação dos grãos de pólen (Figuras 4.13, 4.15 e 4.17).

Do mesmo modo, a aplicação do ANA (20 mg/l) *in vivo* ou *in vivo+in vitro*, em estados de desenvolvimento mais avançados que 609-700 BBCH, aumentou significativamente o peso dos óvulos, após 7 dias de cultura, relativamente ao seu peso inicial (Quadro 4.4).

A dupla aplicação do ANA (*in vivo+in vitro*) a óvulos no estado 701 BBCH levou a maior aumento de peso dos óvulos (12,9 mg) (Quadro 4.4) relativamente aos óvulos cultivados que foram apenas tratados no campo (9,1 mg), embora não existam diferenças estatisticamente significativas. Não obstante, o duplo tratamento garantiu um aumento de peso estatisticamente significativo

relativamente ao peso inicial dos óvulos (3,8 mg). A mesma resposta foi obtida para óvulos tratados no estado 703 da escala BBCH (Quadro 4.4), sendo que neste caso os aumentos de peso foram ainda mais expressivos pois os óvulos tratados *in vivo* aumentaram o seu peso para 272,5 mg, enquanto que os óvulos tratados *in vivo+in vitro* registaram um aumento de peso para 470,5 mg, sendo este peso diferente significativamente do peso inicial dos óvulos, 67,2 mg.

Quadro 4.4 Peso de óvulos de flores tratadas *in vivo* nos estados fenológicos 505 e 508 da escala BBCH e de frutos tratados nos estados 701 e 703 da escala BBCH, cultivados durante 7 dias em MS (*in vivo*) e em MS+ANA (*in vivo+in vitro*). O tratamento no campo com 20 mg/l de ANA realizou-se 20 dias antes da preparação das culturas *in vitro*. Cada valor é a média de 5 óvulos. Letras diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

Estado Fenológico	Peso Inicial (μg)	Peso Final <i>in vivo</i> (μg)	Peso Final <i>in vivo+in vitro</i> (μg)
505 BBCH	54,5 a	153,2 \pm 3,1 b	146,9 \pm 9,4 b
508 BBCH	84,4 a	131,3 \pm 21,1 a	131,25 \pm 9,1 a
Estado Fenológico	Peso Inicial (mg)	Peso Final <i>in vivo</i> (mg)	Peso Final <i>in vivo+in vitro</i> (mg)
701 BBCH	3,8 \pm 0,20 a	9,1 \pm 1,69 ab	12,9 \pm 1,98 b
703 BBCH	67,2 \pm 12,1 a	272,5 \pm 46,7 ab	470,5 \pm 164,6 b

De acordo com o que foi observado, os momentos de plena ântese floral (605 BBCH) e de vingamento (609 BBCH) são altamente sensíveis à acção do ANA e os estados de desenvolvimento mais avançados a partir de 701 BBCH são insensíveis. No mesmo sentido, quando a aplicação do ANA se realizou em estados de desenvolvimento mais precoces (505 e 508 BBCH), não se conseguiu parar o crescimento dos óvulos relativamente ao seu peso inicial, e assim, após 7 dias de cultura, o peso dos óvulos tratados *in vivo* ou *in vivo+ in vitro* no estado 505 BBCH, foi de 153,2 mg e 146,9 mg, respectivamente, quando o seu peso inicial tinha sido de 54,5 mg. Entre os dois tratamentos realizados não foram encontradas diferenças significativas, conseguindo-se, em ambos os casos, um aumento significativo de peso, com uma média aproximada de 175%.

A resposta aos tratamentos dos óvulos provenientes de flores tratadas no estado 508 BBCH foi semelhante, embora neste caso, o aumento do peso tenha sido inferior (55,3%) e não tenha alcançado a significância estatística (Quadro 4.4).

É importante destacar a insensibilidade dos óvulos à acção do ANA em estados muito precoces ou muito avançados do desenvolvimento. Consequentemente, a eficácia do tratamento está, entre outros factores condicionada pelo estado de maturação dos óvulos.

Tendo em conta os resultados até agora obtidos e, sabendo que o ANA tem acção sobre a polinização e fecundação desta espécie, estudou-se a influência do tratamento sobre o vingamento das panículas nos estados fenológicos citados.

Em geral, a percentagem de vingamento não foi significativamente alterada, em nenhum dos pomares experimentais, quando o ANA foi aplicado em estados de desenvolvimento anteriores a 609 BBCH (Vingamento), com excepção para o estado fenológico 605 da escala BBCH.

Deste modo, a taxa de vingamento das panículas tratadas no estado 505 BBCH foi praticamente igual à taxa de vingamento das panículas controlo, embora fosse superior no pomar B, com 7,78% contra 5,92% no pomar A. Esta diferença de vingamento relativamente ao pomar também se estendeu às panículas controlo, pois a taxa de vingamento obtida por estas panículas foi de 7,51% no pomar B contra 5,09% no pomar A (Figura 4.18).

A aplicação do ANA a panículas no estado 605 da escala BBCH reduziu significativamente a taxa de vingamento até valores praticamente nulos, sendo de 1,7% no pomar A e de 0% no pomar B, pois nenhuma das panículas tratadas deu origem a fruto. As panículas tratadas no estado 609-700 BBCH obtiveram uma percentagem de vingamento (3,2%) significativamente inferior às panículas controlo (5,5%). Neste caso, a redução da percentagem de vingamento obtida através do tratamento não foi tão elevada como a obtida no estado 605 BBCH, ainda que tenha alcançado a significância estatística (Figura 4.18).

Tendo em conta que, o número médio de flores por panícula foi em média de 123,8 e, conhecendo as percentagens de vingamento das panículas tratadas nos diferentes estados fenológicos, o número final de frutos nas panículas controlo foi de 9,3 frutos, enquanto que o número de frutos das panículas tratadas nos estados fenológicos 505, 605 e 609-700 da escala BBCH, foi em média 9,6, 0 e 4 frutos, respectivamente no caso do pomar B. Estes valores confirmam o momento de aplicação do ANA recomendado por Agustí *et al.* (2000), pois ao tratar no estado 609-700 da escala BBCH, obtêm-se 4 frutos por panícula, permitindo que estes frutos tenham maior qualidade e sejam melhor aceites pelos consumidores.

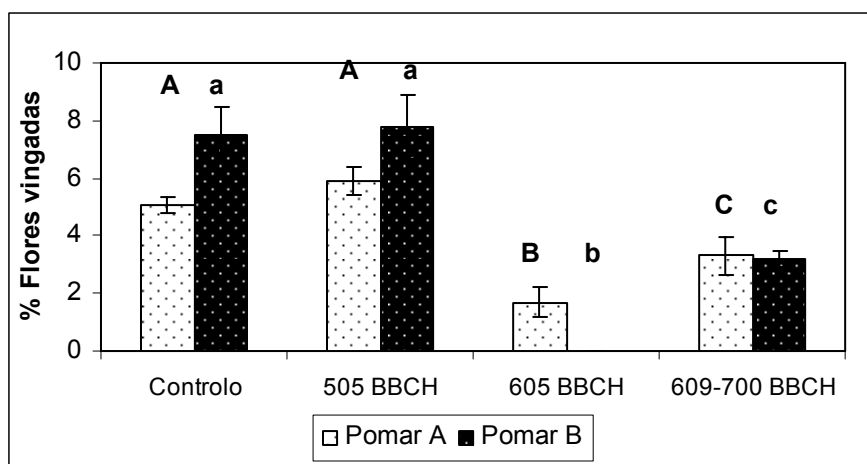


Figura 4.18 Efeito do tratamento com ANA (20mg/l) em diferentes estados fenológicos sobre a percentagem de flores vingadas. Cada valor é a média de 10 panículas. As barras verticais correspondem ao erro padrão. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) para os pomares A e B, respectivamente, segundo o teste de Student-Newman-Keuls. A avaliação realizou-se no estado fenológico 701 da escala BBCH, estado fenológico indicado para a monda manual.

