UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Dissertação

Viabilidade e compatibilidade de pólen de diferentes genótipos de pereira no Rio Grande do Sul

Ciane Xavier Gonçalves

Pelotas, 2008

CIANE XAVIER GONÇALVES

Viabilidade e compatibilidade de pólen de diferentes genótipos de pereira no Rio Grande do Sul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientador: Andrea De Rossi Rufato

Co-Orientadores: Márcia Wulff Schuch

Juliana Degenhardt

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

_____

Drª. Professora UFPel Andrea De Rossi Rufato (Orientadora)

_____

Dr. Professor UFPel José Carlos Fachinello (Examinador)

_____

Drª. Joseane de Souza Hipólito (Examinadora)

_____

Dr. Professor UDESC Léo Rufato (Examinador)

“O homem é um animal com instintos de sobrevivência.
Por isso, seu engenho desenvolveu-se primeiro e a alma depois, e o progresso da
ciência está bem mais adiantado que seu comportamento ético.”
Charles Chaplin

Ao meu irmão Breno X. Gonçalves,
OFEREÇO

Aos meus pais Breno M. Gonçalves e Laci C. X. Gonçalves,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me concedido à vida.

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fruticultura de Clima Temperado pela oportunidade de realização do meu mestrado.

À Embrapa Clima Temperado pela oportunidade de utilizar sua infra-estrutura para a realização deste trabalho.

À Embrapa Uva e Vinho, pelo fornecimento de material para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À orientadora Drª professora Andrea De Rossi Rufato, por sua dedicação, apoio e compreensão demonstrada durante a excução do trabalho.

À Drª professora Márcia Wulff Schuch pela co-orientação e incentivo.

À Drª pesquisadora Juliana Degenhardt pela co-orientação, idéias e dedicação.

Ao Dr. Pesquisador Enilton Fick Coutinho, da Embrapa Clima Temperado, pelo incentivo e amizade.

À Drª pesquisadora Maria do Carmo Bassols Raseira, pelos esclarecimentos referentes ao trabalho e apoio.

Ao Dr. Pesquisador Bonifácio H. Nakasu pela atenção e dedicação.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica, pelo empréstimo de equipamentos.

À D. Fátima Tavares da Silveira, funcionária do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Embrapa Clima Temperado, pelos ensinamentos, idéias e amizade.

Ao bibliotecário Vilson, da Embrapa Clima Temperado, por dua disposição e amizade.

À bibliotecária Marlene da Faculdade de Ciências Agrárias/UFPel, pela dedicação e simpatia.

Aos bolsistas Cíntia e Ricardo, dos Laboratórios de Biologia Molecular e Genética e Melhoramento Vegetal, respectivamente, pela ajuda prestada.

À bolsista Raquel do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela ajuda prestada e pela amizade.

Ao colega Tiago Telesca, pelo compartilhamento dos conhecimentos e companheirismo.

À bolsista Patrícia, pelo compartilhamento dos conhecimentos para o início da execução do trabalho e amizade.

Aos colegas Marcelo Couto e Fabiano Simões, pela ajuda prestada.

À Juçara Ferri, colega de Pós-Graduação em Agronomia/UFPel pela disposição em auxiliar-me, pelas palavras de incentivo e pela amizade que está se desencadeando.

Ao aluno de graduação em Agronomia/UFPel, Breno Xavier Gonçalves (meu irmão), pela ajuda prestada no desenvolvimento do trabalho, pelas palavras de incentivo, enfim por sua imensurável amizade.

Aos meus amados pais Breno e Laci, por serem sempre meu refúgio e fortaleza.

A todos os professores, pesquisadores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UFPel e da Embrapa Clima Temperado, aqui citados ou não, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

Aos amigos que em algum momento durante o período de mestrado, estiveram comigo, compartilhando suas vidas.

Resumo Geral

GONÇALVES, Ciane Xavier. **Viabilidade e compatibilidade de pólen de diferentes genótipos de pereira no Rio Grande do Sul.** 2008. 150f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A pereira é uma frutífera que pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e ao gênero *Pyrus*. No Brasil, a produção de peras é somente de, aproximadamente, 20 mil toneladas e este fato ocorre, principalmente, pela falta de cultivares adaptadas às condições climáticas. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a viabilidade e compatibilidade de pólen de diferentes genótipos de pereira no Rio Grande do Sul. Este trabalho foi dividido em cinco experimentos: No experimento 1, avaliou-se a germinação *in vitro* de 14 genótipos de pereira, em diferentes tempos de incubação (2, 4 e 6 horas) em incubadora tipo BOD, em ausência de luz, a 25°C. Para o experimento 2, o tempo de incubação foi fixado para cada genótipo conforme os melhores resultados obtidos no experimento anterior, avaliando-se as diferentes temperaturas de incubação (20, 30 e 40°C), na germinação *in vitro* de 14 genótipos de pereira. O meio de germinação básico foi composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar. No terceiro experimento, o tempo e a temperatura de incubação dos grãos de pólen *in vitro* foram fixados, conforme os experimentos anteriores; avaliou-se a germinação de dez genótipos de pereira sob a influência do acréscimo de diferentes combinações de ácido bórico e nitrato de cálcio ao meio de germinação básico. No experimento de número 4 avaliou-se a germinação *in vitro* de grãos de pólen de genótipos de pereira (variando-se a temperatura e o período de incubação) em estufa tipo BOD, em ausência de luz, e ainda, o ácido bórico em três concentrações adicionado ao meio de germinação básico. No quinto experimento, avaliou-se a compatibilidade gametofítica em genótipos de pereira, através do desenvolvimento do tubo polínico no pistilo da flor, 120 horas após a polinização; para os genótipos em estudo avaliou-se a autopolinização de campo, autopolinização de laboratório, polinização cruzada e a polinização aberta. Conclui-se que, para os genótipos de pereira estudados no primeiro experimento a percentagem de germinação depende do tempo e da amostra. Para o segundo experimento, entre os genótipos de pereira estudados, a temperatura de incubação a 20°C é recomendável e a 40°C é prejudicial para a germinação. Para o terceiro experimento, de maneira geral, em meio de cultura básico ou acrescido de 200 mg L^{-1} de ácido bórico promove elevados índices de germinação *in vitro* de grãos de pólen dos genótipos de pereira; e a percentagem de germinação é dimunuída quando acrescenta-se a concentração de 1200 mg L^{-1} de

nitrato de cálcio, independente da concentração de ácido bórico. No quarto experimento, para os genótipos de pereira estudados, é recomendável a germinação de grãos de pólen *in vitro* em meio de cultura básico ou acrescido de 100 mg L^{-1} de ácido bórico. Para o quinto experimento, a fecundação dos óvulos não ocorreu na quase totalidade de genótipos e tipos de polinização; de modo geral, a polinização cruzada beneficia a fecundação.

Palavras chave: Rosaceae, germinação *in vitro*, polinização, alelos-S.

General Abstract

GONÇALVES, Ciane Xavier. **Pollen viability and compatibility of different genotipes of the pear culture in the state of Rio Grande do Sul.** 2008. 150f. Dissertation (Master Degree) - Program of Post-Graduation in Agronomy. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pear is a fruit tree that belongs to the family Rosaceae, subfamily Pomoideae and genus *Pyrus*. In Brazil, the pear production lays around 20 thousand ton, and this fact occurs mainly due to the lack of adapted cultivars to the climate conditions.The present work was developed with the objective to study the pollen viability and compatibility of different cultivars, selections and rootstocks for the pear culture. This work was divided into five batches: in the experiment 1 it was evaluated the *in vitro* germination of 14 genotypes of pear at different incubation times (2, 4 and 6 hours) in BOD incubator and in lightless condition at 25°C. In the experiment 2, the incubation time was set for each genotype according the best results obtained in the previous experiment and it was assessed different temperatures of incubation (20, 30 and 40 °C) on *in vitro* germination of 14 pear genotypes. The basic germination medium consisted of 100 g L^{-1} sucrose and 10 g L^{-1} agar. In the third experiment, time and temperature of *in vitro* incubation of the pollen grains were chosen conform to the previous experiments. It was evaluated the germination of ten pear genotypes under the influence of the increase of different combinations of boric acid and calcium nitrate to the basic germination medium. In the experiment 4 it was assessed the *in vitro* germination of pollen grains of pear genotypes (varying temperature and time of incubation) in BOD incubator, lightless and boric acid in three concentrations added to the basic germination medium. Experiment 5 evaluated the gametic compatibility in pear genotypes through pollen tube growth in pistil of flower 120 hours after pollination. Therefore, to the assessed genotypes it was evaluated the self-pollination either in the field or laboratory, cross-pollination or open-pollination. The germination percentage of the pear genotypes studied in the first experiment depends on time and sample. Among the pear genotypes assessed in the second experiment the temperature of incubation at 20°C is recommended and at 40°C is damaging for germination. In the third experiment, in general, either basic culture medium or enriched with 200 mg L^{-1} boric acid promote higher rates of *in vitro* germination of pollen grains of the pear genotypes; the germination percentage decreased whether enriched with 1200 mg L^{-1} of calcium nitrate, independently of boric acid concentration. For the pear genotypes evaluated in the fourth experiment it is recommended to germinate the pollen grains in either basic culture medium or enriched with 100 mg L^{-1} of boric acid. In the fifth experiment the ovule fecundation did not occur for most genotypes and pollination type; therefore, cross-pollination benefits fecundation.

Keywords: Rosaceae, *in vitro* germination, pollination, alleles-S.

Lista de Figuras

RELATÓRIO DE CAMPO

Figura 1 - Estágio de desenvolvimento dos botões florais utilizados para a realização dos experimentos de germinação dos grãos de pólen de pereira. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 54

Figura 2 - Tratamentos realizados a campo em pereira (*Pyrus* sp.), Embrapa Clima Temperado (CPACT), Pelotas. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 54

ARTIGO 1 - Tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira

Figura 1 - (A) Lâminas adaptadas para germinação de pólen de pereira. (B) Pincel nº5 para aspersão do pólen nas lâminas. (C) Placas de Petri® que funcionam como câmara úmida, contendo as lâminas em incubadora tipo BOD. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 67

Figura 2 - (A) Grãos de pólen não germinados. (B) Grãos de pólen germinados. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 68

ARTIGO 5 - Comportamento de seleções (6.93, 7.93, 9.93 e 96.13.07), cultivares (Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams) e porta-enxerto (*Pyrus calleryana*) de pereira (*Pyrus* sp.) quanto à polinização

Figura 1 - (A) Ramos protegidos com estruturas adaptadas em TNT para autopolinização. (B) Ramos designados para polinização aberta. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 138

Figura 2 - (A) Pistilos emasculados para posterior polinização. (B) Becker contendo água para a conservação dos ramos com pistilos emasculados. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 139

Figura 3 - (A) Pistilos e pistilos com gotas de corante diferencial Lacmoide. (B) Lâminas prontas para serem observadas em microscópio. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 140

Figura 4 - (A, B e C) Germinação de grãos de pólen na superfície estigmática e no estilete. (D e E) Tubos polínicos atingindo o ovário. (F, G e H) Tubos polínicos atingindo os óvulos. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 141

Lista de Tabelas

PROJETO DE DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Material de consumo. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 32

Tabela 2 - Material permanente. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 32

Tabela 3 - Outras despesas. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 32

Tabela 4 - Cronograma de atividades. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 34

ARTIGO 1 - Tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira

Tabela 1 - Grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira utilizadas para testar o tempo de incubação em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 64

Tabela 2 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira, provenientes de Vacaria, incubados durante 2, 4 e 6 horas a 25°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 65

Tabela 3 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira, provenientes de Pelotas, incubadas durante 2, 4 e 6 horas a 25°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 66

ARTIGO 2 - Temperatura de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira

Tabela 1 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante uma hora em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 79

Tabela 2 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante duas horas em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 80

Tabela 3 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante quatro horas em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 81

Tabela 4 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira incubados durante uma hora em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 82

Tabela 5 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira incubados durante duas horas em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 83

Tabela 6 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira incubados durante quatro horas em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 84

ARTIGO 3 - Ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira

Tabela 1 - Genótipos e respectivas temperaturas e tempos de incubação em BOD, quando testou-se a adição de ácido bórico e de nitrato de cálcio ao meio de cultura básico. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007..... 95

Tabela 2 - Tratamentos e respectivas concentrações de ácido bórico e nitrato de cálcio acrescidos ao meio de germinação básico. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007..... 96

Tabela 3 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Carrick (C3) e Packham's 01 (C7) e da seleção Monte Bonito (S2), variando a concentração de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de culura, incubadas durante uma hora a temperatura 20°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007..... 97

Tabela 4 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Abbé Fétel (C2) incubada durante duas horas a 20°C, Cascatense (C4) incubada durante uma hora a 30°C e Século XX (C9) incubada durante duas horas a temperatura de 30°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007..... 98

Tabela 5 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Forelle (C5) e Hosui 01 (C10) e, das seleções Coelho Borges (S1) e Seleção 9.93 (S5), variando a concentração de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de culura, incubados durante quatro horas a 20°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007..... 99

ARTIGO 4 - Germinação de grãos de pólen *in vitro* de cultivares copa e seleções de pereira em função da adição de ácido bórico ao meio de cultura e de diferentes horas e temperaturas de incubação

Tabela 1 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Carrick e Kieffer, das seleções 6.93, 7.93 e 9.93 e, do porta-enxerto Pyrus calleryana, quando submetidos a diferentes temperaturas (20 e 30°C), tempos de incubação (1, 2 e 4 horas) e em diferentes concentrações de ácido bórico (100 e 200 mg L^{-1}). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 110

ARTIGO 5 - Comportamento de seleções (6.93, 7.93, 9.93 e 96.13.07), cultivares (Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams) e porta-enxerto (*Pyrus calleryana*) de pereira (*Pyrus* sp.) quanto à polinização

Tabela 1 - Tipos de polinização, local de execução e genótipos de pereira usados para testar a compatibilidade polínica. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 128

Tabela 2 - Etapas de percurso estigma-ovário conforme o desenvolvimento dos tubos polínicos. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 129

Tabela 3 - Percentagem de germinação de grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados nos cruzamentos. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 130

Tabela 4 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização (campo e laboratório) e da polinização livre da Seleção 6.93. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 131

Tabela 5 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da cultivar kieffer (campo), autopolinização da cultivar Kieffer (laboratório), polinização livre da cultivar Kieffer e da polinização cruzada (Kieffer x Carrick). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 132

Tabela 6 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização e polinização livre da Seleção 9.93. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 133

Tabela 7 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da polinização cruzada com 'Kieffer' para as Seleções 7.93 e 96.13.04 e cultivar Red Bartlett. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 134

Tabela 8 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da 'Shinseiki' e das polinizações cruzadas ('Shinseiki' x 'Abbé Fétel', 'Shinseiki' x 'Forelle' e 'Shinseiki' x 'Kieffer'). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 135

Tabela 9 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da 'Williams' e das polinizações cruzadas ('Williams' x 'Abbé Fétel', 'Williams' x 'Carrick', 'Williams' x 'Forelle', 'Williams' x 'Packham's' e 'Williams' x 'Kieffer'). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 136

Tabela 10 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização de *P. calleryana* e da polinização cruzada de *P. calleryana* X Abbé Fétel. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007..... 137

SUMÁRIO

Resumo Geral..... 6
General Abstract..... 8
Lista de Figuras..... 10
Lista de Tabelas..... 12
Sumário..... 16
1 - INTRODUÇÃO GERAL..... 19
PROJETO DE DISSERTAÇÃO..... 21
1 - Identificação..... 21
2 - Antecedentes e Justificativa..... 22
3 - Objetivos..... 25
3.1 - Objetivo geral..... 25
3.2 - Objetivos específicos..... 25
4 - Material e Métodos..... 25
4.1 - Experimento 1 - Tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 26
4.2 - Experimento 2 - Temperatura de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 27
4.3 - Experimento 3 - Ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 28
4.4 - Experimento 4 - Germinação de grãos de pólen *in vitro* de cultivares copa e seleções de pereira em função da adição de ácido bórico ao meio de cultura e de diferentes horas e temperaturas de incubação..... 29
4.5 - Experimento 5 - Comportamento de seleções, cultivares e porta-enxerto de pereira quanto à polinização..... 30
5 - Recursos necessários..... 32

5.1 - Custos totais..... 33
6 - Referências bibliográficas..... 35
2 - REVISÃO DE LITERATURA..... 37
2.1 - Origem e classificação da pereira..... 37
2.2 - Clima, produção mundial e importância econômica da pereira..... 38
2.3 - Melhoramento genético..... 39
2.4 - Biologia floral..... 43
2.5 - Polinização..... 44
2.6 - Viabilidade do grão de pólen e desenvolvimento do tubo polínico..... 45
2.7 - Compatibilidade, incompatibilidade e pseudoincompatibilidade em pereira..... 48
RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO..... 51
Artigo 1 - Tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 55
Resumo..... 55
Abstract..... 56
1 - Introdução..... 56
2 - Material e Métodos..... 57
3 - Resultados e Discussão..... 59
4 - Conclusões..... 61
5 - Referências Bibliográficas..... 61
Artigo 2 - Temperatura de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 69
Resumo..... 69
Abstract..... 70
1 - Introdução..... 70
2 - Material e métodos..... 71
3 - Resultados e discussão..... 73
4 - Conclusões..... 76
5 - Referências Bibliográficas..... 76
Artigo 3 - Ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira..... 85
Resumo..... 85
Abstract..... 86

1 - Introdução..... 86
2 - Material e Métodos..... 87
3 - Resultados e Discussão..... 89
4 - Conclusões..... 92
5 - Referências Bibliográficas..... 92
Artigo 4 - Germinação de grãos de pólen *in vitro* de cultivares copa e seleções de pereira em função da adição de ácido bórico ao meio de cultura e de diferentes horas e temperaturas de incubação..... 100
Resumo..... 100
Abstract..... 101
1 - Introdução..... 101
2 - Material e Métodos..... 102
3 - Resultados e Discussão..... 104
4 - Conclusões..... 107
5 - Referências Bibliográficas..... 107
Artigo 5 - Comportamento de seleções (6.93, 7.93, 9.93 e 96.13.07), cultivares (Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams) e porta-enxerto (*Pyrus calleryana*) de pereira (*Pyrus* sp.) quanto à polinização..... 111
Resumo..... 111
Abstract..... 112
1 - Introdução..... 112
2 - Material e Métodos..... 114
3 - Resultados e Discussão..... 116
5 - Conclusões..... 123
6 - Referências Bibliográficas..... 123
4 - CONCLUSÕES GERAIS..... 142
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS..... 143

1 - INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura tem possibilitado a exploração de áreas produtivas e em contrapartida torna-as lucrativas (FACHINELLO et al., 1995). O valor social da fruticultura é bastante importante, pois atualmente apresenta um cultivo extensivo e intensivo, exigindo assim a presença constante do agricultor nas atividades de campo, além de se expandir para a comercialização e industrialização dos produtos (SIMÃO, 1971).