Quando a aplicação do ANA (20 mg/l) foi realizada a panículas em estado fenológicos intermédios de desenvolvimento entre o estado 505 e 605 BBCH, a percentagem de vingamento reduziu-se significativamente relativamente ao controlo, mas os resultados variaram em função de se na panícula havia maior número de flores próximas do estado 505 ou do estado 605 da escala BBCH. Consequentemente, a percentagem de vingamento foi muito variável, com valores médios de 6% para panículas num estado fenológico mais próximo do 505 BBCH e até valores médios de 2% quando as panículas se encontravam num estado fenológico mais próximo de 605 BBCH (dados não apresentados).

Resumindo, estes resultados demonstram a relação existente entre o momento de aplicação do ANA e o efeito que este produz no vingamento desta espécie, pois a eficácia do tratamento sobre o mecanismo do vingamento é condicionada pelo estado fenológico da panícula, que marca a sua sensibilidade.

5. Discussão

A diminuição da competição entre frutos, como técnica eficaz para aumentar o tamanho final destes, é uma prática habitual na maioria das espécies frutícolas. Esta prática é conseguida eliminando directamente determinado número de frutos não desejados mediante a monda manual (Tous e Ferguson, 1996; Kvikliene *et al.* 2009) ou de forma indirecta, inibindo parcialmente a floração (González-Rossia *et al.*, 2006; 2007; Stern e Ben-Arie, 2009) ou impedindo a fecundação de algumas flores (Agustí *et al.*, 2000; Guak *et al.*, 2004).

A monda manual, apesar de ser muito selectiva e de fácil realização, supõe um elevado custo de mão de obra, o que faz com que cada vez mais, se substitua, total ou parcialmente, pela monda química, cuja eficácia depende, fundamentalmente, da biologia floral da espécie.

No caso da nespereira, evitar a fecundação de algumas flores mediante a monda química é uma técnica fácil e eficaz, uma vez que a floração desta espécie é abundante e escalonada, sendo as flores mais basais da panícula as primeiras a entrar em ântese (Rodríguez, 1983).

As substâncias mais utilizadas em Fruticultura para a monda química são as auxinas de síntese, as giberelinas e outras substâncias como o etefão, DNOC ou o sulfato de cobre embora estas duas últimas substâncias levem a resultados incertos (Mesejo *et al.*, 2006). Desde 1941, quando Burkholder descobriu o sucesso do ácido 1-naftalenoacético e do seu sal amida na monda de frutos de macieira que estas duas auxinas de síntese iniciaram uma nova era na monda química de frutos (Gautier, 1984). Estas hormonas de síntese são usadas com eficácia na monda de macieiras, pereiras, ameixeiras, pessegueiros e mais recentemente em nespereira.

A aplicação de ácido 1-naftalenoacético (ANA) mostrou-se eficaz para reduzir a percentagem de flores vingadas da nespereira (Agustí *et al.*, 2000; Razeto *et al.*, 2003; Cuevas *et al.*, 2004). Este efeito leva à redução do número de frutos que iniciam o seu desenvolvimento e, portanto, leva a uma monda indirecta destes, o que reduz significativamente os custos culturais desta espécie.

A época óptima de aplicação do ANA (2 frutos visíveis por panícula), estabelecida por Agustí *et al.* (2000), ressalta a importância que o número de flores vingadas tem na eficácia do tratamento. Na realidade, os autores determinam que quando o tratamento se realiza com dois frutos visíveis por panícula, o número de frutos colhidos na colheita são quatro, logo as flores fecundadas, visíveis ou não, não são afectadas pelo tratamento.

O mecanismo de acção desta substância não é conhecido, mas os nossos resultados mostram que o ANA em condições *in vitro* impede a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico, como foi anteriormente observado para outras espécies. Por exemplo, quando o ANA é aplicado em concentrações altas em pessegueiro, impede a germinação dos grãos de pólen (XiaoMin *et al.*, 2008), assim como acontece quando o ANA é aplicado em conjunto com etileno em oliveira (XiuJu *et al.*, 1998). O ANA provoca a degeneração dos grãos de pólen das cultivares 'Carolea' e 'Ascolana' (Gaetani e Diana, 1979). Para além disso, a aplicação desta substância após o início do desenvolvimento do tubo polínico, detém o crescimento deste como consequência da rotura da sua extremidade, de um modo similar ao que acontece com o uso de ácido indolacético (Kwan *et al.*, 1969) e sulfato de cobre (Mesejo *et al.*, 2006) em citrinos.

Foram realizados estudos semelhantes, embora com recurso a outras substâncias, em que se impediu a germinação de grãos de pólen de tomateiro com ácido indolacético (McLeod, 1975). Feinstein *et al.* (1975) impediu a germinação de grãos de pólen de tangerina (*Citrus reticulata*, cvs. 'Dancy' e 'Temple') com giberelinas e as pulverizações com DNOC (4,6-dinitroresol) a macieiras impedem a germinação dos grãos de pólen depositados no estigma (MacDaniels e Hildebrand, 1940) e inactivam os tubos polínicos em desenvolvimento no estilete (Hildebrand, 1944).

Nas condições *in vivo* do nosso ensaio, quando o ANA foi aplicado em plena ântese impediu temporariamente, durante os quatro dias seguintes ao tratamento, a germinação de grãos de pólen nos 5 estigmas das flores, confirmando os resultados *in vitro*. No entanto, aos sete dias após o tratamento, os grãos de pólen provenientes de flores que entretanto abriram e que não foram afectados pelo tratamento, conseguiram germinar e iniciar o crescimento do tubo polínico nos 5 estigmas e nos 5 estiletos das flores abertas, demonstrando-se assim o efeito directo sobre os grãos de pólen e não sobre os estigmas ou o tecido transmissor.

Estes resultados são compatíveis com o longo período de receptividade estigmática (10 dias) estabelecido para esta espécie (Carrera, 2009), ao contrário de outras espécies, como o damasqueiro (*Prunus armeniaca*) (Egea *et al.*, 1991) ou a pereira (*Pyrus communis*) (Sanzol *et al.*, 2003), nas quais o estigma deixa de estar receptivo a partir do quarto dia após a abertura da flor, o que pode limitar a taxa de vingamento destas espécies. Sendo assim, as baixas taxas de vingamento naturalmente obtidas pela nespereira não podem ser justificadas pela baixa receptividade estigmática mas sim por outros factores.

Contudo, os mecanismos que afectam a germinação do grão de pólen ou o crescimento do tubo polínico através do tratamento com ANA, continuam a não ser conhecidos com precisão. Enquanto alguns autores afirmam que se deve a uma alteração do ritmo dos impulsos do crescimento do tubo polínico ou a uma alteração da turgescência celular, o que modifica a resistência da membrana celular (Geitmann, 1997), outros autores acreditam que se deve a uma alteração do

metabolismo durante a formação da membrana celular (Stanley, 1964; Vasil, 1964) ou devido à rotura da membrana do tubo polínico (Kwan *et al.*, 1969; Mesejo *et al.*, 2006), como acontece nos nossos resultados.

O início da frutificação ocorre quando o tubo polínico atinge o óvulo, o que na nespereira acontece a partir da primeira semana após a ântese, estando praticamente completa entre a primeira e a segunda semana (Sanzol e Herrero, 2001). Este comportamento mostra que a nespereira tem uma fase progâmica curta quando comparada com outras espécies frutícolas, como o pessegueiro, em que a fecundação se verifica após três semanas da polinização (Herrero e Arbeloa, 1989; Arbeloa e Herrero, 1991).