Para a região Sul do Brasil, a cultura da pereira pode ser considerada como uma opção para aumentar a eficiência e a diversificação do sistema produtivo. Entretanto existem fatores que limitam a expansão da cultura, como por exemplo, o abortamento de gemas florais que pode variar de 30 a 100% dependendo da cultivar, a falta de adaptação de cultivares e porta-enxertos utilizados (NAKASU; LEITE, 1992), a dificuldade de obtenção de porta-enxertos, a falta de material sadio para a produção de mudas (LEITE, 1992; LEITE, 1995; PASQUAL et al., 1990).

No Brasil a produção anual de pêras das espécies *Pyrus communis* L. e *P. serotina* R., é de aproximadamente de 20 mil toneladas e o consumo é quase dez vezes maior que a produção. Desta maneira, o mercado brasileiro, torna-se bastante dependente das importações (OLIVEIRA et al., 2000).

Quase todas as cultivares comerciais de pereira são auto-incompatíveis, havendo a necessidade de utilização de polinizadoras para que frutifiquem. Também existem muitas cultivares de pereira que são parcialmente auto-produtivas; este processo é conhecido como partenocarpia estimulativa, pois, o estímulo da polinização sem que haja a fertilização se faz necessário para que o fruto se desenvolva (LEITE; SOUZA, 2003).

O melhoramento genético tem contribuído para o desenvolvimento da fruticultura brasileira, aumentando à produção com ganhos significativos de produtividade e qualidade de frutos (LEITE, 2004). Já que manutenção da viabilidade do pólen é de

grande importância para a condução de programas de melhoramento e conservação genética.

Alguns aspectos das cultivares copa como precocidade de início de produção, vigor e tamanho da planta, absorção de nutrientes, qualidade do fruto, produtividade, tolerância a seca, resistência a pragas e doenças do solo, e suscetibilidade a danos por pesticidas, são controladas pelos porta-enxertos (FAORO, 2001). E ainda, um dos fatores que afetam a consolidação da cultura da pereira na região Sul é a indefinição de porta-enxertos adaptados.

Portanto, com esta pesquisa, pretende-se avaliar a viabilidade de pólen de diferentes cultivares copa, seleções e porta-enxertos para a cultura da pereira, e analisar a compatibilidade do pólen destas cultivares para hibridação.

PROJETO DE DISSERTAÇÃO

1 - Identificação

UNIDADE: FAEM	DEPARTAMENTO: FITOTECNIA
PROGRAMA: PPGA	
LINHA DE PESQUISA: MELHORAMENTO E BIOTECNOLOGIA APLICADA A PLANTAS FRUTÍFERAS	
TÍTULO DO PROJETO: VIABILIDADE E COMPATIBILIDADE DE PÓLEN DE DIFERENTES GENÓTIPOS PEREIRA NO RIO GRANDE DO SUL	
PRAZOS DE EXECUÇÃO: Início: Março de 2006 Término: Março de 2008	
EQUIPE TÉCNICA ALUNA : *Ciane Xavier Gonçalves* ORIENTADORA : *Andrea De Rossi Rufato* CO-ORIENTADORA: *Márcia Wulff Schuch* *Juliana Degenhardt*	
OBJETIVOS: Estudar a viabilidade e a compatibilidade de pólen de diferentes cultivares, seleções e porta-enxertos para a cultura da pereira.	
RECURSOS FINANCEIROS NECESSÁRIOS (R$) Material de Consumo..... 246,00 Material Permanente..... 6.580,00 Outros Serviços..... 1.130,00 Sub-Total..... 7.956,00 Imprevistos (10%)..... 795,60 TOTAL..... 8.751,60	
ASSINATURAS ALUNO: ORIENTADOR : CO-ORIENTADOR: COORDENADOR DO PROGRAMA:	DATA ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____

2 - Antecedentes e Justificativa

Comparando-se o Brasil com as demais nações do mundo, pode-se afirmar que o mesmo ocupa grande área do continente, apresentando condições climáticas e edáficas que o colocam em posição privilegiada. Nosso país possui áreas situadas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, e isto possibilita a existência de centenas de espécies nativas e exóticas (SIMÃO, 1971).

Com o aumento da população mundial, há uma expansão nas fronteiras agrícolas e urbanas, que por conseqüência ocupam o habitat natural de numerosas espécies de plantas e animais (CARVALHO et al., 2003 *apud* STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995). Este fenômeno está originando perdas e, em muitas ocasiões acarreta a completa extinção, da diversidade genética de espécies de plantas nativas (CARVALHO et al., 2003 *apud* VILLALOBOS et al., 1991).

A fruticultura tem possibilitado a exploração de áreas produtivas e em contrapartida torna-as lucrativas (FACHINELLO et al., 1995). O valor social da fruticultura é bastante importante, pois atualmente apresenta um cultivo extensivo e intensivo, exigindo assim a presença constante do agricultor nas atividades de campo, além de se expandir para a comercialização e industrialização dos produtos (SIMÃO, 1971).

Nos ecossistemas terrestres a polinização é um processo ecológico chave, pois esta ação determina o sucesso reprodutivo da flora, e conseqüentemente, a capacidade de auto-regeneração natural da vegetação (BATISTA; RAMALHO 2005). Em escala global, mais de 80% das espécies vegetais e mais de 75% das plantas agrícolas dependem de animais para polinização (KEVAN; IMPERATRIZ – FONSECA, 2002 *apud* FRANKE et al. (2005).

Onorati e Tacchini (1969), mencionam que em fruticultura é essencial definir se uma planta tem capacidade de originar frutos sem a necessidade de utilização de uma polinizadora; existem bastantes motivos que causam a auto-esterilidade de uma planta, como por exemplo: esterilidade devido a fatores morfológicos (atrofia de pistilo ou atrofia das anteras), esterilidade do pólen (devido a causas citológicas ou fisiológicas de nutrição), esterilidade das células sexuais femininas devido a causas citológicas e ainda pela auto e interincompatibilidade ou falta de afinidade genética.

Segundo Leite (2004), atualmente o melhoramento genético é uma das modernas tecnologias de produção que merece destaque, pois têm contribuído

bastante para o desenvolvimento da fruticultura brasileira, aumentando à produção com ganhos significativos de produtividade e qualidade de frutos.

Nakasu e Faoro (2003) mencionam que a pereira abrange mais de 20 espécies, todas originárias da Europa e da Ásia. Pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e gênero *Pyrus,* as cultivares de pereira mais consumidas no mundo podem ser classificadas em: Européias (*Pyrus communis*) e Asiáticas (Pêra Japonesa - *Pyrus pyrifolia* var. culta.; Pêra Chinesa - *Pyrus bretschneiderie* e *Pyrus ussuriensis*).

De acordo com Osório e Fortes (2003), a pêra européia (*Pyrus communis* L.) é bastante consumida no país, entretanto apresenta uma área de cultivo extremamente pequena porque o desenvolvimento da cultura é afetado por fatores como: falta de adaptação do material genético, abortamento de gemas, compatibilidade de polinizadoras/cultivares, porta-enxertos adaptados às condições de solo e clima, pragas e doenças. Geralmente os frutos das pêras européias têm forma periforme, polpa manteigosa, textura fina e com poucas células parenquimatosas. As mais cultivadas são: 'William's', 'Bon Chrétien' (ou 'Bartlet'), 'Packhams Triumph', 'Abbé du Etel' (ou 'bate Fetel'), 'Winter Nellis', 'Beurré Hardy', 'Conference' e 'Doyenne du Comice'.

Conforme Petri et al. (2003), para o desenvolvimento da pereira no Sul do Brasil um problema bastante relevante é a ausência de baixas temperaturas para satisfazer a exigência em frio para a quebra de dormência. Se a requisição quanto ao frio não é satisfatória para as necessidades da cultivar, acontecem anomalias como: prolongada dormência e brotação e ainda floração irregulares; para amenizar esta problemática deve-se realizar algumas práticas culturais e/ou uso de produtos químicos. Além disso, a falta de maiores estudos sobre porta-enxertos no Brasil ainda existe. Atualmente as poucas áreas implantadas com pereira no Brasil, são com porta-enxertos de *Pyrus calleriana*, os quais proporcionam as plantas, alto vigor e baixa produção, além de outros problemas, os quais são destacados por Herter et al. (2001), como, a falta de cultivares adaptadas e a deficiência de tecnologias de manejo, além do abortamento de gemas, com causas desconhecidas, podendo ser de ordem climática, nutricional ou fitossanitária.

No Brasil os marmeleiros são pouco empregados como porta-enxertos em função de sua maior debilidade quanto ao crescimento e vigor (CAMELLATO, 2003). Em termos de melhoramento genético, a grande maioria dos estudos objetiva a

seleção e/ou criação de cultivares copa adaptadas às condições predominantes nas regiões de clima temperado (CAMPO DALL'ORTO et al., 1996; NAKASU; LEITE, 1992; SIMONETTO; GRELLMANN, 1999;) enquanto que, no caso de porta-enxertos, os estudos brasileiros são bastante incipientes (BIANCHI et al., 2002; PICOLOTTO et al., 2004).

Segundo Leite e Souza (2003), a pereira possui flores hermafroditas, com cinco carpelos, cada um contendo dois óvulos totalizando dez sementes possíveis; os carpelos emitem cinco pistilos, estiletes e estigmas. Fatores como: as condições climáticas, o agente polinizante, a distância que o pólen deve percorrer e os períodos de florescimento das cultivares polinizadoras influenciam no processo de polinização. O grão de pólen germinado desenvolve o tubo polínico que cresce através do estilete até atingir o óvulo. Temperatura, nutrição mineral e compatibilidade genética com o estilete são fatores que afetam o crescimento do tubo polínico; a fertilização do óvulo pelo gameta masculino é afetado por fatores genéticos, nutricionais e ambientais; e a longevidade do óvulo é controlada pelos fatores genéticos e nutricionais.

No mesmo pomar devem ser plantadas duas ou mais cultivares de pereira, pois estas necessitam de polinização cruzada, desta forma é importante salientar que as polinizadoras devem ser compatíveis a apresentar período de floração coincidente (RASEIRA; PETRI, 2003). Para selecionar a cultivar polinizadora deve-se escolher uma polinizadora que também tenha bom valor de mercado e ainda, se possível, que a polinizadora seja livre de doenças e pragas, devendo florescer anualmente (LEITE; SOUZA 2003).

De acordo com Leite e Souza (2003), para qualquer método de polinização a viabilidade do pólen, para ser considerada boa, deve estar entre 50% e 70%; em condições de laboratório pode ser determinada pela deposição de pólen em lâminas contendo uma solução de sacarose e ágar, incubadas por duas horas a 24ºC, e faz-se a contagem da porcentagem de germinação, sob microscópio; em condições de campo o pólen apresenta vida curta e geralmente é viável por apenas algumas horas; além disto, a utilização de alguns fungicidas também reduz consideravelmente a viabilidade do pólen.

Conforme Leite e Souza (2003), quando a polinização é cruzada, a fertilidade de uma flor representa a capacidade que ela tem de se desenvolver em fruto; a fertilidade varia de acordo com a cultivar, o tipo de porta-enxerto (marmeleiro e

Pyrus calleryana aumentam a fertilidade, ao passo que a *Pyrus betulaefolia* diminui) e o sistema de poda. A polinização cruzada aumenta a porcentagem efetiva de frutificação e também, o número de sementes de todas as cultivares.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Estudar a viabilidade de pólen de diferentes porta-enxertos, cultivares copa e seleções para a cultura da pereira, bem como avaliar a compatibilidade do pólen destas cultivares para hibridação.

3.2 - Objetivos Específicos

Determinar o tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Indicar a temperatura de incubação ideal na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Determinar as concentrações de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Estudar o comportamento de seleções (6.93, 7.93, 9.93 e 96.13.04), cultivares (Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams) e porta-enxerto (*Pyrus calleryana*) de pereira (*Pyrus* sp.) quanto à polinização.

4 - Material e Métodos

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia e na Fazenda da Palma FAEM/UFPel, Pelotas, RS; no Laboratório de Melhoramento Vegetal e no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

No desenvolvimento do projeto serão executados cinco experimentos, objetivando-se:

1° Experimento: Avaliar a germinação *in vitro* do pólen de 14 genótipos de pereira (19 amostras), em diferentes tempos de incubação (2, 4 e 6 horas) em incubadora tipo BOD a 25°C;

2° Experimento: Avaliar a influência da temperatura de incubação (20, 30 e 40°C) em incubadora tipo BOD sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira, onde o tempo de incubação será estabelecido conforme o experimento anterior;

3° Experimento: Avaliar a germinação *in vitro* de grãos de pólen de sete cultivares copa e três seleções de pereira, procedentes de Vacaria/RS e de Pelotas/RS, onde a temperatura e o tempo de incubação serão estabelecidos para cada genótipo a partir dos dois experimentos anteriores;

4° Experimento: Avaliar a germinação *in vitro* de grãos de pólen de genótipos de pereira, procedentes de Vacaria e Pelotas. Variando-se a temperatura e o período de incubação em estufa tipo BOD, em ausência de luz e acrescentando-se ácido bórico em três concentrações ao meio de germinação básico;

5° Experimento: Avaliar a compatibilidade gametofítica em seleções, cultivares e porta-enxerto de pereira (*Pyrus* sp), por meio da autopolinização, da polinização livre e da polinização cruzada.

4.1 - Experimento 1- Tempo de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Para a realização deste trabalho, serão utilizadas amostras de pólen de genótipos de pereira. O pólen será coletado de botões florais no estádio de balão, durante a primavera do ano de 2006 e de 2007.

Para a coleta dos botões florais, será utilizada uma tesoura pequena ou os dedos; os botões florais serão guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras. Utilizando-se uma peneira, as anteras serão removidas dos botões florais e, em seguida, serão colocadas para secar em bandejas de papel, por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen esteja totalmente seco e se desprenda das anteras.

O meio de cultura a ser utilizado para testar a viabilidade de germinação *in vitro* do pólen, é composto de: 100 mL de água destilada, 10 g de sacarose e 1g de ágar. O volume será completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio será geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante 4 minutos. Após o preparo do meio de germinação este será distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a observação em lupa e a utilização de pincel o pólen será aspergido nos anéis de PVC da lâmina. Em seguida, as lâminas serão colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel absorvente umedecidas e logo após serão levadas para incubar em estufa tipo BOD, em temperatura de 25ºC. Após duas, quatro e seis horas de incubação, na ausência de luz, será feita a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, através da observação em microscópio óptico binocular. Serão considerados germinados os grãos de pólen que apresentarem o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O delineamento experimental utilizado será completamente casualizado com quatro repetições por porta-enxerto estudado. As médias serão submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.2 - Experimento 2 - Temperatura de incubação na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Para a realização deste trabalho, serão utilizadas amostras de pólen de genótipos de pereira. O pólen será coletado de botões florais no estádio de balão, durante a primavera do ano de 2006 e de 2007.