No momento da ântese, a flor da nespereira encontra-se munida de proteínas, hidratos de carbono, lípidos e outras substâncias indispensáveis para a interacção inicial pólen-pistilo (Clarke *et al.*, 1979), embora antes da ântese, as papilas estigmáticas não se encontrem receptivas e o tecido transmissor não esteja completamente formado, o que é necessário para o correcto crescimento do tubo polínico até ao óvulo (Higashiyama e Hamamura, 2008). Isto é, a flor precisa de iniciar o seu desenvolvimento para induzir os factores que favorecem a passagem do tubo polínico através dos tecidos. Por este motivo, o ANA mostra-se ineficaz quando é aplicado em estados anteriores à ântese (505 BBCH), uma vez que nem os grãos de pólen nem o pistilo estão maduros, não estando por isso sensíveis ao tratamento. Contudo, isto acontece apenas quando se estuda a flor individualmente, mas dada a floração escalonada desta espécie, na panícula encontram-se flores nos diferentes estados fenológicos (entre 505 e 605 da escala BBCH), pelo que a eficácia do tratamento com o depende do maior ou menor número de flores sensíveis, isto é, mais próximas da ântese (605 BBCH). Por isso não é possível alterar a taxa de vingamento de panículas tratadas em pré-ântese (505 BBCH), como demonstram os nossos resultados, mas estes por sua vez confirmam que ANA não danifica o estigma nem o estilete, como já foi referido, uma vez que estas flores conseguem vingar mais tarde. A resposta é geral para todas as cultivares de nespereira, apesar das diferenças entre elas na morfologia e conteúdo de reservas dos grãos de pólen (Germana *et al.*, 2006).

O efeito directo do ANA sobre os óvulos e a repercussão que este tem sobre o vingamento é mais difícil de determinar, uma vez que a biologia reprodutiva da nespereira é praticamente desconhecida. Anatomicamente, a flor de nespereira é composta por 5 estiletos livres inseridos num hipanto (Rohrer *et al.*, 1994), estes concentram-se na base até à cavidade ovárica, mantendo os canais estilares separados faltando o *compitum* (Carrera, 2009). O *compitum* é um tecido transmissor, localizado na zona intercarpelar das angiospérmicas sincárpicas que permite a passagem dos tubos polínicos entre carpelos (Carr e Carr, 1961; Armbruster *et al.*, 2002). A ausência do *compitum* influencia directamente o vingamento final (Sheffield *et al.*, 2005) pois tem efeitos directos sobre a distribuição das sementes e sobre a diminuição da competição gametofítica destas (Williams *et al.*, 1993). Para além disso, apresenta células de transferência no tecido transmissor do estilete e nos lóculos que, em conjunto com as células anquilosadas dos tegumentos internos e do

nucelo do óvulo, podem dificultar a fecundação (Carrera, 2009). Isto poderia explicar a baixa taxa de vingamento e o baixo número de sementes por fruto que esta espécie apresenta de modo natural.

A esterilidade feminina, causada pela degeneração antecipada de óvulos, parece estar ligada a uma falta de translocação de nutrientes que provoca uma perda de reservas (amido) nos óvulos uma semana depois da ântese e a degeneração do saco embrionário que é precedida pela acumulação de calose na calaza do nucelo. A calose foi associada à degeneração do óvulo e à sua falta de capacidade para ser fecundado (Anvari e Stösser, 1978; Martínez-Tellez e Crossa Raynaud, 1982; Arbeloa e Herrero, 1991; Dittman e Stösser, 1999; Gonkiewicz e Nosal, 2006), em várias espécies, nomeadamente do género *Prunus*. No entanto, para outros autores, a presença de calose na calaza do óvulo é essencial para que se dê a fecundação dos óvulos correctamente (Williams, 1984; Reinhardt, 2008) ou pode dever-se a factores externos, como dano do tecido ou temperaturas adversas (Sedgley, 1982). No nosso estudo assume-se que a presença de calose na calaza do nucelo do óvulo é sinal de degeneração por se tratar de uma espécie da família das Rosaceae.

Neste estudo verificou-se que, o aumento do número de óvulos degenerados detectados nas flores tratadas no momento de ântese (605 BBCH) e no momento do vingamento (609-700 BBCH) se deve à acção do ANA. Apesar do elevado número de óvulos degenerados que as flores apresentam de forma natural, devido aos problemas de fecundação ligados à própria biologia reprodutiva da espécie, foi possível verificar diferenças significativas no número de óvulos degenerados das flores tratadas e das flores controlo para ambos os estados fenológicos. Por outro lado, a capacidade ou incapacidade de germinação dos grãos de pólen e de crescimento do tubo polínico são processos importantes no sucesso reprodutivo uma vez que podem interferir com a duração da viabilidade dos óvulos (Egea e Burgos, 1992; González *et al.*, 1995; Sanzol e Herrero, 2001; Sanzol *et al.*, 2003).

Na nespereira foram determinados dois períodos possíveis de crescimento da flor. O primeiro período, com início entre a primeira e a segunda semana após a ântese, em que as flores polinizadas e as flores virgens se desenvolvem da mesma maneira e o segundo período em que a partir da sétima semana, há um crescimento rápido das células da flor (Carrera, 2009). Neste momento dá-se a separação de dois grupos de flores, as que crescem e as que detêm o seu crescimento em função de terem sido ou não fecundadas, e que no nosso trabalho se identificam como F e FF respectivamente (como foi definido no ponto 3.5.1 desta dissertação). Esta distinção vem associada a uma alteração morfológica externa, que é o fecho das sépalas da flor fecundada ou F. Neste estado, observa-se a existência de flores apenas com 3 ou 4 óvulos fecundados, o que prova ser necessária a fecundação de poucos óvulos para que haja frutificação (Carrera, 2009).

Os nossos resultados demonstram que as flores FF são sensíveis ao tratamento com ANA, uma vez que apresentam menor peso que as flores controlo, sendo esta diminuição de peso consequência de um maior número de óvulos degenerados, que detêm o seu crescimento por acção do ANA, e nesta fase de desenvolvimento os óvulos sobreviventes ao tratamento não constituem capacidade sumidouro suficiente para garantir o desenvolvimento do fruto ou que não se encontram fecundados. O efeito sobre os óvulos de flores FF é independente da sua aplicação ser feita *in vitro* ou *in vivo*, pois os óvulos cultivados *in vitro*, num meio de cultura com ANA não apresentam qualquer aumento de peso, parando o seu crescimento.

De acordo com o que foi referido anteriormente, os óvulos não fecundados ou que foram fecundados recentemente são sensíveis ao tratamento com ANA, o que provoca a sua degeneração. Pelo contrário, os óvulos fecundados e em desenvolvimento são insensíveis. Nas flores FF a probabilidade de encontrar óvulos não fecundados é muito alta, enquanto que nas flores F é muito baixa, pelo que o tratamento a flores FF impede o desenvolvimento para fruto, enquanto que nas flores F reduz o número de sementes no fruto a que dará origem. Ao fazer a cultura *in vitro* dos óvulos provenientes de flores F, percebemos que alguns destes óvulos ainda são sensíveis ao tratamento com ANA porque não se encontram fecundados, estando num estado menos desenvolvido. Para confirmar estes resultados, temos o facto de nestas flores tratadas terem sido encontrados maior número de óvulos degenerados que nas flores controlo. As sementes dos frutos tratados atingem um maior peso individual, quando comparadas com as sementes de frutos controlo, devido a uma redução da competição entre sementes, o que coincide com os resultados obtidos por Agustí *et al.* (2000) quando realizou o tratamento à árvore completa.

Os resultados obtidos neste estudo relativamente à sensibilidade dos óvulos ao tratamento com ANA estão de acordo com os resultados obtidos por Okamoto e Omori (1991) em uva, que referem que os tratamentos com ANA inibem o desenvolvimento dos óvulos, assim como os resultados encontrados para ameixeira por Gonkiewicz e Nosal (2006). Como foi referido por Feinstein *et al.* (1975), o ANA pode provocar o aborto de sementes de tangerinas, ou por Monselise (1977) para os citrinos em geral. Assim como Luckwill (1953) conclui que o ANA provoca o aborto de sementes de macieira. Agustí *et al.* (2000) referiu no seu estudo sobre a monda de nespereira com ANA que uma das vias pelas quais o ANA actuava era a absorção pelos óvulos, sendo esta explicação reforçada pelo facto dos frutos tratados terem menor número de sementes que os frutos de árvores controlo ou de árvores mondadas manualmente. No entanto, Cuevas *et al.* (2004) afirmam que durante alguns anos encontraram um pequeno, embora significativo aumento do número e tamanho de sementes nos frutos remanescentes, sugerindo que o ANA monda com base na capacidade sumidouro dos frutos nos primeiros estados de desenvolvimento, o que é determinado pelo conteúdo de sementes dos frutos.

Nos estados mais avançados de desenvolvimento (701 a 704 da escala BBCH), as sementes já são insensíveis à acção do ANA, pois, ao contrário do que acontece em estados anteriores, o ANA estimula o crescimento das sementes, tanto *in vitro* como *in vivo*, como mostram os nossos resultados. A insensibilidade dos frutos em estados mais avançados ao tratamento com ANA, que agora sabemos tratar-se da insensibilidade dos óvulos ao tratamento já tinha sido discutida por Ateyyeh e Qrunflesh (1997) que ao realizar o tratamento com ANA após a floração, quando 75% dos frutos se apresentavam vingados não obteve diferenças no número de frutos relativamente às panículas controlo não mondadas.

Por outro lado, percebemos que quando se aplica o ANA em estados mais avançados, principalmente 703 BBCH, aumentamos o peso dos óvulos. O tratamento neste estado tinha sido estudado por Amorós *et al.* (2004), que perceberam que ao realizar o tratamento no estado 703 BBCH em panículas anteriormente mondadas, aumentava o tamanho final do fruto porque esta auxina estimula o crescimento das células, pois nesta altura já não há divisão celular (Blumenfeld, 1980). Como foi provado para outras auxinas sintéticas, estas podem promover o crescimento do fruto ao promover o efeito sink dos frutos, permitindo que os fotoassimilados sejam translocados para os frutos em crescimento, aumentando a acumulação de hidratos de carbono (Ortolá *et al.*, 1997; Guardiola e García-Luis, 1998; Agustí *et al.*, 1995; 2002). Com o mesmo objectivo de aumentar o tamanho final dos frutos, pode também recorrer-se à aplicação de 2,4 DP (Agustí *et al.*, 2003).

Esta hormona não tem efeito sobre os óvulos imaturos (505-508 BBCH), pois estes após o tratamento *in vivo* foram cultivados *in vitro* com ANA e mesmo assim não detiveram o seu crescimento quando comparados com os óvulos tratados apenas *in vivo*, o que indica que a sensibilidade dos órgãos à acção gametocida desta auxina é limitada a um curto período de tempo da sua fase progâmica.

Perante isto, os nossos resultados demonstram que a acção directa do ANA sobre os óvulos para impedir o seu crescimento encontra-se limitada a etapas muito precoces do desenvolvimento dos mesmos, isto é, quando estão receptivos mas não fecundados ou no início da sua fecundação. Sendo por isto que, independentemente se o tratamento se realiza *in vitro* ou *in vivo*, o ANA consegue deter o crescimento dos óvulos, impedindo o vingamento das flores ou diminuindo o número de sementes por fruto. Portanto, as flores com óvulos maduros mas jovens aquando do tratamento, têm os seus óvulos mais susceptíveis a degenerar, logo a resposta ao tratamento com ANA depende, entre outras coisas, do estado de desenvolvimento das flores e do estado de maturação dos óvulos, isto é, quando estes não são ainda sumidouros activos. O efeito contrário registado para os óvulos fecundados em período de rápido crescimento pode estar associado com a forte capacidade de sumidouro dos mesmos.

O facto de que o ANA actua como um ovulicida, causando a morte dos óvulos, e que os estados mais vulneráveis sejam a plena ântese (605 BBCH) e o vingamento (609-700 BBCH), explica os resultados incertos que foram obtidos em algumas situações, uma vez que numa amostragem de flores do mesmo estado fenológico, a proporção de óvulos sensíveis pode ser muito variável. No entanto, a determinação dos estados fenológicos mais sensíveis permite a aplicação racional do ANA e a obtenção de maior eficácia de monda.

As dificuldades de interpretação encontradas em alguns casos estão ligadas aos problemas de amostragem próprios da falta do conhecimento exacto da biologia reprodutiva desta espécie, deixando abertas perguntas relativas a possíveis questões de autoincompatibilidade.

Finalmente, ao analisar a percentagem de vingamento consoante o estado fenológico em que as panículas foram tratadas chegamos à conclusão que se tratarmos nos estados 505 e 508 BBCH ou mais tarde a partir do estado 701-704 da escala BBCH não obteremos qualquer efeito porque nos primeiros estados não afectamos nem a germinação nem o desenvolvimento do tubo polínico assim como os óvulos não estão susceptíveis ao tratamento. Por outro lado como foi provado *in vitro*, ao tratar em estados fenológicos mais avançados também se perde o efeito porque os óvulos são insensíveis. No entanto, se o tratamento for realizado antes do momento indicado, quando a panícula se encontra no estado 605 BBCH, podemos afectar de forma irrecuperável o vingamento da panícula pois a germinação dos grãos de pólen e desenvolvimento dos tubos polínicos serão afectados assim como o desenvolvimento dos óvulos, tornando inviável o tratamento neste estado sob o ponto de vista comercial.

Sendo assim, o momento óptimo para a realização do tratamento é quando a panícula está no estado 609-700 BBCH, isto é quando existem 2 frutos visíveis porque neste momento não afectamos a germinação nem o desenvolvimento do tubo polínico, nem todos os óvulos da flor correndo o risco de ter vingamento nulo, afectamos sim as flores que não se encontram vingadas, impedindo o desenvolvimento dos seus óvulos.

6. Conclusão

A monda de frutos de nespereira torna-se indispensável para a comercialização dos mesmos num mercado de consumo cada vez mais exigente, uma vez que sem recorrer a esta técnica, os frutos de nespereira têm calibres inferiores aos exigidos comercialmente. A monda deve ser química porque os custos e a disponibilidade de mão-de-obra para uma tarefa especializada como a monda manual são cada vez mais factores escassos e impeditivos de uma produção frutícola rentável.

Sendo assim, no decorrer deste estudo foram avaliados os mecanismos de acção do ácido 1-naftalenoacético, a uma concentração de 20 mg/l, na monda de nespereira em dois pomares, sendo que os resultados obtidos nestes dois pomares relativamente às taxas de vingamento são concordantes, ressaltando a consistência dos nossos resultados. Com este trabalho chegámos às seguintes conclusões:

1. A aplicação do ANA no momento da ântese, estados 605-607 da escala BBCH, impede a germinação do grão de pólen e/ou o crescimento do tubo polínico e/ou o desenvolvimento dos óvulos.
2. Nos estados anteriores 505-509 da escala BBCH (flores fechadas ou iniciando a ântese), e posteriores, 701-704 da escala BBCH (fruto em desenvolvimento), a aplicação do ANA resulta ineficaz.
3. A época de aplicação óptima deste tratamento coincide com o estado 609-700 da escala BBCH (vingamento do fruto), uma vez que impede a fecundação e/ou o desenvolvimento inicial do embrião de algumas flores, conseguindo-se assim diminuir a taxa de vingamento.