Para a coleta dos botões florais, será utilizada uma tesoura pequena ou os dedos; os botões florais serão guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras. Utilizando-se uma peneira, as anteras serão removidas dos botões florais e, em seguida, serão colocadas para secar em bandejas de papel, por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen esteja totalmente seco e se desprenda das anteras.

O meio de cultura a ser utilizado para testar a viabilidade de germinação *in vitro* do pólen, é composto de: 100 mL de água destilada, 10 g de sacarose e 1g de ágar. Em um erlemeyer, serão colocadas a sacarose e a água destilada, através de movimentos circulares com o tubo, se obterá a total diluição da sacarose, e em seguida o ágar será adicionado. O volume será completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio será geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante 4 minutos. Após o preparo do meio de germinação este será distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a observação em lupa e a utilização de pincel o pólen será aspergido nos anéis de PVC da lâmina. Em seguida, as lâminas serão colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel absorvente umedecidas e logo após serão levadas para incubar em estufa tipo BOD, na ausência de luz, variando a temperatura em 20, 30 e 40ºC. O tempo de incubação será estabelecido conforme o experimento anterior para cada genótipo estudado. Será feita a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, através da observação em microscópio óptico binocular. Serão considerados germinados os grãos de pólen que apresentarem o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O delineamento experimental utilizado será completamente casualizado com quatro repetições por porta-enxerto estudado. As médias serão submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.3 - Experimento 3 - Ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

Para a realização deste trabalho, serão utilizadas amostras de pólen de genótipos de pereira. O pólen será coletado de botões florais no estádio de balão, durante a primavera do ano de 2006 e de 2007.

Para a coleta dos botões florais, será utilizada uma tesoura pequena ou os dedos; os botões florais serão guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras. Utilizando-se uma peneira, as anteras serão removidas dos botões florais e, em seguida, serão

colocadas para secar em bandejas de papel, por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen esteja totalmente seco e se desprenda das anteras.

Ao meio de cultura básico, composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar, será acrescentado ácido bórico (H_3BO_3) em 3 concentrações (0, 200 e 400 mg L^{-1}) e nitrato de cálcio ($CA(NO_3)_2$) em 4 concentrações (0, 400, 800 e 1200 mg L^{-1}). O volume será completado com água destilada e após a diluição da sacarose e do ácido bórico e do nitrato de cálcio, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante 4 minutos. Após o preparo do meio de germinação este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a observação em lupa e a utilização de pincel o pólen será aspergido nos anéis de PVC da lâmina. Em seguida, as lâminas serão colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel absorvente umedecidas e logo após serão levadas para incubar em estufa tipo BOD, a temperatura e o tempo de incubação utilizados serão variáveis de acordo com cada genótipo, em função das melhores condições de germinação dos grãos de pólen *in vitro*, baseado em resultados de experimentos anteriores, em seguida será feita a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, através da observação em microscópio óptico binocular. Serão considerados germinados os grãos de pólen que apresentarem o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O delineamento experimental utilizado será completamente casualizado com quatro repetições por porta-enxerto estudado. As médias serão submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.4 - Experimento 4 - Germinação de grãos de pólen *in vitro* de cultivares copa e seleções de pereira em função da adição de ácido bórico ao meio de cultura e de diferentes horas e temperaturas de incubação.

Para a realização deste trabalho, serão utilizadas amostras de pólen de genótipos de pereira. O pólen será coletado de botões florais no estádio de balão, durante a primavera do ano de 2007.

Para a coleta dos botões florais, será utilizada uma tesoura pequena ou os dedos; os botões florais serão guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras. Utilizando-se uma peneira, as anteras serão removidas dos botões florais e, em seguida, serão colocadas para secar em bandejas de papel, por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen esteja totalmente seco e se desprenda das anteras.

Serão avaliados seis genótipos, de pereira, nas concentrações de 0, 100 e 200 mg L^{-1} de ácido bórico acrescidas ao meio de cultura básico, composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar. O volume foi completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante 4 minutos. Após o preparo do meio de germinação este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a observação em lupa e a utilização de pincel o pólen será aspergido nos anéis de PVC da lâmina. Em seguida, as lâminas serão colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel absorvente umedecidas e logo após serão levadas para incubar em estufa tipo BOD, testando-se as temperaturas de 20, 30 e 40°C e os tempos de incubação de 1, 2 e 4 horas em incubadora tipo BOD, em seguida será feita a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, através da observação em microscópio óptico binocular. Serão considerados germinados os grãos de pólen que apresentarem o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O delineamento experimental utilizado será completamente casualizado com quatro repetições por porta-enxerto estudado. As médias serão submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.5 - Experimento 5 - Comportamento de seleções, cultivares e porta-enxerto de pereira quanto à polinização.

As polinizações, tanto no campo como em laboratório, serão executadas no momento em que os genótipos a serem polinizados apresentarão número suficiente de flores em estádio de balão para compor os tratamentos.

No campo, os ramos cujas flores serão designadas para autopolinização, serão ensacados com TNT (Tecido Não Tecido), identificados com fitas plásticas amarradas na borda. As fitas plásticas terão cores diferentes dependendo do tratamento. Para a polinização cruzada, será feita a emasculação e polinização das flores na própria planta. E, os ramos designados para polinização livre, serão apenas identificados com fitas plásticas. Para os cruzamentos de laboratório, os ramos com flores em estádio de balão, serão coletados no campo. Em laboratório, serão realizadas autopolinização e polinização cruzada.

Após a coleta, no campo, os ramos com flores em estádio de balão serão levados para o laboratório, onde serão realizados os cruzamentos. Os ramos, contendo as flores serão mantidos em frascos com água, à temperatura ambiente, por cinco dias (120 horas). Para a emasculação das flores de pereira, tanto no campo quanto no laboratório, será utilizada uma tesoura pequena, uma pinça ou a unha. Após a emasculação das flores, será realizada a polinização, depositando-se pólen do genitor masculino desejado sobre o estigma das flores, com o auxílio de um pincel ou até mesmo o dedo, contendo bastante pólen. Será feito um corte de 0,5 cm no pedúnculo da flor e a parte externa será retirada, permanecendo apenas o ovário, o estilete e o estigma. Em seguida serão colocados em pequenos frascos de vidro contendo uma solução fixativa, composta por formol, ácido acético e álcool etílico na proporção de 1:1:8. Logo os frascos serão armazenados em geladeira a temperatura de 4℃, até serem observados, sendo o período mínimo de 24 horas antes da observação.

Antes de realizar-se a observação, os pistilos serão lavados três vezes com água destilada, para que fixativo seja retirado, e então, serão colocados em solução 8N de NaOH, durante 24 horas a temperatura ambiente, em torno de 25℃. Decorridas 24 horas os pistilos serão novamente lavados por 3 vezes em água destilada, para a retirada da solução. Em seguida serão colocados em frascos contendo hipoclorito de sódio a 20% por um período de 20 minutos. Logo após o material será lavado por três vezes com água destilada, para a completa remoção dos resíduos do hipoclorito de sódio e serão transferido para frascos contendo corante diferencial Lacmoide (Resorcinol azul a 1% - 1 g de corante diferencial Lacmoide para 100 mL de água destilada), durante 10 minutos. Após estes procedimentos, os pistilos estarão prontos para serem observados em microscópio óptico. Para o preparo das lâminas será colocado o pistilo, procurando deixa-lo bem

esticado, sobre uma lâmina de vidro e será adicionado três gotas de corante diferencial Lacmoide diluído em água destilada (1:2). Logo lâmina será coberta com lamínula, deixando os pistilos amassados.

Para a avaliação da compatibilidade entre os genótipos será observado o crescimento do tubo polínico no estigma das flores 120 horas após a polinização, com o auxílio de um microscópio serão estabelecidas onze classes, de acordo com o desenvolvimento do tubo polínico.

O delineamento experimental será o inteiramente casualizado com três repetições de 20 flores ou com quatro repetições de 50 flores. As médias serão submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

5 - Recursos Necessários

Tabela 1 - Material de consumo. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Materiais	Und.	Qtd.	Custo Unitário (R$)	Custo total (R$)
Lâminas	Und.	100	00,15	15,00
Pincéis	Und.	6	03,50	21,00
Substrato	20kg	10	15,00	150,00
Sacos de papel encerado	Cento	3	20,00	60,00
Sub-Total			246,00	

Tabela 2 - Material permanente. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Mat./Equip.	Und.	Qtd.	Custo Unit. (R$)	Custo Total (R$)
Contador digital	Und.	01	1.100,00	1.100,00
B.O.D.	Und.	01	4.500,00	4.500,00
Dessecador	Und.	01	480,00	480,00
Forno de microondas	1	01	500,00	500,00
Sub-Total				6.580,00

Tabela 3 - Outras despesas. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

DESCRIÇÃO	Valor em Reais
Plotagem de pôsteres	200,00
CD	30,00
Viagens para congressos	900,00
SUBTOTAL	1.130,00

5.1- Custos totais:

Material de Consumo = R$ 246,00
Material Permanente = R$ 6.580,00
Outras Despesas = R$ 1.130,00
10% Imprevistos = R$ 795,60

Total Geral = R$ 8.751,60

Tabela 4 - Cronograma de atividades. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

ATIVIDADE	MESES 2006												MESES 2007												MESES 2008		
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M		
Revisão da literatura	X		X	X											X	X	X	X					X	X			
Coleta de pólen						X	X											X	X								
Preparo das amostras de grão de pólen para						X	X											X	X								
Avaliação da viabilidade de pólen									X	X											X	X					
Avaliação da compatibilidade de pólen nas hibridações						X	X											X	X								
Tabulação dos Dados											X												X				
Elaboração da dissertação																							X	X			
Defesa de dissertação																									X		

6 - Referências Bibliográficas

BIANCHI, V. J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J. C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genética delle varietá di susino. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.83-87. 2002.

CAMELLATO, D. Propagação. In**: Frutas do Brasil-46**, Pêra: Produção. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.37-45.

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; et al. **Variedades de Pêra para o Estado de São Paulo.**Campinas: IAC. 1996. 34p. (Boletim técnico, 164).

CARVALHO, L. M. T.; CLEVERS, J. G. P. W.; JONG, S. M.; SKIDMORE, A. K. Forestry database updating based on remote sensing change detection. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO (SBSR), v.12. 2005, Goiânia. **Anais ...**. São José dos Campos: INPE, 2003. p.465-472. CD-ROM.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. de. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2ªed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária Pelotas, 1995. 178 p.

FRANKE, R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, WILFRIED; GOMES, SÉRGIO LUIZ (Orgs.). **Mata Atlântica e Biodiversidade**. Salvador: EDUFBA, 2005. v. 1, 474 p.

HERTER, F., VERISSIMO, V., CAMELATTO, D. et al. Abortamento de gemas florais de pereira no Brasil. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1, 23-26 out. 2001, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2001. p. 106-114.

KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (eds). **Pollinating bees: the conservation link between Agriculture and Nature.** Brasília, DF: Ministry of Environment, 2002. 313p.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. DE Polinização In: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.23-28.

LEITE, G. B. **Evolution des etats des bougeons et de leur heterogeneite le long du rameau d´un an de pecher sous differents regimes de temperatures apres l´installation de l´endodormance**. 2004. 168f. Tese (Doutorado) - Univesité Blaise Pascal, Montpellier, 2004.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares In: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.29-36.

NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Pirus 9 - Seleção de pereira para o Sul do Brasil. **HortiSul**, Pelotas, v.2, n.3,p.19-20. 1992.

ONORATI, I. A.; TACCHINI, E. M. L. W. Autopolinización en cultivares de *Pyrus communis* L. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina, Biologia y Producción Vegetal, 1969, v.1, Série 2, n° 21.

OSORIO, V. A.; FORTES, J. F. Introdução In: **Frutas do Brasil-47,** Pêra: Fitossanidade. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.09-10.

PETRI, J. L.; CARMELATTO, D.; HERTER, F. Quebra de Dormência In: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.52-54.

PICOLOTTO, L.; GIACOBBO, C. L.; FACHINELLO, J. C.; KRÜGER, L. R.. Avaliação da compatibilidade de enxertia entre o porta-enxerto de marmeleiro cv. EMC e cvs. copa de pereira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2004, Florianópolis. **Anais...** Tecnologia, Competitividade e Sustentabilidade. Adaltech Soluções para Eventos, 2004.

RAMALHO, M.; BATISTA, M. dos A. Polinização na Mata Atlântica: Perspectiva ecológica da fragmentação. In: FRANKE, R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, W., GOMES, S. L. **Mata Atlântica e Biodiversidade**. ed. Salvador: EDUFBA Vol. 1, 2005. 474 p.

RASEIRA, A.; PETRI, J. L. Instalação do Pomar e Práticas Culturais In: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.46-51.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1971. 530p.

SIMONETTO, P.R.; GRELLMANN, E.O. **Comportamento de cultivares de pereira na região serrana do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 28p. 1999. (Boletim Fepagro, 9).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Origem e classificação da pereira

A pereira faz parte da divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales e família Rosaceae. Pertence a subfamília Maloideae, anteriormente chamada de Pomoideae, Pomeae ou Pomaceae, a qual se distingue das demais, por possuir 17 pares de cromossomos, em comparação com 7 a 9 para as outras subfamílias (SAX, 1931; ZIELINSKI; THOMPSON, 1967), provalvelmente esta subfamília tenha se originado por meio de duplicação espontânea, em um híbrido estéril entre duas espécies primitivas de Rosaceae, pertencentes as subfamílias Prunoideae (x=8) e Espiroideae (x=9), resultando em alopoliplóides que funcionam sexualmente como diplóides normais (WESTWOOD, 1982); e, pertence ao gênero *Pyrus* que possui aproximadamente 25 espécies (HEDRICK et al., 1921; REHDER, 1967; NAKASU; FAORO, 2003). É a terceira fruta de clima temperado mais produzida no mundo depois da uva e maçã (OLIVEIRA et al., 2000).

Existem três tipos de pêras: a européia, a japonesa e a híbrida. A européia (*Pyrus communis* L.), também chamada de pêra manteigosa, é o tipo mais cultivado no mundo (NAKASU, 2003). Provavelmente deriva de espécies como *Pyrus caucasica* Fed e *Pyrus nivalis* Jacq. (WESTWOOD, 1982). As cultivares mais expressivas comercialmente são a William's Bon Chrétien (ou Bartlet), Packhams Triumph, Abbé du Etel ou Abate Fetel, Winter Nellis, Beurré Hardy, Conference e Doyenne du Comice (LAYNE; QUAME, 1975). A japonesa, também chamada de pêra asiática, oriental ou arenosa (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak., surgiu independentemente no Japão e na China (NAKASU, 2003). As cultivares mais importantes comercialmente são a Hosui, Século XX (Nijisseiki), Kosui, Suisei, Shinsei, Shinseiki, Niitaka, Chojuro, Shinsui, Gold-Nijisseiki e as chinesas Ya-Li e Tsu-Li. Das espécies cultivadas na Ásia, a maioria deriva da *Pyrus pyrifolia* (Burm) Nak. ou de seleções de pêra de Ussúris (*Pyrus*

ussuriensis Maxim) (CHILDERS, 1986). A híbrida é o tipo de pêra mais plantado no Brasil e, é resultante dos cruzamentos entre européias e orientais (NAKASU, 2003); alguns exemplos de cultivares híbridas são: Carrick, Garber, Le Conte, Primorosa, Seleta, Smith, Triunfo e Cascatense (CHILDERS, 1986; NAKASU; FAORO, 2003).

2.2 - Clima, produção mundial e importância econômica da pereira

No Brasil, dentre as frutíferas de clima temperado, a pêra é uma das mais consumidas e a mais importada, pois sua produção é bastante restrita, bem como a área cultivada (FAO, 2007; MAIA et al., 1996). O consumo interno é mantido basicamente pelas pêras oriundas do Chile, Argentina, Espanha, Portugal e Estados Unidos. O Brasil importa anualmente cerca de 170 mil toneladas de pêra, destas 50 toneladas são de pêra japonesa; sendo que o Chile é o maior exportador desta frutífera(A EMBRAPA/COOPERAÇÃO INTERNACIONAL, 2008).

No Sul do Brasil, a cultura da pereira tem grande potencial de expansão, pois pode-se, aproveitar as infra-estruturas de processamento e armazenamento a frio instalados para a cultura da macieira, sendo assim, ótima opção para a diversificação da fruticultura, da mesma forma que é feito em países tradicionalmente produtores (EPASC/EMATER, 1988; RIBEIRO et al., 1991).

Como ocorre em maçãs, apenas algumas cultivares são responsáveis pela maioria da produção mundial (WESTWOOD, 1982). Entre 2001 e 2005, a produção brasileira de pêra foi de aproximadamente 20.230 toneladas, onde o Rio Grande do Sul contribuiu com 45,7% do total, ocupando posição de destaque como principal produtor (FAO, 2007). Conforme cita FAO (2007), em 2005, os principais países produtores de pêra foram China, que teve uma produção média de 59,9% do total mundial, Itália (4,8%), Estados Unidos (3,9%), Espanha (3,4%) e Argentina (2,7%).