7. Referências Bibliográficas

Agustí, M., Elotmani, M., Aznar, M., Juan, M. e Almela, V., 1995. Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid on clementine early fruitlet development and on fruit size at maturity. *Journal of Horticultural Science of Biotechnology* 70: 955–962.

Agustí, M., Juan M., Almela, V. e Gariglio, N. 2000. Loquat fruit size is increased through the thinning effect of naphthaleneacetic acid. *Plant Growth Regulation* 31: 167-171.

Agustí, M., Zaragoza, S., Iglesias, D.J., Almela, V., Primo-Millo, E. e Talon, M., 2002. The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regulation* 36: 141–147.

Agustí, M., Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V. Martínez-Fuentes, A. e Mesejo, C., 2003. Effect of the synthetic auxina 2,4-DP on fruit development of loquat. *Plant Growth Regulation* 41: 129-132.

Agustí, M., Gariglio, N., Juan, M., Almela, V., Mesejo, C. e Martínez-Fuentes, A., 2005 Effect of branch scoring on fruit development of loquat. *Journal Horticultural Science of Biotechnology* 80: 370-374.

Agustí, M., Reig, C. e Undurraga, P. 2006. El cultivo del níspero japonés. Gráficas Alcoy, Alcoy, Espanha, pp 305.

Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M.T., Botella, M.A.. e Serrano, M. 2003 Physico-Chemical and Physiological changes during fruits development and ripening of five loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars. *Food Science and Technology International* 9: 43-51.

Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M.T., Botella, M.A., Almansa, M.S. e Serrano, M. 2004 Role of naphthalene acetic acid and phenothiol treatments on increasing fruit size and advancing fruit maturity in loquat. *Scientia Horticulturae* 101: 387-398.

Anvari, S.F. e Stösser, R. 1978 New Fluorescence-microscopic method for the determination of the viability of ovules in *Prunus*. *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding* 81 (4): 333-336.

Arbeloa, A. e Herrero, M. 1991.Development of the ovule structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] *New Phytologist*. Aug. 1991 v.118 (4): 527-533.

- Armbruster, W. S., Debevec, E. M. e Wilson, M. F. 2002.** Evolution of syncarpy in angiosperms: theoretical and phylogenetic analyses of the effects of carpel fusion on offspring quantity and quality. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 657–672.
- Ateyyeh, A. e Qrunfleh, M.M. 1997.** Studies on the Loquat, *Eriobotrya japonica* Lindl., cv. 'Tanaka'. II. Effect of naphthaleneacetic acid on fruit set, growth and development, and quality. *Dirasat. Agricultural Sciences* 24 (2), 217-223.
- Ateyyeh, A. e Qrunfleh, M.M. 1998.** Studies on the Loquat, *Eriobotrya japonica* Lindl., cv. 'Tanaka'. I. Vegetative and reproductive growth in the Jordan Valley. *Dirasat. Agricultural Sciences* 25: 55-63.
- Azcón-Biento, J. e Talón, M. 2000** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universitat de Barcelona. Barcelona pp. 305-323.
- Batjer, L.P. e Thomson, B.J. 1962.** Effect of 1-naphthyl N-methylcarbamate (Sevin) on thinning apples. *Proc. American Society for Horticultural Science* 77: 1-8.
- Batjer, L.P. e Billingsley, H.D. 1964.** Apple thinning with chemical sprays. *Washington State Expt. Sta. Bul.* 651.
- Black, B.L., Petracek, P.D. e Bukovac, M.J. 1995.** The effect of temperature on uptake of NAA by Redchief 'Delicious' apple leaves. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 120: 441-445.
- Blumenfeld, A. 1980** Fruit growth of loquat. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 105: 747-750.
- Brewbaker, J.L. e Kwack, B.H. 1963.** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50: 859-865.
- Buban, T. e Lakatos, T. 1997.** Benzyladenine for treating trees of hard to thin apple cultivars. *Acta Horticulturae* 463: 509- 515.
- Burkholder, P.R. 1941.** Some experiments with growth curvatures and growth substances. *American Journal of Botany* 28 (10): 911-921.
- Caballero, P., De Miguel, M.D. e Juliá, J.F. 1992.** *Costes y Precios en Horticultura*. Mundi Prensa, Madrid. 462pp.

- Caballero, P. e Fernández, M. A. 2003.** Loquat, production and market. Proc. First International Symposium on Loquat. Options Mediterranéennes 58:11-20
- Calabrese, F. 1993.** Frutticoltura tropicale e subtropicale II. Edagricole Bologna, Italia. 472pp.
- Calabrese, F. 2006** Origen de la especie. Em: El cultivo del níspero japonés. M. Agustí, C. Reig e P. Undurraga (Eds.). Gráficas Alcoy, Alcoy, Espanha, pp 17-26.
- Carimi F., De Pasquale F. e Puglia AM. 1998.** *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L. and their detection based on RFLP analysis. Plant Breeding 117: 261-266.
- Carr, S. G. M., e Carr, D.J. 1961.** The functional significance of syncarpy. Phytomorphology 11: 249–256.
- Carrera, L. 2009.** Biología reproductiva del níspero japonés [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]. Tese Doctoral, Universidad de Valladolid, 170 pp.
- Carrera, L. Sanzol, J., Herrero, M. e Hormaza, J.I. 2009.** Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S-RNases*) in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) (Rosaceae, Pyrinae). Molecular Breeding 23: 539-551.
- Carrera, M. 1990.** Ensayo de selecciones clonales de Membrillero como patrones de Peral. Revista de Fruticultura 35: 3-7.
- Chacin, K., Hamazu, H., Kurooka, H e Iwata, T. 1990.** Physiological changes of loquat fruit after harvest. XXIII International Horticultural Congress, Abstract 2. P3350
- Chen, J.Y., Zhang, L.M., Chen Y.T., Xu, X.D., Zhang, Z.H. e Lu, X.M. 2007.** Loquat Polen Morphology. Proc. Second International Symposium on Loquat 187-191.
- Clarke, A., Gleeson, P., Harrison, S. e Knox, R. B. 1979.** Pollen–stigma interactions: Identification and characterization of surface components with recognition potential. Proceedings of the National Academy of Sciences. United States of America 76: 3358-3362.
- Cuevas, J., Hueso, J.J. e Puertas, M. 2003a.** Pollination requirements of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.), cv. 'Algerie'. Fruits-Paris 58: 157-165.
- Cuevas, J., Salvador-Sola, F.J., Gavilán, J., Lorente, N., Hueso, J.J. e González-Padierna, C.M. 2003b.** Loquat fruit sink strength and growth pattern. Scientia Horticulturae 98: 131-137.

Cuevas, J., Moreno, M., Esteban, A., Martínez, A. e Hueso, J.J. 2004. Chemical fruit thinning in loquat with NAAm: dosage, timing and wetting agent effects. *Plant Growth Regulation* 43, 145-151.

Dennis, F.G. Jr. 2000. The history of thinning. *Plant Growth Regulation* 31:1-16.

Ding, C.K. e Zhang H.Z. 1988 Effects of hormones on growth and development of loquat fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 15: 148-153.

Dittmann, K. e Stosser, R. 1999. Development of ovules in relation to premature fruit drop in *Prunus*-species. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik*, 73 (3-4): 86-98.

Egea, J., Burgos, L., García, J.E. e Egea, L. 1991. Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. *Journal of Horticultural Science* 66 (1): 19-25.

Egea, J. e Burgos, L. 1992. Effective pollination period as related to stigma receptivity in apricot. *Scientia Horticulturae* 52 (1-2): 77-83.

Eti, S., Kaşka, N., Kurnaz, Ş. e Kilavuz, 1990. The relationships among pollen production, pollen viability rate and pollen germination ability and fruit set in some loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) varieties (in Turkish with English summary). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 14: 421-430.

Fatta del Bosco, G. 1961. Indagini sull'epoca di differenziazione delle gemme nel nespolo del giapponese. *Rivista dell'Ortoflorofrutticoltura Italiana* Vol. XLV. N. 2: 104-118.

Fatta del Bosco, G. e Fenech, L. 1984. First results of a trial with almond rootstocks on virgin soil and soil affected with soil sickness. *Options Mediterraneennes* 2: 75-83.

Feinstein, B., Monselise, S.P. e Goren, R. 1975. Studies on the reduction of seed number in mandarins. *HortScience* 10(4): 385-386.

Fideghelli, C. 1990. Protected cultivation of tree fruits in Italy. *Chronica Horticulturae* 30 (1): 5-6.

Furukawa, Y., Kataoka, T., Shimomura, M., 1990. Productivity of high density peach orchard using of free rootstock (*Prunus persica* Thunb.). *Proceedings of XXIII International Horticultural Congress*, 4169 Firenze, Italy.

Gabinete de Planeamento e Políticas 2006. Anuário Vegetal. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Gaetani, F.R. e Diana, G. 1979. Observations on the *in vitro* germinability of pollen from two olive cultivars. *Annali dell'Intituto Sperimentale per l'Olivicoltura* 6: 73-80.

Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V. e Agustí, M. 2002. El níspero japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto. *Sèrie Divulgació Tècnica n°52*. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana. 61pp.

Gautier, M. 1984. L'éclaircissage du pommier. *L'arboriculture Fruitière*, 362: 33-41.

Geitmann, A. 1997. Growth and formation of the cell wall in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrid*. Hänsel-Hohenhausen, egelsbach Frankfurt Washington.

Germana, M., Chiancone, B., Guarda, N.L. Testillano, P.S. e Risueño, M.C. 2006. Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through anther culture. *Plant Science* 171: 718-725.

Gisbert, A.D., Besoain, X., Llácer, G. e Badenes, M.L. 2006 Protección del cultivo II: Enfermedades. Em: El cultivo del níspero japonés. M. Agustí, C. Reig e P. Undurraga (Eds.). Gráficas Alcoy, Alcoy, Espanha, pp 227-250.

Gonkiewicz, A. e Nosal, K. 2006. Anatomical changes in plum fruit *Prunus domestica* L. after fruit thinning using potassium salt of alphanaphtaleneacetic acid. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9(4), #50

González, M. V., Coque, M. e Herrero, M. 1994 Pollinator selection in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Horticultural Science* 69:697-702.

González, M.V., Coque, M. e Herrero, M. 1995. Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in kiwifruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120 (2): 199-202.

González-Rossia, D., Juan, M., Reig, C. e Agustí, M. 2006. The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.) *Scientia Horticulturae* 110: 319-323.

González-Rossia, D., Reig, C., Juan, M., e Agustí, M. 2007. Horticultural factors regulating effectiveness of GA₃ inhibiting flowering in peaches and nectarines (*Prunus persica* L. Batsch.) *Scientia Horticulturae* 111: 352-357.

Goubran, F.H. e Zeftawi, B.M. 1986 Induction of seedless loquat. *Acta Horticulturae* 179: 381-384.

- Greene, D.W. e Bukovac, M.J. 1972.** Penetration of naphthaleneacetic acid into pear (*Pyrus communis* L.) leaves. *Plant and Cell Physiology* 13: 321-330.
- Guak, S., Beulah, M. e Looney, N.E. 2004.** Auxinic blossom thinners (MCPB-ethyl and NAA) inhibit return flowering on Fuji/M26 apple trees. *Proc. Ninth Int. Symp. Plant Bioregulators in Fruit Production* 653: 87-91.
- Guardiola, J.L. e Garcia-Luis, A. 1998.** Thinning effects on citrus yield and fruit size. *Acta horticulturae* 463:463-473.
- Herrero, M., e Dickinson, H.G. 1980.** Ultrastructural and physiological differences between buds and mature flowers of *Petunia hybrida* prior to and the following pollination. *Planta* 148: 138-145.
- Herrero, M. e Dickinson, H.G. 1981.** Pollen-tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* 47: 365-383.
- Herrero, M. e Arbeloa, A. 1989.** Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany*. 76: 1441-1447.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. e Barber, J. 1975.** The stigma surface in incompatibility responses. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 188: 293-303.
- Heslop-Harrison, Y. 2000.** Control gates and microecology. The pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany* 85: 5-13.
- Higashiyama, T. e Hamamura, Y. 2008.** Gametophytic pollen tube guidance. *Sexual Plant Reproduction* 21: 17-26.
- Hildebrand, E.M. 1944.** Mature peach fruits affected by leaf curl. *Phytopathology* 34 (3): 345-347.
- Hirai, M. 1980.** Sugar accumulation and development in loquat fruit. *Journal for the Japanese Society for Horticultural Science* 49: 347-353.
- Hueso, J., Escobosa, J., Alonso, F., González, M. e Cuevas, J. 2005** Aclareo químico en níspero japonés cv. 'Algerie' con ANA y sus derivados. V Congresso Ibérico de Ciência Hortícolas Volume 2: 156-161
- Janick, J. e Paul, R.E. 2008** The encyclopedia of fruits e nuts CABI 954pp.

- Kan, B.M., Shahid, M. e Chaudhry, M.J. 1986.** Effect of honey bee pollination on the fruit setting and yield of loquat. *Pakistan Journal of Forestry* 36: 73-77
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B. e Nasrallah, M.E. 1994.** Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen-tube growth in *Arabidopsis*. *Development* 120: 3405-3418
- Karadeniz, K. 2002.** Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) growing in Turkey. First International Symposium on loquat. 11st-13th April. Valencia (Spain). *Options Mediterraneennes*: 27-28.
- Kilavuz, M. e Eti, S. 1993.** The effects of flower thinning by hand, NAA and NAAm on the fruit set, growth rate and size of the fruits of some loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) varieties. *Doga* (in Turkish with English summary). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 17, 537-550.
- Kvikliene, N., Kviklys, D., Uselis, N. e Lanausakas, J. 2009.** Apple tree 'Alva' flower and fruitlet manual thinning. *Sodininkyste ir Darzininkyste*. 28(1): 37-42.
- Kwan, S.C., Hamson, A.R. e Campbell, W.F. 1969.** The effects of different chemicals on pollen germination and tube growth in *Allium cepa* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 94: 561-563.
- Li, N.Y. 1982.** Observation on differentiation of flower bud in loquat. *China Fruits* 3: 12-16.
- Lin, S., Sharpe R.H. e Janick, J. 1999** Loquat: Botany and Horticulture. *Horticultural Reviews* 23: 233-276.
- Lin, S. 2007** World Loquat Production and Research with special Reference to China. *Acta Horticulturae* 750: 37-43.
- Lin, S., Huang, X., Cuevas, J. e Janick, J. 2007** Loquat: An ancient Fruit Crop with a Promising Future. *Chronica Horticulturae* 47(2): 12:15
- Linskens, H.F. e Esser, K. 1957.** Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche in Griffel und die Zahl der Kallossepfropfen nach selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44, 16.
- Llácer, G., Askoy, U. e Mars, M. 1995.** Underutilized fruit crops in the Mediterranean Region. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 13:110p.
- Lorente-Solanas, M., Orts Giménez, J.V., Capilla Esquitino, M.A., Soler López, E. e Canet Rosa, M.C. 2002.** Evaluación técnico-económica de diferentes sistemas de cultivo protegido del níspero. *Agrícola Vergel*, 21: 72-90.