Atualmente as cultivares plantadas no Rio Grande do Sul são: Abate Fetel, Carrick, Cascatense, Clapp's Favorite, Forelle, Garber, Hosui, Kieffer, Kosui, Le Conte, Max Red Bartlett, Packham's Triumph, Nijisseiki, Nitaka, Rocha, Santa Maria, Seleta, Shinseiki, Shinsui, Smith, Suissei, Teen, Tenra, Triunfo e Ya Li (WREGE et al., 2006).

2.3 - Melhoramento genético

Segundo Borém (2001), no melhoramento de plantas não existem métodos únicos para obtenção de objetivos específicos no desenvolvimento de novos cultivares, pois se trata de uma ciência biológica. O melhoramento de plantas é a estratégia mais importante para contribuir com o progresso de caracteres específicos (LAYNE; QUAMME, 1975) e aumentar a produtividade, considerando a sustentabilidade e o equilíbrio ecológico.

A pereira tem uma longa história que aborda o melhoramento das espécies européias (*P. communis*) e asiáticas (*P. pyrifolia*). Com o melhoramento desta cultura busca-se frutos de qualidade e que tenham capacidade de armazenamento, produção consistente, resistência a doenças como, por exemplo, a clorose, e compatibilidade entre copa e porta-enxerto (BELL et al., 1996).

Para as pereiras, os programas de melhoramento estão voltados para a qualidade do fruto, ainda que atributos organolépticos possam diferenciar de um país para outro. É o que acontece entre as pereiras européias em relação às pereiras asiáticas. Nos dois casos, as cultivares com adequada adaptação e resistentes a pragas e doenças, apenas são aceitáveis se possuírem características desejáveis de fruto (SAWAZAKI et al., 2002).

Assim como outras plantas frutíferas, as cultivares de pereira devem ser enxertadas sobre porta-enxertos selecionados, uma vez que têm alto nível de heterozigose, não podendo ser exatamente multiplicadas por sementes, (CHEVREAU; SKIRVIN, 1992).

Os porta-enxertos mais utilizados são os de origem clonal ou de sementes (“seedling”, pé-franco) (GOMES, 2007; LEITE; DENARDI, 1992). A utilização de porta-enxertos clonais confere uniformidade aos pomares, oferece resistência a pragas e doenças, e também precocidade na frutificação, produtividade e controle do vigor da planta (LEITE; DENARDI, 1992).

Os porta-enxertos para pereira podem ser de várias espécies diferentes de *Pyrus*, sendo alguns de gêneros diferentes (WESTWOOD, 1978). Os dois tipos de porta-enxertos clonais mais conhecidos são o marmeleiro (*Cydonia oblonga*) e seleção a partir do cruzamento Old Home x Farmingdale (OH x F) (*Pyrus communis*), este último é compatível com as principais cultivares de pereira (BURKART, 1991).

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), tem se destacado como porta-enxerto para a cultura da pereira, pois induz menor crescimento vegetativo das plantas (LORETI; MASSAI, 1998), precocidade de produção e ainda aumenta a densidade floral (SALAYA, 1999); porém sua desvantagem é não ser compatível com todas as cultivares de pereira (BURKHART, 1991).

Embora existam poucas informações a respeito de seu uso como porta-enxerto nas condições edafoclimáticas brasileiras (SIMONETTO; GRELLMANN, 1988; CAMPO-DALL'ORTO et al., 1996), são aconselháveis para solos férteis e úmidos e de baixada, visto que tem o sistema radicular superficial e com menor expansão em relação à *P. calleryana*. Geralmente proporciona entrada em produção mais precoce, com alto nível de eficiência produtiva (MARANGONI; MALAGUTI, 2002; GOMES, 2007).

Os porta-enxertos de *P. calleryana* (Dcne.) e *Pyrus betulaefolia* Bge., comumente utilizados no Brasil, são adequados para solos argilosos e têm alto vigor, o que acaba induzindo um vigor exagerado na cultivar copa, dificultando o manejo das plantas e retardando a entrada em frutificação (LORETI; MASSAI, 1998).

O porta-enxerto *P. calleryana* em solos arenosos apresenta crescimento moderado (LEITE; DENARDI, 1992; LORETI; GIL, 1994). Apresenta resistência às temperaturas extremamente baixas. É resistente à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*) e entomosporiose (*Entomosporium maculatum*), é precoce e bastante vigoroso. Também é resistente ao declínio e ao fogo bacteriano (*Erwinia amylovora*), doenças importadas dos Estados Unidos e da Europa, porém não constatadas no Brasil (LEITE; DENARDI, 1992). O porta-enxerto *P. betulaefolia* também é resistente ao declínio e ao fogo bacteriano (LEITE; DENARDI, 1992) e, é tolerante às temperaturas extremamente baixas nos locais de produção de clima frio (BURKHART, 1991).

No Brasil as pereiras utilizadas como cultivares copa são: pereiras européias (*P. communis* L.), pereiras japonesas (*P. pirifolia* (Burn). Nak.) e pereiras chinesas (*P. bretschneideri* Rehd.) (FAORO; 2001; NAKASU; FAORO, 2003). Algumas cultivares de pereira que foram utilizadas na realização deste trabalho estão descritas a seguir:

*** Pêras européias**

- 'Packham's Triumph' - Gerada através dos cruzamentos entre 'Uvedale St. Germain (Bell)' x 'William's'. É originária da Austrália. (NAKASU; FAORO, 2003). Foi introduzido nos Estados Unidos no ano de 1945 e na França em 1946 (MORETTINI et al., 1967). É uma planta vigorosa e semi-expansiva. Suscetível à entomosporiose

(*Entomosporium mespeli* (DC) Sacc e também à sarna (*Venturia* sp.) (NAKASU; FAORO, 2003).

- 'William's' ou 'Bartlett' - Originária da Inglaterra, conhecida desde 1970 e de progênie desconhecida (NAKASU; FAORO, 2003; PEAR, 2008). Nos Estados Unidos é a cultivar mais plantada, tanto para consumo *in natura* como para a industrialização. A planta apresenta vigor e tamanho médios. É moderadamente resistente à entomosporiose (NAKASU; FAORO, 2003). Esta cultivar é praticamente auto-incompatível, e boas polinizadoras para ela são: 'Abbé Fétel', 'Butirra Clairgeau', 'B. d'Anjou', 'B. d'Hardenpont', 'B. Giffard', 'B. Hardy', 'Conference', 'Coscia', 'Decana del Comizio', 'Decana d'inverno', 'Dr. J. Guyot', 'Duchessa d'Angoulême', 'Favorita di Clapp', 'Imperatore Alessandro', 'Buona Luisa d'Avranches', 'Passa Crassana', 'Precoce di Trévoux' (MORETTINI et al., 1967).

- 'Red Bartlett' ou 'William's Vermelha' - Esta cultivar é uma mutação de 'Bartlett'. A floração ocorre de meados de setembro a início de outubro (NAKASU; FAORO, 2003). É originária dos Estados Unidos (RED BARTLETT, 2008).

- 'Forelle' - Acredita-se que esta cultivar teve origem no norte da Saxônia, Alemanha, é conhecida desde 1670. Nos países de língua inglesa, geralmente é conhecida como Truta Pear e na Alemanha, é chamada de Forellenbirne. Planta moderadamente vigorosa e ereta; bastante sensível ao fogo bacteriano (PEAR, 2008). Esta cultivar produz pólen com pouca germinabilidade; boas polinizadoras para esta cultivar são: 'B. Espéren' e 'Madama Verté' (MORETTINI et al., 1967).

- 'Abbé Fétel' - Cultivar originada em 1866, na França. O fruto tem a pele fina, brilhante e vermelha do lado exposto ao sol (PEAR, 2008). Boas polinizadoras para esta cultivar são: 'B. Clairgeau', 'B. Giffard', 'B. Espéren', 'B. Hardy', 'Citron dês Carmes', 'Coscia', 'Direttore Hardy', 'D. J. Guyot', 'Duchessa d'Angoulême', 'Favorita di Clapp', 'Imperatore Alessandro', 'Buona Luisa d'Avranches', 'P. Crassana', 'Precoce di Trévoux', 'Presidente Roosevelt', 'William' (MORETTINI et al., 1967).

- 'Santa Maria' - Teve sua origem na Itália, no ano de 1951 (PEAR, 2008). Obtida através do cruzamento entre 'William' e 'Coscia'; é uma planta vigorosa e bastante fértil. Apresenta elevado grau de autocompatibilidade e é capaz de frutificar por partenocarpia. Boas polinizadoras para esta selação são: 'Abbé Fétel', 'Passa Crassana', 'Duchessa d'Angoulême', 'William's Precoce', 'William's, 'B. rosata', 'Imperatore Alessandro', 'B. Giffard', 'Coscia', 'B. Hardy', 'Monchallard', 'B. precoce Morettini' (MORETTINI, 1967).

*** Pêras japonesas**

- ‘Hosui’ - Pertencente à espécie *P. pyrifolia*, originada através dos cruzamentos entre (Kikusui x Yakumo) x Yakumo realizado em 1954 e seleccionados em 1963 (NAKASU; FAORO, 2003; PEAR, 2008). É vigorosa. Resistente à pinta-preta (*Alternaria alternata*) e tem média resistência à entomosporiose e é suscetível a sarna (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Kosui’ - Surgiu dos cruzamentos entre ‘Kikusui’ x ‘Wase Kozo’, realizado no Japão (NAKASU; FAORO, 2003). Foi lançada em 1959 (PEAR, 2008). Seu vigor é de médio a alto. Apresenta floração e fixação de frutas boas e superiores à ‘Housui’. Resiste a pinta-preta e ao ‘*Pear necrotic spot virus’*, resiste mediamente a entomosporiose e a sarna, porém é suscetível a seca-dos-ramos (*Dothiorella* sp.) (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Século XX’ ou ‘Nijisseiki’ - Originária do Japão, no ano de 1888 (PEAR, 2008). Em meio as cultivares japonesas esta é a mais popular. Em condições de pouca a média intensidade de frio hibernal apresenta pouco vigor. Tem boa resistência a entomosporiose, porém é suscetível a pinta-preta. Os mutantes dessa cultivar apresentam maior resistência a pinta-preta (‘Gold Nijisseiki’) ou para autofertilidade (‘Osanijisseiki’) (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Shinseiki’ - Esta cultivar foi lançada em 1945, é resultado do cruzamento entre ‘Nijisseiki x ‘Chojuro’ (PEAR, 2008). É proveniente do Japão. Esta planta é vigorosa e tolerante a entomosporiose (NAKASU; FAORO, 2003).

*** Pêra chinesa**

- ‘Ya-Li’ - Sua progênie é desconhecida. A planta é vigorosa e seu tamanho varia de médio a grande. É suscetível a pinta-preta e a sarna (NAKASU; FAORO, 2003). Foi lançada em março de 1955 como "Yarr Li", mas recentes importações têm utilizado a ortografia 'Ya Li'. Esta é uma antiga variedade, comumente cultivada no Shansi, Hopeh, Shantung e Honan Províncias do Nordeste da China (PEAR, 2008).

*** Híbridas**

- ‘Carrick’ - Proveniente do cruzamento entre as cultivares Seckel x Garber (BROOKS; OLMO, 1972). Obtida nos EUA. A planta desta cultivar é grande, vigorosa e produtiva (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Garber’- Esta cultivar teve origem antes de 1880 (PEAR, 2008).Foi obtida do cruzamento entre a pereira européia (*P. communis*) com a pereira japonesa (*P. pyrifolia*) (ALVARENGA; FORTES, 1985). Cultivar obtida nos EUA; as árvores desta cultivar apresentam grande vigor (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Cascatense’ - Resulta do cruzamento de ‘Packam’s Triumph’ x ‘Le Conte’; foi testada como Pyrus 9. Esta apresenta vigor médio e é suscetível a entomosporiose (NAKASU; FAORO, 2003).

- ‘Kieffer’ - Obtdida do cruzamento entre *P. communis x P. pyrifolia* (NAKASU; FAORO, 2003). Originada no ano de 1863, cultivada a partir de sementes de pêra chinesa por Peter Kieffer de Roxborough, na Pensilvânia; pouco resistente ao fogo bacteriano (PEAR, 2008). Esta cultivar é praticamente auto-incompatível, boas polinizadoras para ela são: ‘Andrea Desportes’, ‘B. Clairgeau’, ‘B. Giffard’, D. d’Alençon’, ‘Decana del Comizio’, ‘Duchessa d’Angoulême, ‘Favorita di Clapp’, ‘Imperatore Alessandro’ e ‘William’ (MORETTINI et al., 1967).

*** Seleções**

- ‘Coelho Borges’ - Obtida na Fazenda Socorro, no município de Vacaria/RS. É semelhante a cultivar Kieffer (Informação Verbal)[1].

- ‘Monte Bonito’ - Planta selecionada na região de Pelotas (Informação Verbal)[1].

- ‘Pyrus 1’ - Obtida do cruzamento entre ‘Garber’ x ‘Packham’s Triumph’(Informação Verbal)[1].

- Seleção 5.98, Seleção 6.93, Seleção 7.93, Seleção 9.93 e Seleção 96.13.07 - São híbridas, obtidas de cruzamentos entre pereiras do tipo européia e pereiras asiáticas (Informação Verbal)[1].

2.4 - Biologia floral

As gemas de pereira são mistas, pois apresentam a parte floral e a parte vegetativa na mesma estrutura. As folhas são serradas, crenadas ou inteiras, são involutas na gema e pecioladas, apresentando duas estípulas bem desenvolvidas na base (QUEZADA; NAKASU, 2003).

[1]Informação fornecida pelo Dr. Bonifácio H. Nakasu, em Pelotas, em 2008.

As flores são brancas e raramente rosadas. O cálice é composto de cinco sépalas e as pétalas, também em número de cinco, apresentam formato de unha. Apresentam de 20 a 30 estames com anteras comumente vermelhas (LAYNE; QUAMME, 1975). Os estiletes variam de dois a cinco e são livres, porém, estreitamente unidos na base. Os ovários são ínferos, tendo cinco lóculos com dois óvulos por lóculo, apresentando no máximo um conjunto com dez sementes por fruta (BELL et al., 1996; LAYNE; QUAMME, 1975). A pereira apresenta flores hermafroditas, característica muito comum em frutíferas de clima temperado, que geralmente são polinizadas por insetos (LEITE; SOUZA, 2003).

A eficiência do processo de polinização depende de fatores relacionados à cultura a ser polinizada, como, por exemplo, estrutura e morfologia da flor, horário de liberação do pólen, viabilidade e longevidade do pólen, período de receptividade do estigma, vida útil dos óvulos e concentração e conteúdo de açúcar total de seu néctar (FREITAS, 1996a/b; HARDER; THOMSON, 1989).

2.5 - Polinização

Na produção de muitas culturas agrícolas mundiais, a polinização é um fator essencial. Em escala global, mais de 80% das espécies vegetais e mais de 75% das plantas agrícolas dependem de animais para polinização (CORBET et al., 1991; KEVAN; IMPERATRIZ - FONSECA, 2002).

Polinização nada mais é que a transferência de grãos de pólen das anteras de uma flor para o estigma da mesma flor ou ainda, para uma outra flor da mesma espécie (CORBET et al., 1991); quando a polinização ocorre dentro da mesma cultivar chama-se de auto-polinização e, quando a polinização é entre duas cultivares, chama-se de polinização cruzada (LEITE; SOUZA, 2003).

A pereira possui flores hermafroditas, característica comum em fruteiras de clima temperado. A polinização desta cultura é influenciada por diversos fatores como, por exemplo, o agente polinizador, condições climáticas, períodos de florescimento das cultivares polinizadoras e ainda, a distância que o pólen deverá percorrer entre a flor de origem e a flor de destino; podendo ocasionar a queda das flores por não ocorrer fecundação. O grão de pólen germinado desenvolve o tubo polínico que cresce através do estilete até atingir o óvulo. Temperatura, nutrição mineral e compatibilidade genética

com o estilete são fatores que afetam o crescimento do tubo polínico; a fertilização do óvulo pelo gameta masculino é afetado por fatores genéticos, nutricionais e ambientais; e a longevidade do óvulo é controlada pelos fatores genéticos e nutricionais (LEITE; SOUZA, 2003).

Pode ser que o tipo de pólen utilizado, para realizar a polinização, afete a qualidade dos frutos, este efeito é chamado de metaxenia, porém, sabe-se que isto não ocorre em espécies caducifólias. No entanto, se a semente é a parte comestível dos frutos, o pólen pode afetar a qualidade dos mesmos (WESTWOOD, 1982). Para esta cultura, se a polinização for deficiente o resultado será a má conformação do fruto e menor número de sementes (SIMÃO, 1998).

Para haver a formação de sementes e frutos faz-se necessário que depois da polinização, um certo número de grãos de pólen que foram depositados no estigma da flor germinem e fertilizem o(s) óvulo(s) que constituem o ovário da flor, em um processo chamado de fertilização. Conforme Freitas (1997), quanto maior for o número de grãos de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior será a competição entre eles para fecundar os óvulos e maior será a percentagem de fertilização.