Luckwill, L.C. 1953. Studies on fruit development in relation to plant hormones.II. The effect of naphthaleneacetic acid applied to apple leaves. *Journal of Horticultural Science* 28: 35-40.

Marsh, H.V., Southwick, F.W. e Weeks, W.D. 1960. The influence of chemical thinners on fruit set and size, seed development, and pre-harvest drop of apples. *Proc American Society for Horticultural Science* 75: 5-21.

Martínez-Calvo, J., Badenes, M. L., Llácer, G, Bleiholder, H., Hack, H. e Meier, U. 1999 Phenological growth stages of loquat tree (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) *Annals of Applied Biology* 134: 353-357.

Martínez-Calvo, J., Badenes, M.L. e Llácer, G. 2000a *El níspero del Japón*. *Agrícola Vegetal*, 19: 24-35.

Martínez-Calvo, J., Badenes, M.L. e Llácer, G. 2000b Descripción de variedades de níspero japonés. Serie de divulgación técnica No. 47. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana, Valencia, Spain.

Martínez-Tellez, J. e Crossa-Raynaud, P. 1982. Contribution to the study of fertilization in three *Prunus* species: *P. persica* (L.) Batsch., *P. cerasifera* Ehrh., *P. mahaleb* L, using pairs of male-sterile and male-fertile varieties. *Agronomie* 2(4): 333-339.

MacDaniels, L.H. e Hildebrand, E.M. 1940. A study of pollen germination upon the stigmas of apple flowers treated with fungicides. *Proc. Journal of the American Society of Horticulture Science* 37: 137-140.

McLeod, K.A. 1975. The control of growth of tomato pollen. *Annals of Botany* 39: 591-596.

Mellenthin, W.M., Wang, C.Y. e Wang, S.Y. 1972. Influence of temperature on pollen tube growth and initial fruit development d' Anjou Pear. *Horticultural Science*, 7: 557-558.

Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Rivas, F. e Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO₄ on *Citrus* pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. *Plant Science* 170: 37-43.

Monselise, S. P. 1977 Citrus fruit development: endogenous systems and external regulation. *Proceeding International Society of Citriculture* volume 2: 664-668.

Murneek, A.E. e Teubner, F.G. 1953. The dual action of naphthaleneacetic acid in thinning of apples. Proc. American Society for Horticultural Science 61: 149-154.

Okamoto, G. e Omori, N. 1991. Effect of the levels of minerals, phytohormones and pistil extracts on *in vitro* ovule development and pollen tube growth in excised grape pistils. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 60 (3): 521-529.

Ortolá, A.G., Monerri, C. e Guardiola, J.L. 1997. Fruitlet age and inflorescence characteristics affect the thinning and the increase in fruitlet growth rate induced by auxin applications in citrus. Acta Horticulturae 463: 501-508.

Polat, A.A., Durgac, C., Kamiloglu, O e Caliskan, O. 2004 Effects of different planting densities on the vegetative growth, yield and fruit quality of loquat. Acta Horticulturae 632: 189-195.

Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A. e Campbell, C.S. 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. Plant Systematics and Evolution 266: 5-43.

Razeto, B. 1988. El níspero. Em: Frutales no tradicionales, caqui, feijoa, níspero y zarzaparrilla. Sudzuki, F., Gómez, A., Acosta, B. e Vega, A. (Eds.) Publicaciones Misceláneas Agrícolas, 20: 59-97.

Razeto, B., Reginato, G. e Rojas, S. 2003 *Chemical Thinning of Loquat with naphthalene Acetic Acid*. Horttechnology 13(1): 128-132.

Reig, C. e Agustí, M. 2006a Morfología y Anatomía. Em: El cultivo del níspero japonés. M. Agustí, C. Reig e P. Undurraga (Eds.). Gráficas Alcoy, Alcoy, Espanha, pp 49-72.

Reig, C. e Agustí, M. 2006b Fisiología. Em: El cultivo del níspero japonés. M. Agustí, C. Reig e P. Undurraga (Eds.). Gráficas Alcoy, Alcoy, Espanha, pp 97-129.

Reinhardt, S., Ewald, A. e Hellwig, F.. 2008 The correlation between ovule quality parameters and the seed yield at *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Applied Botany and Food Quality. 82:1, 76-82.

Rodrigo, J. e Herrero, M. 1996 Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Moniqui'. Journal of Horticultural Science 71: 801-805.

Rodríguez, A. 1983 El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest. Sociedad Cooperativa de Crédito Callosa d'En Sarrià. Alcoy (Alicante) 262p.

- Rohrer, J.R., Robertson, K.R. e Phipps, J.B. 1994.** Floral morphology of Maloideae (Rosaceae) and its systematic relevance. *American Journal of Botany* 81: 574-581.
- Sanzol, J.S. 2001** *Mecanismos reproductivos que regulan la frutificación en peral (Pyrus communis L.) cv. 'Agua de Aranjuez'*. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra. Departamento de Producción Agrária.
- Sanzol, J. e Herrero, M. 2001.** The 'effective pollination period' in fruit trees. *Scientia Horticulturae* 90: 1-17.
- Sanzol, J.S., Rallo, P. e Herrero, M. 2003.** Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in 'Agua de Aranjuez' pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128 (4): 458-462.
- Schneider, G.W. e Lasheen, A.M., 1973.** NAA and sevin composition, development and abscission of apple fruit. *HortScience* 8: 103-104.
- Schröder, M. e Bangerth, F. 2006.** The Possible "Mode of Action" of Thinning Bioregulators and its Possible Contribution to the Understanding of "Thinning Variability" in Apples. Proc. XthIS on Plant Bioregulators in Fruit. *Acta Horticulturae* 727: 437-443.
- Sedgley, M. 1982.** Anatomy of the unpollinated and pollinated watermelon stigma. *Journal of Cell Science* 54: 341-355.
- Sheffield, C.S., Smith, R.F. e Kevan, P.G. 2005.** Perfect syncarpy in apple (*Malus x domestica* 'Summerland McIntosh') and its implications for pollination, seed distribution and fruit production (Rosaceae: Maloideae). *Annals of Botany* 95: 583-591.
- Soler, E., Martínez-Calvo, J., Liácer, G. e Badenes M.L. 2007** Loquat in Spain: Production and Marketing. Proc. Second International Simposium on Loquat 45-47.
- Stanley, R. 1964.** Physiology of Pollen+Pistil. *Science Progress* 52 (205): 122-137.
- Stanley, R. e Linskens, H.. 1974.** Pollen: Biology, Biochemistry and Management, 29-30.
- Stern, R.A. e Ben-Arie, R. 2009.** Giberlines inhibits flowering, reduces hand-thinning, and increases fruit size in peach and nectarine. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 84(2): 119-124.
- Struckmeyer, B.E. e Roberts, R.H. 1950.** A possible explanation of how naphthalene acetic acid thin apples. *Proc American Society for Horticultural Science* 56: 76-78.

Teubner, F.G. e Murneek, A.E. 1955. Embryo abortion as mechanism of “hormone” thinning of fruit. Missouri Agr. Expt. Sta. Bul 590.

Tous, J. e Ferguson, L. 1996. Mediterranean fruits. Progress in new crops: Proceedings of the Third National Symposium, Indianapolis, Indiana, USA, 22-25 October, 1996: 416-430.