Para a obtenção de certa quantidade de frutos, a longevidade dos óvulos é bastante importante, pois, se a fecundação não ocorre em um período específico, mesmo que haja a polinização e o desenvolvimento do tubo polínico o saco embrionário perde sua viabilidade (WILLIAMS, 1965). A longevidade dos óvulos é variável, dependendo da temperatura, do estado nutritivo da planta e da espécie (WESTWOOD, 1982).

2.6 - Viabilidade do grão de pólen e desenvolvimento do tubo polínico

Os grãos de pólen contêm o gameta masculino da flor. Cada grupo ou espécie de plantas têm seu grão de pólen específico e, estes diferem em tamanho, forma e padrão ornamental na parede; tem a função de proteger o gameta masculino da desidratação, viabilizar a absorção de água e de substâncias estimulantes na fase de germinação e facilitar a aderência aos corpos de polinizadores ou à superfície do órgão feminino da flor. A parede do grão de pólen é formada por um dos materiais orgânicos mais resistentes na natureza (proteínas, aminoácidos, vitaminas principalmente a C e a niacina), pois resiste ao tempo geológico, ou seja, as várias transformações ocorridas

na paisagem terrestre, à decomposição por microorganismos, ao ataque de substâncias corrosivas (A CONTRIBUIÇÃO DA MELISSOPALINOLOGIA, 2006). Conforme Westwood (1982), algumas cultivares produzem grãos de pólen que são estéreis, apresentando baixa germinação. Em condições de campo, os grãos de pólen apresentam pouca longevidade e são viáveis apenas por algumas horas, pois são pouco resistentes as temperaturas moderadas, a alta umidade e a alta intensidade luminosa. Porém, os grãos de pólen têm a viabilidade assegurada durante vários anos, quando armazenados em baixas temperaturas e, com baixa intensidade luminosa e de umidade.

Geralmente não há necessidade de testes de viabilidade de pólen quando estes são colhidos em estágio adequado de desenvolvimento, porém existem muitos casos em que o pólen a ser utilizado pode ter sido colhido em outras regiões ou ainda, ser fornecido através de intercâmbio com outros países. Outro fator a ser considerado é a não-coincidência de floração, que muitas vezes torna imprescindível o armazenamento do pólen colhido em um ano, para ser utilizado no ano seguinte. Sendo assim, antes da utilização do pólen é aconselhável, testar a sua viabilidade (EINHARDT et al., 2006). A análise da fertilidade do pólen é indispensável para o melhoramento genético clássico, pois desta maneira se obtém maior sucesso nos cruzamentos (FLANKLIN et al., 1995). Por meio de técnicas de microscopia é possível analisar as características de germinação dos tubos polínicos e seu crescimento, e ainda analisar as hibridações efetivas em programas de melhoramento genético, exemplificando algumas formas de incompatibilidade (KEARS; INOUYE, 1993).

Em qualquer método de polinização, a viabilidade de pólen é considerada boa quando está entre 50% a 70%. No campo, o pólen é viável somente por algumas horas e apresenta um curto tempo de vida, pois está sob temperaturas moderadas, altas umidades e intensidade luminosa, e ainda está sujeito a receber aplicações de fungicidas, o que reduz sua viabilidade. À medida que o pólen começa a envelhecer a percentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos começam a diminuir, embora o pólen pareça inviável, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar uma moderada frutificação efetiva, não obstante apresente baixa percentagem de germinação (SCORZA; SHERMAN, 1995).

Existem diferentes métodos de se testar a viabilidade dos grãos de pólen: através de corantes, germinação *in vitro*, germinação *in vivo* e percentagem de frutificação

efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste. Para cultivares de pereira, após a deposição do grão de pólen, a germinação deste no estigma da flor é maior quando submetido a temperaturas em torno de 20°C e alta umidade (LEITE; SOUZA, 2003).

Dentre os fatores que afetam a germinação dos grãos de pólen de pereira pode-se considerar: o tempo, a temperatura e a adição de nutrientes ao meio de cultura. O tempo necessário e a temperatura adequada de incubação são fatores que influenciam significativamente na geminação de grãos de pólen; a temperatura de incubação também é responsável pela rapidez no desenvolvimento do tubo polínico. Lombard e Willimas (1972), observando o desenvolvimento dos tubos polínicos de pereira, constataram que a 5°C o desenvolvimento dos tubos polínicos requeria 12 dias, enquanto que a 15°C, necessitava de apenas dois dias e, também que os óvulos permaneciam viáveis durante 12 dias.

Worsley (1959), observando a germinação de grãos de pólen de *Pinus*, constatou que a 3°C esta ocorreu após oito dias, já a 15°C a germinação deu-se em dois dias e, a 30°C o início da germinação deu-se em seis horas. Vasilakakis e Porlings (1985), observaram que para a germinação de grãos de pólen *in vitro* de *Pyrus communis,* temperaturas abaixo de 15°C diminuem a germinação dos mesmos e, temperaturas entre cinco e 25°C favoreceram o desenvolvimento dos tubos polínicos. Em estudos, testando diferentes temperaturas (20, 24, 25 e 28ºC) para germinação de pólen de maracujazeiro, os melhores resultados foram atingidos quando utilizou-se a temperatura de 28ºC (SILVA, 1996). Para a cultura da pereira (Chagas et al., 2006a) e do pessegueiro (Chagas et al., 2006b), encontraram resultados semelhantes.

A adição de ácido bórico ao meio de cultura para promover a germinação dos grãos de pólen tem importância, mas suas respostas variam de acordo com a espécie em questão. Através de experimentos Thompson e Batjer (1950), verificaram que a adição de ácido bórico no meio de cultura aumentou a percentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado. Em estudos para avaliar a germinação de grãos de pólen de bromeliáceas, Parton et al. (2002), concluíram que o meio contendo 200 g L^{-1} de sacarose, 10 g L^{-1} de ácido bórico e 5 g L^{-1} de ágar, apresentaram os melhores resultados.

A adição de nitrato de cálcio no meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como, por exemplo, tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida (BHOJWANI;

BHATNAGAR, 1974). Em pesquisas sobre a emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo, houve a obtenção de bons resultados com concentração de 800 mg L^{-1} de cálcio (OLIVEIRA JÚNIOR, 1996).

Conforme Modlibowska (1945) existem três classificações para o desenvolvimento dos tubos polínicos de pereira e macieira:

1) Tubos polínicos incompatíveis - Desenvolvem-se lentamente ou podem ser inibidos no estigma ou estilete, principalmente em temperaturas altas (25 a 30°C) ou em temperaturas baixas (10 a 20°C);

2) Tubos polínicos semi-compatíveis - Têm desenvolvimento lento, até atingir o ovário, independente da temperatura e, raramente fertilizam os óvulos;

3) Tubos polínicos compatíveis - Desenvolvem-se lentamente a temperaturas baixas (10 a 15°C), em temperatura elevadas (25 a 30°C) há aceleração do seu desenvolvimento. Alcançam o ovário mais rápido que os semi-compatíveis e de maneira geral, ocorre a fertilização.

2.7 - Compatibilidade, incompatibilidade e pseudocompatibilidade em pereira

A maioria das espécies de *Pyrus* é autoestéril, interfértil, diplóide (2n=34, x=17) e alógamas (CRANE; LEWIS, 1940; QUEZADA; NAKASU, 2003; ZIELINSKI; THOMPSON, 1967). Existem algumas cultivares poliplóides, especialmente, em *P. communis* (LAYNE; QUAMME, 1975; QUEZADA; NAKASU, 2003; ZIELINSKI; THOMPSON, 1967). Algumas espécies são triplóides (2n=51, x=17); outras, em número mais reduzido, são tetraplóides (2n=68, x=17) (LAYNE; QUAMME, 1975; WESTWOOD, 1982); e ainda foram produzidas formas hexaplóides (2n=102, x=17) (LAYNE; QUAMME, 1975).

O fenótipo do pólen para a reação de incompatibilidade, no sistema gametofítico, é determinado pelo alelo, simbolizado pela letra S (MATTON et al., 1997), proveniente do Inglês *Self-incompatibility* que corresponde à auto-incompatibilidade (ALLARD, 1971).

Onorati e Tacchini (1969) mencionam que em fruticultura é essencial definir se uma planta tem capacidade de originar frutos sem a necessidade de utilização de uma polinizadora. Se houver a necessidade de uma cultivar polinizadora a mesma, deve produzir pólen viável, coincidir o período de florescimento e ter compatibilidade do alelo

S com as plantas produtoras (CERTAL et al., 1999; NEVES et al., 1997). A compatibilidade pode ser um problema, para a cultura, pois como a maioria das cultivares é de polinização cruzada, exige que em pomares comerciais sejam plantadas pelo menos duas cultivares, que devem ser compatíveis, para se obter produção desejável.

Conforme Hiratsuka e Tomita (1989); Modlibowska (1945), a incompatibilidade genética ocorre devido ao insucesso da interação entre o tubo polínico/grão de pólen em penetrar ou se desenvolver normalmente no estigma ou no tecido do ovário, pois o desenvolvimento do tubo polínico ocorre lentamente (WESTWOOD, 1982). A inibição do tudo polínico pode acontecer desde a germinação do pólen até a fertilização do óvulo (CARVALHO; RASEIRA, 1990; LEWIS; MODLIBOWSKA, 1942). Kajiura (1994); Lombard (1990) citam alguns exemplos de cultivares incompatíveis, como: 'Nijisseiki' e 'Kikusui', 'Kosui' e 'Shinsui', 'Yakumo' e 'Suisei', 'William's' com 'Seckel', 'Seckel' com 'William's', 'Russet William's' com 'Seckel'. A incompatibilidade gametofítica é o fator que dificulta os cruzamentos em pereiras (CRANE; LAWRENCE, 1952).

A auto-incompatibilidade gametofítica é um mecanismo controlado geneticamente que age impedindo a autopolinização e promovendo a polinização cruzada. É controlada por um locus multialélico (S-locus), que codifica glicoproteínas com atividade ribonucleásica (S-RNases), ou seja, devido a expressão do alelo S, pois o tubo polínico expressa um dos alelos *S* e, em contato com o pistilo, expressando este mesmo alelo, inibe ou mesmo paralisa o desenvolvimento do tubo polínico (BATLLE et al., 1995; BROOTHAERTS et al., 1995; OLIVEIRA, et al., 2000).

Existem alguns motivos que causam a auto-esterilidade de uma planta, como por exemplo: esterilidade devido a fatores morfológicos (atrofia de pistilo ou atrofia das anteras), esterilidade do pólen (devido a causas citológicas ou fisiológicas de nutrição), esterilidade das células sexuais femininas devido a causas citológicas e ainda pela auto e interincompatibilidade ou falta de afinidade genética (ONORATI; TACCHINI, 1969).

Grande parte das espécies vegetais apresenta flores hermafroditas, assim sendo, a autofertilização era descrita como conseqüência natural da constituição morfológica. Em 1910, Osterwalder, trabalhando com flores de 'Buena Luisa' foi o primeiro a determinar as causas da auto-incompatibilidade em pereiras e macieiras (ONORATI; TACCHINI, 1969). Darwin descreveu o fato de ocorrer auto-incompatibilidade em algumas espécies, constatando que a mesma beneficia a alogamia (RICHARDS, 1997).

A auto-incompatibilidade ocorre em aproximadamente 150 famílias de angiospermas hermafroditas, abrangendo cerca de 3.000 espécies; ocorrendo também em várias plantas de interesse econômico (BREWBAKER, 1957; RAMALHO et al., 1990). Este mecanismo ocorre espontaneamente em pereira européia *Pyrus communis*, assim com em outras espécies da família Rosaceae e, já são conhecidos vários alelos S de *Pyrus communis* (ZISOVICH et al., 2004; ZUCCHERELLI et al., 2002).

A pseudocompatibilidade considerada como condição não genética que é influenciada pelas condições ambientais externas, como por exemplo, temperatura ou por alguma condição interna relacionada com a idade da flor (EGEA; BURGOS, 1996). É interação entre fatores ambientais e fisiológicos que permitem a ocorrência de fertilização entre cultivares incompatíveis (LARSEN, 1983; WILLIAM; MAIER, 1977).

De acordo com Ramalho et al. (1996), nos tecidos das flores femininas, principalmente no estigma, há a formação de uma glicoproteína, por um determinado alelo S, que também determina sua formação na célula mãe do pólen ou no grão de pólen, desta maneira a polinização promoverá a combinação de ambas moléculas, formando dímeros.

Em sistemas compatíveis, há síntese de um polissacarídeo, a calose, enquanto o tubo polínico se desenvolve, sendo depositada na parte basal do mesmo. Sendo assim, pode ser que mecanismo de rejeição envolva a destruição da parede interna do estilete, promovendo o acúmulo destas partículas. Ou ainda, o aumento da calose pode ocorrer devido a degeneração prematura do citoplasma em resposta a inibição do crescimento do tubo polínico (VITI et al., 1997).

Para espécies que apresentam o mecanismo de incompatibilidade gametofítica, existe a inibição do desenvolvimento dos tubos polínicos no estilete, isto ocorre devido a um engrossamento na extremidade dos tubos polínicos, que podem romper-se pela deposição de calose (RAMALHO et al., 1996; WESTWOOD, 1982).

RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Os experimentos a campo foram desenvolvidos na Fazenda da Palma da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, RS, no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado (CPACT), Pelotas, RS, e também utilizou-se material coletado na Embrapa Uva e Vinho (CNPUV), no município de Vacaria, RS. Foram realizados experimentos de germinação *in vitro* e *in vivo*, em ambos os casos, foram utilizadas amostras de pólen de genótipos de pereira (*Pyrus* sp.).

Para os experimentos de germinação *in vitro*, no campo foram coletadas flores em estádio de balão (Figura 1), durante a primavera de diferentes anos. A coleta dos botões florais foi feita manualmente ou utilizando-se uma tesoura pequena. No laboratório, foi realizada a remoção das anteras dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel, por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen estivesse totalmente seco, desprendido das anteras. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro etiquetados e tampados com algodão. Em seguida foram colocados armazenados em dessecador mantido em freezer à temperatura de - 18°C. O meio de cultura utilizado foi o descrito por Medeiros (1979), composto de 100g L^{-1} de sacarose e 10g L^{-1} de ágar. O volume foi completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante quatro minutos. Após o preparo do meio de germinação, este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel. Utilizou-se lupa e o pincel (nº5) para distribuir homogeneamente os grãos de pólen sobre a superfície do meio de cultura nos anéis de PVC da lâmina. Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido no fundo, simulando uma câmara úmida. Os quatro experimentos realizados estão listados a seguir: 1° Experimento - As lâminas foram

colocadas em incubadora tipo BOD durante 2, 4 e 6 horas para avaliar a germinação *in vitro* de amostras de pólen de 14 genótipos (19 amostras), são eles: 'Abbé Fétel', 'Carrick', 'Cascatense', 'Kieffer', 'Packham's', 'Santa Maria', 'Século XX', 'Coelho Borges', 'Monte Bonito', 'Pyrus 01', Seleção 5.93 e Seleçõa 9.93. 2° Experimento - De acordo com os resultados do experimento anterior foram fixados os tempos de incubação para cada genótipo. As lâminas foram colocadas em incubadora tipo BOD durante: 1 hora a 20, 30 e 40°C, para avaliar a germinação *in vitro* das amostras de pólen dos genótipos de pereira 'Abbé Fétel', 'Carrick', 'Cascatense', 'Kieffer', 'Monte Bonito', 'Pyrus 01' e 'Santa Maria'; 2 horas a 20, 30 e 40°C para avaliar a germinação *in vitro* das amostras de pólen dos genótipos 'Abbé Fétel', 'Século XX' e Seleção 5.98; e, 4 horas a 20, 30 e 40°C para as amostrasde pólen dos genótipos 'Forelle', 'Hosui 01', 'Packham's', 'Coelho Borges' e Seleção 9.93. 3° Experimento - Acrescentou-se ácido bórico e nitrato de cálcio, em diferentes concentrações, ao meio de germinação compondo os seguintes tratamentos: T1 - 0 H_3BO_3/0 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T2 - 0 H_3BO_3/400 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T3 - 0 H_3BO_3/800 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T4 - 0 H_3BO_3/1200 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T5 - 200 H_3BO_3/0 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T6 - 200 H_3BO_3/400 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T7 - 200 H_3BO_3/800 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T8 - 200 H_3BO_3/1200 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T9 - 400 H_3BO_3/0 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T10 - 400 H_3BO_3/400 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T11 - 400 H_3BO_3/800 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}; T12 - 400 H_3BO_3/1200 $Ca(NO_3)_2$ mg L^{-1}. De acordo com os resultados dos experimentos anteriores foram fixados os tempos e as temperaturas de incubação para cada genótipo. As lâminas foram colocadas em incubadora tipo BOD durante: 1 hora a 20°C para avaliar a germinação *in vitro* das amostras de pólen dos genótipos 'Carrick', 'Pachkham's' e 'Monte Bonito'; 2 horas a 20°C para avaliar a germinação *in vitro* da cultivar Abbé Fétel; 1 hora a 30°C para avaliar a germinação *in vitro* da cultivar Cascatense; 2 horas a 30°C para avaliar a germinação *in vitro* para a cultivar Século XX; 4 horas a 20°C para avaliar a germinação *in vitro* dos os genótipos 'Forelle1, 'Hosui 01', 'Coelho Borges' e Seleção 9.93. 4° Experimento - Avaliou-se a germinação de grãos de pólen *in vitro* de 6 genótipos de pereira: 'Carrick', 'Kieffer', Seleção 6.93, Seleção 7.93, Seleção 9.93 e *Pyrus calleryana,* em função da adição de ácido bórico, nas concentrações de 0, 100 e 200 mg L^{-1}, ao meio de cultura e de diferentes horas (1, 2 e 4) e temperaturas de incubação 20 e 30°C). Para os quatro experimentos a avaliação da percentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Considerou-se germinados os

grãos de pólen que apresentavam o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

Para os experimentos de germinação *in vivo*, para executar-se as polinizações aguardou-se até que os genótipos a serem polinizados apresentassem número suficiente de flores em estádio de balão para compor os tratamentos (Figura 1). No campo, os tratamentos realizados foram autopolinização e polinização livre; no primeiro caso os ramos foram ensacados com TNT (Tecido Não Tecido), sustentados por estruturas adaptadas, feitas a partir de círculos em arame, e, identificados com fitas plásticas amarradas na borda. Os ramos designados para polinização livre, foram apenas identificados com fitas de plástico (Figura 2). Ainda com relação à germinação de grãos de pólen *in vivo*, foram coletados ramos com flores em estádio de balão e estes foram levados para o laboratório, onde realizou-se autopolinização e polinização cruzada. Para avaliar a compatibilidade entre os genótipos observou-se o crescimento do tubo polínico no estigma das flores 120 horas depois da polinização; com o auxílio de um microscópio óptico foram estabelecidas onze etapas de percurso de acordo com o desenvolvimento do tubo polínico. Os experimentos realizados estão listados a seguir: 1° Experimento - Comportamento do porta-enxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) quanto à polinização autopolinização e a polinização cruzada com a cultivar Abbé Fétel; 2° Experimento - Comportamento de seleções (6.93, 7.93, 9.93 e 96.13.07) e cultivares (Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams) de pereira (*Pyrus* sp.) quanto à polinização: Seleção 6.93 (autopolinização de campo, autopolinização de laboratório e polinização livre); Seleção 7.93 (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); Seleção 9.93 (autopolinização e polinização livre); Seleção 96.13.07 (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); 'Red Bartlett' (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); 'Kieffer' (autopolinização de campo, autopolinização de laboratório, polinização livre e polinização cruzada com 'Carrick'); 'Shinseiki' (autopolinização, polinizações cruzadas com 'Abbé Fétel', 'Forelle', 'Kieffer'); 'Williams' (autopolinização e polinizações cruzadas com 'Abbé Fétel', 'Carrick', 'Forelle', 'Packham's' e 'Kieffer').

Figura 1 - Estágio de desenvolvimento dos botões florais utilizados para a realização dos experimentos de germinação dos grãos de pólen de pereira. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Figura 2 - Tratamentos realizados a campo em pereira (*Pyrus* sp.), Embrapa Clima Temperado (CPACT), Pelotas. FAEM/UFPEL, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

ARTIGO 1 (Segundo as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

TEMPO DE INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE CULTIVARES COPA E SELEÇÕES DE PEREIRA

Ciane Xavier Gonçalves[1], Andrea De Rossi Rufato[2], Márcia Wulff Schuch[2], Juliana Degenhardt[3]

RESUMO - Neste trabalho objetivou-se avaliar a germinação *in vitro* do pólen de 14 genótipos de pereira (19 amostras), em diferentes tempos de incubação (2, 4 e 6 horas) em incubadora tipo BOD a 25°C. Foram utilizadas amostras de pólen de oito cultivares e seis seleções, provenientes de Vacaria, RS e Pelotas, RS. Os botões florais foram coletados em estágio de balão. Após a remoção das anteras e secagem dos grãos de pólen estes foram armazenados em dessecador a - 18°C. O meio de germinação utilizado foi composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar. Através dos resultados obtidos pôde-se concluir que as amostras C1 e C2, ambas de 'Abbé Fétel', comportam-se de maneira distinta, pois a C1 apresenta percentagem de germinação mais elevada quando incubada durante quatro (30,25%) e seis (26%) horas enquanto que para a C2, o tempo de incubação não influencia na percentagem de germinação. Para a amostra S3, a incubação durante seis horas é prejudicial, resultando em 28,5% de germinação; para a amostra S4 a incubação durante 4 horas é prejudicial, resultando em 18% de germinação. Para as amostras C1, C5 e S6 duas horas de incubação são prejudiciais, resultando em 16; 38,25 e 38% de germinação, respectivamente. De maneira geral, para os genótipos de pereira estudados, a percentagem de germinação depende do tempo e da amostra.

Termos para Indexação: *Pyrus* sp., amostras de pólen, botões florais, germinabilidade.

[1] Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: anexg@hotmail.com - Bolsista Capes
[2] Profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel
[3] Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

ARTICLE 1

INCUBATION TIME ON *in vitro* GERMINATION OF POLLEN GRAINS OF SCION CULTIVARS AND SELECTIONS OF PEAR

ABSTRACT - The work aimed to evaluate the *in vitro* germination of the pollen from fourteen pear genotypes (19 samples) at different times of incubation (2, 4 and 6 hours) in BOD incubator at 25°C. It was used pollen samples of eight cultivars and six selections from Vacaria, RS and Pelotas, RS. The flower buds were collected at balloon stage. After removing anthers and drying the pollen grain, they were stored into dissicator at -18°C. The used germination medium included 100 g L^{-1} sucrose and 10 g L^{-1} agar. Among the results, C1 and C2, both of 'Abbé Fétel', behave in a similar way. C1 shows higher percentage of germination when incubated during four (30,25%) and six (26%) hours, whereas C2 the incubation time does not affect the percentage of germination. Incubation during six hours for sample S3 and four hours for S4 were damaging to germination (28,5% and 18%, respectively). Two hours of incubation was damaging for the samples C1, C5 and S6 (16; 38,25 and 38%, respectively). In general, for the assessed pear genotypes the germination percentage depends on time and sample.

Index Terms: *Pyrus* sp., pollen samples, bud flowers, germinability.

INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus* sp.) é uma frutífera pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e ao gênero *Pyrus* (Janic & Moore, 1975; Lombard, 1982). Abrange mais de 20 espécies, todas nativas da Europa e da Ásia (Nakasu & Faoro, 2003). É uma fruta de clima temperado com grande expressão nacional, sendo a terceira fruta de maior consumo e a primeira em volume de importação (Faoro, 2001; Oliveira Junior & Manica, 2005).

As cultivares de pêra mais consumidas no mundo são classificadas em dois tipos: européias (*Pyrus communis* L.) e asiáticas ou japonesas (*Pyrus pyrifolia* var. Culta, *Pyrus bretschneideri* e *Pyrus ussuriensis*) (Faoro & Yasunobu, 2001).

Em fruteiras da família Rosaceae é comum à ocorrência de auto-incompatibilidade, sendo necessário o plantio de cultivares polinizadoras, para assegurar a frutificação. Estas

cultivares polinizadoras devem ser compatíveis e florescerem no mesmo período ao daquela a ser polinizada, devem ainda conter pólen viáveis em quantidade e qualidade para garantir a produção de frutos e, no pomar devem corresponder a 10% do total das plantas (Nakasu & Faoro, 2003; Ramalho et al., 1996).

A análise de viabilidade do grão de pólen visa à determinação de sua capacidade de germinação e fertilização, proporcionando informações para estimar a viabilidade do pólen em curto espaço de tempo (Nassar, 1991). Em programas de melhoramento genético, a germinação *in vitro* é o método mais utilizado para os testes de viabilidade de pólen (Marcellán & Camadro, 1996).

O método de germinação *in vitro* para testar a viabilidade de grãos de pólen é influenciado por diferentes fatores. Como por exemplo, diferenças entre espécies quanto às condições exigidas para a germinação do pólen, envolvendo, os componentes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação. A viabilidade do pólen também é influenciada pelo estádio de desenvolvimento da flor, no momento da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (Stanley & Linskens, 1974).

A condição do pólen pode ser testada através da germinação de pequenas amostras colocadas em algumas gotas de solução de 10% de sacarose e 10 mg L^{-1} de boro, geleificadas com 4-5% de ágar em temperatura em torno de 24°C (Thompson & Batjer, 1950). Geralmente quando o pólen apresenta menos de 30% de germinação resulta em um pegamento de frutos bastante reduzido (Hauagge & Bruckner, 2002).

Este experimento foi desenvolvido com o objetivo de determinar o período (horas) mais adequado de incubação para a germinação de grãos de polén *in vitro* de 14 genótipos de pereira.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UFPel, e no Laboratório de Melhoramento Vegetal, pertencente a Embrapa Clima Temperado, ambos em Pelotas, RS.

Foram utilizadas amostras de pólen de 14 genótipos (19 amostras), provenientes da Embrapa Uva e Vinho - Vacaria, RS e da Embrapa Clima Temperado - Pelotas, RS (Tabela 1).

As amostras foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 25°C, em ausência de luz. Foram testados três tempos de incubação (2, 4 e 6 horas).

Para os genótipos utilizados neste estudo, as flores em estágio de balão foram coletadas no campo, durante a primavera de diferentes anos (Tabela 1) e, estavam armazenados em dessecador a -18°C. A coleta dos botões florais foi realizada manualmente ou utilizando-se uma tesoura pequena; os botões florais foram armazenados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser realizada a remoção das anteras.

Em laboratório, com a fricção das flores em uma peneira fina de náilon, as anteras foram removidas dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel de aproximadamente 10 x 20 cm de área com altura de 2 cm, por cerca de 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen estivesse totalmente seco. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 5,0 cm de altura, etiquetados e tampados com algodão. Logo, foram colocados em dessecador que continha uma camada de sílica gel no fundo, com o propósito de absorver a umidade do interior do recipiente. O dessecador, contendo os frascos com pólen, foi mantido em freezer à temperatura de -18°C.

O meio de cultura utilizado foi descrito por Medeiros (1979), constitui-se de sacarose (100 g L^{-1}) e àgar (10 g L^{-1}). O volume foi completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante 4 minutos. Após o preparo do meio de germinação este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a finalidade de distribuir homogeneamente os grãos de pólen, fez-se necessária a observação em lupa e o uso de um pincel (n°5), para que o pólen fosse aspergido sobre a superfície do meio de cultura nos anéis de PVC da lâmina.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido no fundo, simulando uma câmara úmida. As lâminas foram colocadas em incubadora tipo BOD, variando o tempo de incubação em duas, quatro e seis horas para a germinação dos grãos de pólen *in vitro* (Figura 1).

A avaliação da percentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Foram considerados germinados os

grãos de pólen que apresentavam o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. A contagem dos campos de visão do microscópio foi feita de acordo com a necessidade, para que se atingisse a soma de 100 grãos de pólen entre germinados e não germinados.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (contagem de 100 grãos de pólen cada) por amostra, sendo que as provenientes de Vacaria/RS e Pelotas/RS foram avaliadas separadamente. As médias foram submetidas à análise da variância através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação às amostras C1 (‘Abbé Fétel’) e C5 (‘Forelle’), descritas na Tabela 2, provenientes da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria/RS, observa-se que ambas apresentaram maior índice de germiação dos grãos de pólen *in vitro* quando incubadas durante quatro e seis horas. E comparando-se as amostras, observa-se que indiferentemente do tempo de incubação testado, a amostra C5 apresentou maior percentagem de germinação, fator bastante negativo para a amostra C1, pois os níveis baixos de grãos de pólen viáveis podem representar um problema em pomares com apenas duas cultivares. Souza (1999), ao avaliar a percentagem germinação de grãos de pólen *in vitro* de oito cultivares de pereira, dentre elas a cultivar Hosui, durante três horas a 25°C±2°C em incubadora tipo BOD obteve percentagem intermediária de germinação com 41,27%. Hirano & Nakasone (1969); Teaotia et al. (1970); Raseira & Raseira (1996), ao avaliarem a germinação de grãos de pólen de araçazeiro, concluíram que esta espécie necessita de períodos de incubação desde quatro até 13 horas. Observa-se, portanto, que o tempo de incubação para o início da germinação de grãos de pólen *in vitro* é muito variável conforme a espécie e ainda, entre cultivares da mesma espécie ou até mesmo com as amostras da mesma cultivar.

Na Tabela 3, referente aos genótipos oriundos da Embrapa Clima Temperado, Peloras/RS, pôde-se observar que as amostras C2 (‘Abbé Fétel’), C3 (‘Carrick’), C6 (‘Kieffer’), C7 (‘Pakham’s 01’), C9 (‘Século XX’), S1 (‘Coelho Borges’), S2 (‘Monte Bonito’) e S5 (Seleção 5.98), comportaram-se da mesma maneira, ou seja, não houve diferença estatística na germinação de grãos de pólen sob os três diferentes períodos de incubação. Com relação à amostra C3 constatou-se que seu índice de germinação variou entre 30,75 e 39,25%, diferindo

dos resultados encontrados por Souza (1999), que testando a germinação de grãos de pólen da cultivar Carrick obteve 53,17%. No entanto, é necessário ressaltar que o pólen avaliado nesse estudo foi coletado em 2003 e que essa mesma amostra apresentou percentagem de germinação de 65% em 2004, um ano após seu armazenamento (Informação Verbal)[1]. Também com relação à amostra C6, verificou-se que a média de percentagem de germinação variou entre 31,75 e 39,75, tais resultados diferem dos encontrados por Souza (1999), quando testou a germinação de grãos de pólen *in vitro* de oito cultivares de pereira, dentre elas a cultivar Kieffer, a 25°C±2°C, durante três horas em incubadora tipo BOD, pois obteve uma percentagem de germinação relativamente alta (58,52%).

Para a amostra S4 (‘Santa Maria’) as maiores percentagens de germinação foram obtidas quando as mesmas foram incubadas durante duas ou seis horas. Para as amostras C4 (‘Cascatense’) e S3 (‘Pyrus 1’), observou-se que as maiores percentagens de germinação foram encontradas quando os grãos de pólen foram incubados durante duas e quatro horas. Enquanto que para a amostra S6 (Seleção 9.93), a maior percentagem de germinação foi obtida quando incubada durante quatro e seis horas. Importante salientar que a amostra C4, foi coletada no ano de 1999 e que três anos após sua coleta, a germinação foi de 58% (Informação Verbal)[2]. E que apresentou reseultados semelhante aos obtidos por Souza (1999) testando germinação de grãos de pólen *in vitro* de oito cultivares de pereira, que obteve 45,66% de germinação para a cultivar Cascatense, quando incubada a 25°C±2°C durante três horas em estufa tipo BOD.

Quando relacionou-se os genótipos estudados, observou-se que a amostra C9 (‘Século XX’) apresentou maior percentagem de germinação quando incubada durante 6 horas, resultados que se aproximam dos encontrados por Nunes et al. (2001), que estudando o pólen de duas cultivares de macieira constataram que duas horas de incubação não foram satisfatórias para germinação *in vitro* havendo a necessidade de elevar o período de incubação para cinco horas, indicando que o tempo de incubação varia entre as espécies.

A amostra C7 (‘Pakham’s 01’) teve as maiores percentagens de germinação quando incubada durante duas e seis horas. Knight Junior & Winters (1962) ao estudarem o maracujá-amarelo constataram que o tubo polínico alcançou o comprimento de quatro a sete vezes maior que o diâmetro do grão de pólen, aproximadamente uma hora após a polinização. E a amostra S2 (‘Monte Bonito’) manteve sua taxa de germinação nos três tempos testados. Silva et al.

[1] Informação fornecida por Drª. Maria do C. B. Raseira, a partir de testes de germinação de grãos de pólen realizados no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, em Pelotas, em 2004.
[2] Informação fornecida por Drª. Maria do C. B. Raseira, a partir de testes de germinação de grãos de pólen realizados no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, em Pelotas, em 2002.

(1999), na busca por temperaturas ideais, tempo (17 e 48 horas) e meio de incubação para a germinação de grãos de pólen de maracujazeiro amarelo, que não observaram diferença significativa para tempo de incubação nem para as interações.

CONCLUSÕES

As amostras C1 e C2, ambas de 'Abbé Fétel', comportam-se de maneira distinta, pois a C1 (proveniente de Vacaria) apresenta percentagem de germinação mais elevada quando incubada durante quatro (30,25%) e seis (26%) horas enquanto que para a C2 (proveniente de Pelotas), o tempo de incubação não influencia na percentagem de germinação.