Vasil, I.K. 1964. Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. Em: Pollen physiology and fertilization. (Ed.): H.F. Linskens. pp. 107-119.

XiaoMin, X., JinZheng, W., AnNing, Z. e Chao, L. 2008. Effects of plant growth regulating substances on pollen germination and tube growth in Chaohong peach. Journal of Northwest A e F University- Natural Science Edition 36 (4): 123-127.

XiuJu, L., Xiang, L. e HuiRui, S. 1998. Influences of boron, urea and plant growth regulators on the germination and growth of apple pollen. Plant Physiology Communications 34 (2):96-100.

Welsh, R.H. e Klatt, A.R. 1971. Effects of temperature and photoperiod on spring wheat pollen viability. Crop. Science, 11: 864-865.

Wertheim, S.J. 2000 Developments in the chemical thinning of apple and pear. Plant Growth Regulation 31: 85-100.

Westwood, M.N. 1993. Temperate-zone Pomology: Physiology and Culture, 3rd ed. Temper Press, Inc. 523pp.

Wheeler, M.J., Franklin-Tong, V.E. e Franklin, F.C.M. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. New Phytologist 151: 565-584.

Williams E.G., Knox, R.B., Kaul, V. e Rouse, J.L. 1984 Post-pollination callose development in ovules of *Rhododendron* and *Ledum* (Ericaceae): zygote special wall. Journal of Cell Science 69 (1): 127-135.

Williams, E.G., Sage, T.L. e Thien, L.B. 1993. Functional syncarpy by intercarpellary growth of pollen tubes in a primitive apocarpous angiosperm, *Illicium floridanum* (Illiciaceae). American Journal of Botany 80: 137-142.

Williams, K.M. e Fallahi, E. 1999. The effects of Exogenous Bioregulators and Environment on Regular Cropping of Apple. Horttechnology 9(3): 323-327.

Williams, M.W. 1993. Sulcarbamide, a blossom-thinning agent for apples. HortScience 3: 322-324.

Wolters-Arts, M., Lush, W.M. e Mariani, C. 1998. Lipids are required for directional pollen tube growth. Nature 392: 818-821.

Yang, J. Y. 1963. The relationship between flower biology in cultivars with cold resistance and their overwintering in loquat. Acta Horticulturae Sinica 10:79-86.

Zuang, H., Barret, P., e Beau, C. 1992. Nuevas Especies Frutales. Conservatorio Botánico de Porquevolles. Ediciones Mundi-Prensa.194pp.

Anexos

Estados Fenológicos de *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. –
Escala BBCH (Martínez-Calvo *et al.*, 1999)



010



017



110



115



311



319



501



504



601



605



607



701



709



805



807

Estado principal 0: Desenvolvimento do gomo

- 010 Latência no Outono: os gomos vegetativos estão fechados e cobertos por escamas castanhas e pêlos cinza esbranquiçados.
- 011 Os gomos começam a inchar; as escamas dos gomos iniciam o seu alongamento e separação.
- 013 Final do inchaço dos gomos vegetativos.
- 017 Início da rebentação: os primeiros primórdios foliares são visíveis.
- 019 Os primórdios foliares sobressaem entre 5 e 10 mm sobre as escamas dos gomos.
-
- 020 Latência na Primavera: os gomos vegetativos estão fechados e cobertos por escamas castanhas e pêlos cinza esbranquiçados.
- 021 Os gomos começam a inchar; as escamas dos gomos iniciam o seu alongamento e separação.
- 023 Final do inchaço dos gomos vegetativos.
- 027 Início da rebentação: os primeiros primórdios foliares são visíveis.
- 029 Os primórdios foliares sobressaem entre 5 e 10 mm sobre as escamas dos gomos.
-
- 030 Latência no Verão: os gomos vegetativos estão fechados e cobertos por escamas castanhas e pêlos cinza esbranquiçados.
- 031 Os gomos começam a inchar; as escamas dos gomos iniciam o seu alongamento e separação.
- 033 Final do inchaço dos gomos vegetativos.
- 037 Início da rebentação: os primeiros primórdios foliares são visíveis.
- 039 Os primórdios foliares sobressaem entre 5 e 10 mm sobre as escamas dos gomos.

Estado principal 1: Desenvolvimento da folha.

- 110 Crescimento de Outono: os primórdios foliares sobressaem mais de 10 mm sobre as escamas dos gomos; as primeiras folhas separam-se.
- 111 Primeiras folhas separadas.
- 115 Mais folhas separadas, embora ainda não tenham o seu tamanho final.
- 119 As primeiras folhas estão completamente expandidas.
-
- 120 Crescimento de Primavera: os primórdios foliares sobressaem mais de 10 mm sobre as escamas dos gomos; as primeiras folhas separam-se.
- 121 Primeiras folhas separadas.
- 125 Mais folhas separadas, embora ainda não tenham o seu tamanho final.
- 129 As primeiras folhas estão completamente expandidas.

130 Crescimento de Verão: os primórdios foliares sobressaem mais de 10 mm sobre as escamas dos gomos; as primeiras folhas separam-se.

131 Primeiras folhas separadas.

135 Mais folhas separadas, embora ainda não tenham o seu tamanho final.

139 As primeiras folhas estão completamente expandidas.

Estado principal 3: Desenvolvimento do rebento

311 Início do crescimento do rebento no Outono: os eixos dos rebentos em desenvolvimento são visíveis.

315 Os rebentos têm cerca de 50% da sua longitude final.

319 Os rebentos têm cerca de 90% da sua longitude final.

321 Início do crescimento do rebento na Primavera: os eixos dos rebentos em desenvolvimento são visíveis.

325 Os rebentos têm cerca de 50% da sua longitude final.

329 Os rebentos têm cerca de 90% da sua longitude final.

331 Início do crescimento do rebento no Verão: os eixos dos rebentos em desenvolvimento são visíveis.

335 Os rebentos têm cerca de 50% da sua longitude final.

339 Os rebentos têm cerca de 90% da sua longitude final.

Estado principal 5: Desenvolvimento da inflorescência

500 O gomo da inflorescência está fechado e coberto por escamas verdes.

501 O gomo da inflorescência começa a inchar; as escamas começam a separar-se.

503 O gomo abre-se: inicia-se o desenvolvimento do rácimo de flores.

504 Os braços da inflorescência começam a alongar-se.

505 Rácimo de flores completamente expandido; algumas flores terminais começam a inchar.

507 Início do desenvolvimento da flor: as sépalas estão ligeiramente abertas, as primeiras pétalas brancas começam a ser visíveis.

509 A maioria das flores formam um botão de pétalas brancas.

Estado principal 6: Floração

- 600 Ântese das primeiras flores.
- 601 Início da floração: ântese de aproximadamente 10% das flores.
- 605 Plena floração: pelo menos 50% das flores estão em ântese, caída das primeiras pétalas.
- 607 A flores murcham: a maior parte das pétalas caíram.
- 609 Final da floração: todas as pétalas caíram (vingamento).

Estado principal 7: Desenvolvimento do fruto

- 701 O fruto alcança 10%, aproximadamente, do seu tamanho final.
- 705 O fruto alcança 50%, aproximadamente, do seu tamanho final.
- 709 O fruto alcança 90%, aproximadamente, do seu tamanho final.

Estado principal 8: Maturação do fruto

- 801 Os frutos começam a corar (mudança de cor).
- 805 Aumento da coloração do fruto, específica para cada cultivar.
- 807 Maturação fisiológica de colheita.
- 809 Maturação gustativa (de consumo): frutos com sabor e firmeza típicos de cada cultivar.