Para a amostra S3 ('Pyrus 1'), a incubação durante seis horas é prejudicial, resultando em 28,5% de germinação; para a amostra S4 ('Santa Maria') a incubação durante 4 horas é prejudicial, resultando em 18% de germinação.

Para as amostras C1 ('Abbé Fétel'), C5 ('Forelle') e S6 (Seleção 9.93) duas horas de incubação são prejudiciais, resultando em 16; 38,25 e 38% de germinação, respectivamente.

De maneira geral, para os genótipos de pereira estudados, a percentagem de germinação depende do tempo e da amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAORO, I. D. Morfologia e fisiologia. In: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa.** Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. p.67-94.

FAORO, I. D. YASUNOBU, Y. Cultivares e porta-enxertos de pereira japonesa. **JICA Boletim Informativo**, Caçador, n.3, p.7, 2001.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. Macieira. In: **Melhoramento de fruteiras de clima temperado**. Viçosa: UFV, 2002. p. 27-88.

HIRANO, R.T.; NAKASONE, H.Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount-Vernon, v.94, n.2, p.83-86, 1969.

JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. Indiana: West Lafayette. Purdue University Press, 1975. p.38-70.

KNIGHT JUNIOR, R. J.; WINTERS, H.F. Pollination and fruit set of yellow passion fruin Southern Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.75, p.412-418, 1962.

LOMBARD, P. B. Pear ation and fruit set. In: Van Der Zet.; Childers, N. F. **The pear**. Gainesville, Florida: 1982, p.91-103.

MARCELLÁN, O.N.; CAMADRO, E.L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n.67, p.101-104, 1996.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro *(Prunus persica* (L.) Batsch). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 5, Pelotas, 1979. **Anais...** Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p. 407-416.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: **Frutas do Brasil-46** - Pêra Produção. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.29-36.

NASSAR, N. M. A. **Melhoramento genético de plantas frutíferas e mandioca**. Brasília: E. Thesaurus, 1991. 98p.

NUNES, J.C.O.; DANTAS, A. C. de M.; PEDROTTI, E.L.; ORTH, A.I. & GUERRA, M.P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, M.E.; MANICA, I. **Principais países produtores de frutas no ano de 2002**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/t-esta_iol0403.pdf>. Acesso em: 10 outubro 2005.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1996. p.131-146.
RASEIRA, M. do C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum***. Pelotas-RS: EMBRAPA/CPACT, 1996. 95p.

RASEIRA, M. do C.B. EMBRAPA/CPACT, Pelotas/RS. 2002. Informação Verbal.

RASEIRA, M. do C.B. EMBRAPA/CPACT, Pelotas/RS. 2004. Informação Verbal.

SILVA, M. M. da; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos - **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Pelotas, 1999.

SOUZA, C. M. de. **Incompatibilidade Gametofítica em cultivares de pereira (*Pyrus* spp).** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas/FAEM 1999. 44f. Tese (Doutorado em Agronomia), 1999.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H.F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Berlin: Heidelberg, 1974. 307p.

TEAOTIA, S. S.; PHOGOT, K.P.S.; SRISVATAVA, V.S. Blosson biology studies in *Psidium* species. **Progressive Horticulture**, Uttar Pradesh, 1970, v.2, n.3, p.101-112.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.56, p.227-230,1950.

Tabela 1 - Grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira utilizados para testar o tempo de incubação em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipo	Amostra	Data coleta pólen	Procedência
Cultivares	Abbé Fétel	C1	10/09/2006	Vacaria
	Abbé Fétel	C2	13/09/2006	Pelotas
	Carrick	C3	06/10/2003	Pelotas
	Cascatense	C4	09/08/1999	Pelotas
	Forelle	C5	Sem data	Vacaria
	Kieffer	C6	03/11/2006	Pelotas
	Packham's 01	C7	Sem data	Pelotas
	Santa Maria	C8	Sem data	Pelotas
	Século XX	C9	Sem data	Pelotas
Seleções	Coelho Borges	S1	1°/10/2003	Pelotas
	Monte Bonito	S2	1°/09/2006	Pelotas
	Pyrus 1	S3	19/08/1999	Pelotas
	Seleção 5.98	S4	03/11/2006	Pelotas
	Seleção 9.93	S5	30/09/2004	Pelotas

Tabela 2 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copo de pereira, provenientes de Vacaria, incubados durante 2, 4 e 6 horas a 25°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	**Amostra**	**Tempo (horas)**		
			2	**4**	**6**
Cultivares	Abbé Fétel	C1	16,00 B b	30,25 B a	26,00 B a
	Forelle	C5	38,25 A b	45,00 A a	41,75 A a
CV (%)			**09,21**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira, provenientes de Pelotas, incubadas durante 2, 4 e 6 horas a 25°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	Amostra	Tempo (horas)		
			2	4	6
Cultivares	Abbé Fétel	C2	33,75 C a	28,00 FG a	30,25 C a
	Carrick	C3	30,75 C a	39,25 BCDEF a	34,75 C a
	Cascatense	C4	32,50 C a	44,00 ABCD a	35,75 C ab
	Kieffer	C6	39,75 BC a	31,75 EF a	36,50 BC a
	Packham's 01	C7	57,75 A a	50,00 AB a	56,00 A a
	Século XX	C9	51,25 AB a	49,25 ABC a	54,50 A a
Seleções	Coelho Borges	S1	29,75 C a	35,75 DEF a	33,75 C a
	Monte Bonito	S2	62,75 A a	55,50 A a	60,00 A a
	Pyrus 1	S3	29,50 C ab	37,75 CDEF a	28,50 C b
	Santa Maria	S4	33,75 C a	18,00 G b	33,50 C a
	Seleção 5.98	S5	31,00 C a	27,75 FG a	26,50 C a
	Seleção 9.93	S6	38,00 C b	43,00 BCDE ab	48,50 AB a
CV (%)			**13,11**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

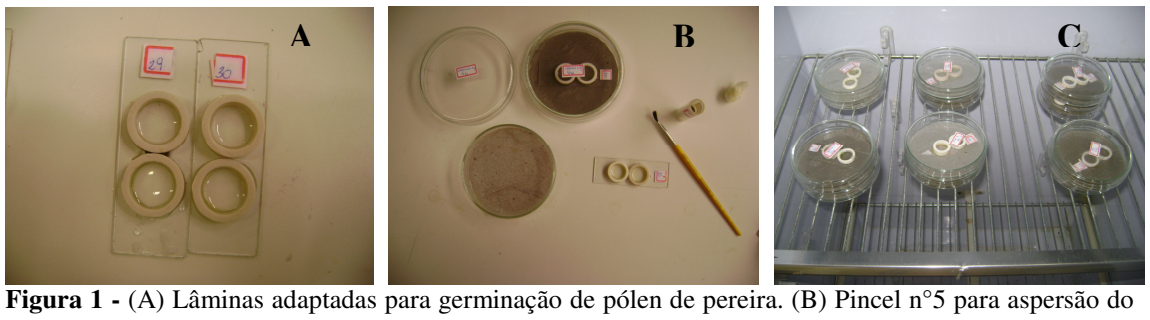

Figura 1 - (A) Lâminas adaptadas para germinação de pólen de pereira. (B) Pincel n°5 para aspersão do pólen nas lâminas. (C) Placas de Petri® que funcionam como câmara úmida, contendo as lâminas em incubadora tipo BOD. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

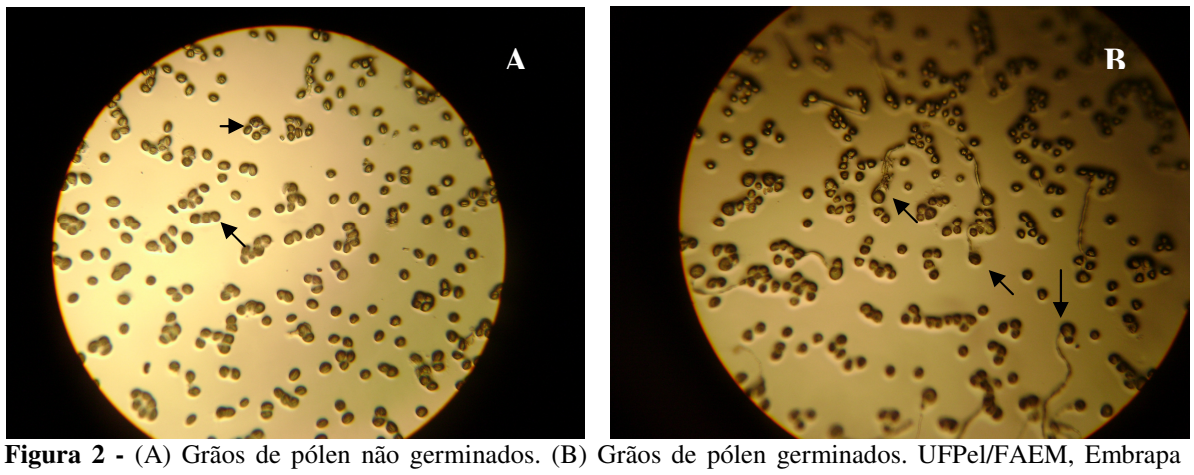

Figura 2 - (A) Grãos de pólen não germinados. (B) Grãos de pólen germinados. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

ARTIGO 2 (Segundo as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE CULTIVARES COPA E SELEÇÕES DE PEREIRA

Ciane Xavier Gonçalves[1], Andrea De Rossi Rufato[2], Márcia Wulff Schuch[2], Juliana Degenhardt[3]

RESUMO - O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência da temperatura de incubação (20, 30 e 40°C) em incubadora tipo BOD sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira. O tempo de incubação utilizado variou para cada cultivar e seleção, de acordo com resultados do experimento anterior. Os botões florais foram coletados em estágio de balão. Após a remoção das anteras e secagem dos grãos de pólen estes foram armazenados em dessecador a -18°C. O meio de germinação utilizado foi o meio de cultura básico, composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar. Conclui-se que de maneira geral para os genótipos de pereira estudados, a incubação a 20°C é recomendável e a 40°C é prejudicial para a germinação. A temperatura de 30°C diminui a percentagem de germinação de algumas amostras como C1, incubada durante duas horas, C5 e C10 incubadas durante quatro horas, cujas percentagens de germinação foram de 16,75; 43,5 e 47,75, respectivamente.

Termos de Indexação: *Rosaceae*, frutífera, *Pyrus* sp.

[1]Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: anexg@hotmail.com - Bolsista Capes
[2]Profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel
[3]Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

ARTICLE 2

TEMPERATURE OF INCUBATION ON *in vitro* GERMINATION OF POLLEN GRAINS OF SCION CULTIVARS AND SELECTIONS OF PEAR

ABSTRACT - The present work was developed aiming to evaluate the influence of the incubation temperature (20, 30 and 40°C) (BDO incubator) on *in vitro* germination of pollen grains of scion cultivars and selections of pear. The time of incubation varied regarding cultivar and selection, according previous results. The flower buds were collected at balloon stage. After removing anthers and drying the pollen grain, they were stored into dissicator at -18°C. The germination medium was a basic culture medium, including 100 g L^{-1} sucrose and 10 g L^{-1} agar. In general, for the assessed pear genotypes the incubation at 20°C is recommended and at 40°C is damaging to germination. The temperature of 30°C reduces the percentage of germination of some samples, such as C1 incubated during two hours and C5 and C10 during four hours (16,75; 43,5 and 47,75 %, respectively).

Index Terms: *Rosaceae*, fruit crop, *Pyrus* sp.

INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus* sp.) tem origem no hemisfério Norte e compreende mais de 20 espécies, encontradas na Europa e nos países Asiáticos. É uma frutífera pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e ao gênero *Pyrus* (Janick & Moore, 1975; Lombard, 1992). Dentre as frutíferas de clima temperado, a pêra é considerada a terceira fruta de maior consumo e a primeira em volume de importação (Faoro, 2001; Oliveira Junior & Manica, 2005).

No Brasil, um dos fatores que contribuem para que esta fruteira apresente baixa produção está relacionado com a pouca adaptação climática, onde faz-se necessário o plantio de cultivares menos exigentes ao frio. De acordo com Nakasu & Leite (1990); Nakasu & Faoro (2003), para regiões com clima similar ao de Pelotas/RS, que tem um acúmulo de aproximadamente 400 horas de frio hibernal, as cultivares que apresentam melhor potencial são: ‘Carrick’, ‘Teen’, ‘Garber’, ‘Cascatense’, ‘Smith’, ‘Lê Conte’, ‘Triunfo’, ‘Seleta’, ‘Suisei’, ‘Shinsui’, ‘Kousui’, ‘Ya-Li’, ‘Bento Johbire’, ‘Século XX’ e ‘Okusankichi’. Já para as regiões mais frias, que têm frio hibernal de mais de 800 horas ou mais que 1.500 unidades de frio,

como é o caso de Vacaria/RS e São Joaquim/SC, as cultivares que apresentam maior potencial são: 'Carrick', 'Packham's' Triumph', 'William's', 'Max Red Bartlett', 'Suisei', 'Shinsui', 'Nijisseiki', 'Chojuro', 'Shinseiki', 'Niitaka', 'Housui' e 'Kousui' (Nakasu & Faoro 2003).

Para muitas espécies frutíferas da família Rosaceae, além da falta de adaptação, existe também o mecanismo de incompatibilidade, que impede que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando auto-polinizadas. Esta reação engloba desde o impedimento da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico (De Nettancourt, 1977a/1977b/2000; Heslop-Harrison, 1983; Leite & Souza, 2003).

A determinação da viabilidade de pólen pode ser feita através de um grande número de técnicas (Kearns & Inouye, 1993; Dafni, 1992). A determinação da viabilidade é considerada uma medida de fertilidade masculina muito empregada no monitoramento de pólen armazenado, de modo a garantir a fecundação, possibilitando os cruzamentos entre genótipos que tenham diferentes épocas de floração e que apresentem potencial econômico (Miranda 1993; Kearns & Inouye, 1993). Medeiros (1979), para avaliar a germinação *in vitro* de grão de pólen de pessegueiro, apresentou uma metodologia que consta num meio contendo 10 mg L^{-1} de ágar, 100 mg L^{-1} de sacarose.

As exigências para a germinação dos grãos de pólen *in vitro*, dependem das espécies a serem avaliadas, principalmente, com relação à temperatura, ao tempo de incubação e aos constituintes do meio de cultura (Stanley & Linskens, 1974). A temperatura é um fator bastante influente na germinação de grãos de pólen. Chagas et al. (2006a/b) evidenciaram o efeito da temperatura de incubação na germinação de grãos de pólen de espécies como pereira e pessegueiro.

Sendo assim, através do presente estudo objetivou-se avaliar a influência da temperatura de incubação em BOD sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares copa e seleções de pereira.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Clima Temperado - CPACT, Pelotas/RS.

Em função dos resultados obtidos em experimentos anteriores, foram utilizados tempos de incubação diferentes para os genótipos, resultando, portanto, em três experimentos.

No primeiro experimento foram testadas dez amostras de oito genótipos (Tabela 1). As placas de Petri® contendo os grãos de pólen foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) por 1 hora, a 20, 30 ou 40°C. No segundo experimento, foram testados grãos de pólen de quatro amostras de três genótipos, sendo duas cultivares copa e uma seleção. As placas de Petri® contendo os grãos de pólen foram incubadas durante 2 horas, a 20, 30 ou 40°C (Tabela 2). No terceiro experimento, foram testados grãos de pólen de sete amostras de seis genótipos, os quais estão descritos na Tabela 3. As placas de Petri® contendo os grãos de pólen foram incubadas em BOD durante o período de 4 horas, a 20, 30 ou 40°C.

Para os genótipos utilizados neste estudo, as flores em estágio de balão foram coletadas no campo, durante a primavera de diferentes anos (Tabelas 1, 2 e 3) e, estavam armazenados em dessecador a -18°C.

A coleta dos botões florais foi feita manualmente ou utilizando-se uma tesoura pequena; os botões florais foram armazenados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posterior a remoção das anteras.

Em laboratório, com a fricção das flores em uma peneira fina de náilon, as anteras foram removidas dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel de aproximadamente 10 x 20 cm de área com altura de 2 cm, por cerca de 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen estivesse totalmente seco, desprendido das anteras. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 5,0 cm de altura, etiquetados e tampados com algodão. Logo, foram colocados em dessecador que continha uma camada de sílica gel no fundo, com o propósito de absorver a umidade do interior do recipiente. O dessecador contendo os frascos com pólen foi mantido em freezer à temperatura de - 18°C. Conforme Medeiros (1976); Camargo (1978), a umidade relativa no interior do dessecador contendo ácido sulfúrico deve ser mantida entre 25 e 50%, utilizando-se uma solução composta de 23 mL de H_2SO_4 e 50 mL de água destilada.

Utilizou-se o meio de cultura, descrito por Medeiros (1979), composto de 100g L^{-1} de sacarose e 10g L^{-1} de ágar. O volume foi completado com água destilada e após a diluição da sacarose, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante quatro minutos. Após o preparo do meio de germinação, este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de

diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com a finalidade de distribuir homogeneamente os grãos de pólen, fez-se necessária a observação em lupa e o uso de um pincel, de n°5, para que o pólen fosse aspergido sobre a superfície do meio de cultura nos anéis de PVC da lâmina.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido no fundo, simulando uma câmara úmida. As lâminas foram colocadas em incubadora tipo BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40ºC para a germinação dos grãos de pólen *in vitro*.

A avaliação da percentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. A contagem dos campos de visão do microscópio foi feita para que se atingisse a soma de 100 grãos de pólen entre germinados e não germinados.

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (contagem de 100 grãos cada) por amostra avaliada. As médias foram submetidas à análise da variância através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4, observa-se que para as amostras C9 (‘Abbé Fétel’) e S2 (‘Monte Bonito’) as maiores percentagens de germinação foram obtidas quando os grãos de pólen foram incubados a 20 e 30°C, sendo que estatisticamente, não houve diferença significativa quando os grãos de pólen foram incubados as temperaturas de 30 e 40°C. Thompson & Batjer (1950), utilizaram a temperatura de 24°C para germinação de pólen de várias espécies como pereira, ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, e macieira. Também Franzon & Raseira (2006), ao estudarem a germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande constataram que não houve diferenças significativas entre as percentagens de germinação nas temperaturas de incubação de 25 e 30°C.

Para o restante das amostras avaliadas neste experimento quando incubadas nas temperaturas de 20 e 30°C a percentagem de germinação de grãos de pólen *in vitro* não diferiu estatisticamente; já quando submetidas à incubação de 40°C a percentagem de germinação

diminuiu. Resultados que se assemelham aos obtidos por Silva (1996), que ao testar diferentes temperaturas (20, 24, 25 e 28ºC) para germinação de grãos de pólen de maracujazeiro, obteve os melhores resultados quando os grãos de pólen foram incubados a 28ºC. Resultados semelhantes foram encontrados para pereira por Chagas et al. (2006a) e em pessegueiro por Chagas et al. (2006b). Também Silva et al. (2000), estudando viabilidade de pólen de genótipos de tomateiro constataram que quando a temperatura era aumentada de 30ºC para 35ºC, a percentagem de germinação era diminuída em cerca de 30%, se comparada com a temperatura de 25ºC. Confirmando o que foi relatado por Weaver (1989), que a viabilidade do pólen decresce quando a temperatura do ar excede 32ºC. Segundo Reghin (1996), temperaturas acima de 27ºC retardam tanto a germinação do pólen como o crescimento do tubo polínico.

Nas temperaturas de 20 e 30°C de incubação, o melhor índice de grãos de pólen viáveis foi apresentado pelas amostras C7 (‘Packham’s 01’) e S2 (‘Monte Bonito’) não diferindo estatisticamente entre si. Ainda em incubação de 30°C as amostras C3 (‘Carrick’), C4 (‘Cascatense’) e C6 (‘Kieffer’), apresentaram altas percentagens de germinação. Importante salientar que o pólen da amostra C3 (‘Carrick’) foi coletado no ano de 2003 e após um ano de armazenamento sua viabilidade foi de 65% (Informação Verbal)[1]

Mesmo em incubação a 40°C a amostra S2 (‘Monte Bonito’) continuou apresentando maior percentagem de germinação. A alta percentagem é característica favorável para essa seleção, que em condições de plantio comercial poderá ser utilizada como polinizadora para outra cultivar, desde que floresçam na mesma época. Galleta (1983), menciona que para frutíferas a temperatura ótima de germinação dos grãos de pólen está entre 20 e 30°C. Também Tabuenca (1965), diz que a temperatura ideal para a germinação de grãos de pólen está entre 15 e 21°C, e que acima de 26°C a capacidade germinativa é diminuída, tornando-se insuficiente para realizar-se a fecundação.

Na Tabela 5 pode-se observar que a amostra C1 (‘Abbél Fétel’) quando incubada a temperatura de 20°C teve maior percentagem de grãos de pólen viáveis, quando comparada às incubações a 30 e 40°C. Resultado semelhante foi observado por Silveira et al. (2007), que ao testarem a temperatura para a germinação *in vitro* de grãos pólen de três genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.), em incubação a 20°C obtiveram maior percentagem de germinação.

[1] Informação fornecida por Drª. Maria do C. B. Raseira, a partir de testes de germinação de grãos de pólen realizados no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, em Pelotas, em 2004.

As amostras C1 e C2 são provenientes de plantas de ‘Abbé Fétel’, ambas têm o mesmo mês e ano de coleta, porém são de localidades distintas, acredita-se que o último fator pode ter influenciado na percentagem de germinação, onde a C2 proveniente de Pelotas, teve estatisticamente, maior índice de germinação quando incubadas as temperaturas de 20 e 30°C.

De maneira geral, para os genótipos descritos na Tabela 5 observou-se que a temperatura de 40°C inibiu a germinação dos grãos de pólen *in vitro*. Resultados semelhantes aos de Ishihata (1983), que verificou que a temperatura adequada para a germinação de grãos de pólen de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis*) está entre 25 e 30°C, enquanto quase nenhuma germinação foi observada a 15 e 35°C. Também Loupassaki et al. (1997), citam que 25°C é a temperatura ideal para germinação de pólen de abacateiro e, esta mesma temperatura foi favorável para a germinação de pólen de macieira (Nunes et al., 2001).

Na Tabela 6, para a amostra C11 (‘Packham’s’) o aumento na temperatura de incubação não interferiu na percentagem de germinação dos grãos de pólen *in vitro*. Já para as amostras C5 (‘Forelle’) e C10 (‘Hosui’), a percentagem de grãos de pólen viáveis foi diminuída quando as mesmas foram incubadas nas temperaturas de 30 e 40°C. Enquanto as amostras S1 (‘Coelho Borges’) e S6 (Seleção 9.93) tiveram suas percentagens de germinação diminuídas quando incubadas a 40°C. Importante salientar que a coleta de pólen das amostras S1 e S6, ocorreram nos anos de 2003 e 2004, respectivamente; e após um ano de armazenamento a viabilidade dos grãos de pólen foi de 59% para a S1 e de 43% para a S6 (Informação Pessoal)[2]

As amostras C10 (‘Hosui’) e S6 (Seleção 9.93) apresentaram os maiores índices de grãos de pólen viáveis, independentemente da temperatura empregada. No caso da amostra S5, este fator é bastante relevante por se tratar de uma seleção, pois em plantio comercial poderá ser utilizada como polinizadora para outra cultivar. Levando em consideração a variação na germinação do pólen entre os diferentes materiais avaliados, os resultados são semelhantes aos encontrados por Moreira & Gurgel (1941) que observaram que, apesar de existir variações na viabilidade de pólen entre as variedades, locais de cultivo, porta-enxertos, épocas do ano, plantas e entre ramos da mesma planta, de modo geral, tais diferenças, são mínimas, e que, entre os genótipos, são encontradas as maiores diferenças.

[2] Informação fornecida por Drª. Maria do C. B. Raseira, a partir de testes de germinação de grãos de pólen realizados no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, em Pelotas, em 2004/2005.

CONCLUSÕES

De maneira geral para os genótipos de pereira estudados, a incubação a 20°C é recomendável e a 40°C é prejudicial para a germinação.

A temperatura de 30°C diminui a percentagem de germinação de algumas amostras como C1 (‘Abbé Fétel’), incubada durante duas horas, C5 (‘Forelle’) e C10 (‘Hosui’) incubadas durante quatro horas, cujas percentagens de germinação foram de 16,75; 43,5 e 47,75, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARGO, U. A. **Comportamento de algumas cultivares e seleções de macieira (*Malus pumila* Mill.), quanto à polinização, na região sul do Rio Grande do Sul**. 1978. 62f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1978.

CHAGAS, E. A.; PIO, R., BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; MENDONÇA, V.; SIGNORINI, G.; SCHIAVINATO, Y. O. Ajuste da concentração de ágar e sacarose para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina. In: CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais**... Lavras, 2006a

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, .A; NEDER, D. G.; CAVALLARI, L. L.; PASQUAL, M.; MENDONÇA, L.; CHAGAS, P. C. Efeito da temperatura na germinação de grãos de pólen de dois porta-enxertos de pereira. In: CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais…** Lavras, 2006b.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press, 1992. 250p.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin : Springer, 2000. 320p.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms.** Berlin : Springer, 1977a. 230p.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction,** v.10, p.185-199, 1977b.

FAORO, I. D. Nashi, a pêra japonesa, In: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa**. Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. p.15-65.

FRANZON, R. C. ; RASEIRA, M. do C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *eugenia involucrata* DC (*Myrtaceae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2006.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. *In*: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. cap.3, p.23-47.

HESLOP-HARRISON, J. Self-incompatibility: phenomenology and physiology. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.218, p.371-395, 1983.

ISHIHATA, K. On the pollen germination of purple passion fruit, Passiflora edulis Sims. **The Bulletin of Faculty of Agriculture Kagoshima University**, v.33, n.2, p.7-11, 1983.

JANICK, J.; MOORE, J. N. **Advances in fruit breeding.** Indiana: Purdue University Press. West Lafayette, 1975. 623p.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. **Techiniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993. 579p.

LEITE, D. L. ; SOUZA, C. M. de. Polinização. *In*: **Frutas do Brasil** - Pêra Produção. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.23-28.

LOMBARD, P. B. Pear pollination and fruit set. In: Van Der Zet, T.; Childers, N.F. **The pear: Florida –** Gainesville, 1992, p. 91-103.

LOUPASSAKI, M.; VASILAKAKIS, M.; ANDROULAKIS, I. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. **Euphytica**, 1997, v.94, p.247-251. Wageninge.

MEDEIROS, A. R. M. de **Sobre o efeito da temperatura e umidade relativa na percentagem de frutificação efetiva e influência da temperatura na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch).** 1976. 46f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1976.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro *(Prunus persica* (L.) Batsch). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 5., Pelotas, 1979. **Anais...** Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p. 407-416.

MIRANDA, I. P. A. A importância da conservação *in vitro* do pólen da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) Arecaceae para o melhoramento genético. Pp. 361-171. *In*: Ferreira, E. J. G; Santos, G. M.; Leão, E. L. M. & Oliveira, L. A. (Eds.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia**. SCT/INPA, 1993, v. 2, Manaus.

MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.1, p.669-711, 1941.

NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Indicação de porta-enxerto e cultivares de pereira para o sul do Brasil. **Horti Sul**, Pelotas, v.1, n.2, p.20-24, 1990.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: **Frutas do Brasil-46** - Pêra Produção. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.29-36.

NUNES, J. C. O.; DANTAS, A. C. M.; PEDROTTI, E.L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, M.E.; MANICA, I. **Principais países produtores de frutas no ano de 2002.** Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/t-esta_iol0403.pdf>. Acesso em: 10 outubro 2005.

RASEIRA, M. do C. B. EMBRAPA/CPACT, Pelotas/RS. 2004. Informação Verbal.

RASEIRA, M. do C. B. EMBRAPA/CPACT, Pelotas/RS. 2005. Informação Verbal.

REGHIN, M. Y. **Fisiologia do desenvolvimento das hortaliças em ambiente protegido.** Botucatu: Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1996. 12p. (mimiografado).

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. Departamento de Biologia aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras , v.12 n.2, 2000.

SILVA, M. M. da. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro** (*Passiflora edulis* Deg.)**,** 1996, 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, Brasil.

SILVEIRA, D. T.; ZAFALON, B. da S.; SOPEZKI, M. da S.; SILVA, S. D. dos A.; BOBROWSKI, V. L. Efeito do boro e da temperatura na germinação in vitro de pólen de mamona (*Ricinus communis* L.). *In*: XVI CONGRSSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. UFPel, Pelotas, 2007.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen:** biochemistry management. Berlin: Springer Verlag, 1974. 307p.

TABUENCA, M. V. Ifluencia del clima en plantaciones frutales. *In*: **Estacion Experimental de Aula Del Zaragosa**, 1965. 297p.

THOMPSON, A.H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.56, p.227-230, 1950.

WEAVER, M. L. Screening tomato for high-temperature tolerance through pollen viability testes. **HortScience,** v. 24, n.3, p.493-495, 1989.

Tabela 1 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante uma hora em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipo	Amostra	Data coleta pólen	Procedência
Cultivares	Abbé Fétel	C9	2007	Vacaria
	Carrick	C3	06/10/2003	Pelotas
	Cascatense	C4	09/08/1999	Pelotas
	Kieffer	C6	03/11/2006	Pelotas
Seleções	Monte Bonito	S2	1°/09/2006	Pelotas
	Pyrus 1	S3	19/08/1999	Pelotas
	Santa Maria	S4	Sem data	Pelotas

Tabela 2 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante duas horas em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipo	Identificação	Data coleta pólen	Procedência
Cultivares	Abbé Fétel	C1	10/9/2006	Vacaria
	Abbé Fétel	C2	13/09/2006	Pelotas
	Século XX	C8	Sem data	Pelotas
Seleção	Seleção 5.98	S5	03/11/2006	Pelotas

Tabela 3 - Grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados para testar a temperatura de incubação, durante quatro horas em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipo	Identificação	Data coleta pólen	Procedência
Cultivares	Forelle	C5	Sem data	Vacaria
	Hosui 01	C10	14/9/2006	Vacaria
	Packham's	C11	2007	Vacaria
Seleções	Coelho Borges	S1	1°/10/2003	Pelotas
	Seleção 9.93	S6	30/09/2004	Pelotas

Tabela 4 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de genótipos pereira incubados durante uma hora em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	**Amostra**	**Temperatura (°C)**		
			20	**30**	**40**
Cultivares	Abbé Fétel	C9	23,50 C a	16,75 D ab	05,75 C b
	Carrick	C3	43,75 B a	44,75 AB a	11,50 BC b
	Cascatense	C4	42,50 B a	48,00 AB a	25,50 B b
	Kieffer	C6	40,25 B a	45,75 AB a	12,00 BC b
	Packham's 01	C7	63,00 A a	58,50 A a	14,25 BC b
Seleções	Monte Bonito	S2	65,00 A a	56,50 A ab	46,00 A b
	Pyrus 1	S3	30,50 BC a	38,25 BC a	14,75 BC b
	Santa Maria	S4	31,00 BC a	24,50 CD a	04,00 C b
CV (%)			**22,08**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira incubados durante duas horas em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	**Amostra**	**Temperatura (°C)**		
			20	**30**	**40**
Cultivares	Abbé Fétel	C1	21,93 B a	03,26 C b	01,50 B b
	Abbé Fétel	C2	55,47 A a	28,86 B a	06,43 B b
	Século XX	C8	72,59 A a	95,20 A a	23,09 A b
Seleções	Seleção 5.98	S5	45,84 AB a	46,46 B a	06,52 B b
CV (%)			**21,69**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 6 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira incubados durante quatro horas em BOD, variando a temperatura em 20, 30 e 40°C. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	**Amostra**	**Temperatura (°C)**		
			20	**30**	**40**
Cultivares	Forelle	C5	57,25 A a	43,50 B b	35,75 AB b
	Hosui	C10	58,50 A a	47,75 AB b	40,25 A b
	Packham's	C11	13,00 B ab	18,50 B a	05,75 C b
Seleções	Coelho Borges	S1	56,50 A a	50,75 AB a	25,00 B b
	Seleção 9.93	S6	55,75 A a	57,75 A a	34,25 AB b
CV (%)			**14,66**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ARTIGO 3 (Segundo as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

ÁCIDO BÓRICO E NITRATO DE CÁLCIO NO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE CULTIVARES COPA E SELEÇÕES DE PEREIRA

Ciane Xavier Gonçalves[1], Andrea De Rossi Rufato[2], Márcia Wulff Schuch[2], Juliana Degenhardt[3]

RESUMO - O acréscimo de nitrato de cálcio e ácido bórico ao meio de cultura são importantes para promover a germinação e o alongamento do tubo polínico. Com a realização deste trabalho objetivou-se avaliar a germinação *in vitro* de grãos de pólen de sete cultivares copa e três seleções de pereira, procedentes de Vacaria/RS e de Pelotas/RS. A temperatura e o tempo de incubação foram estabelecidos para cada genótipo a partir de experimentos anteriores. Ao meio de germinação básico (100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar), acrescentou-se diferentes combinações de ácido bórico e nitrato de cálcio. Pôde-se concluir que o meio de cultura básico ou acrescido de 200 mg L^{-1} de ácido bórico promove elevados índices de germinação *in vitro* de grãos de pólen para as amostras C2, C3, C4, C5, C7, C9, S1, S2 e S5. As cultivares de pereira estudadas, de uma maneira geral respondem de modo semelhante à adição de ácido bórico e nitrato de cálcio ao meio de cultura, sendo que percentagem de germinação é dimunuída quando acrescenta-se a concentração de 1200 mg L^{-1} de nitrato de cálcio, independente da concentração de ácido bórico.

Termos de Indexação: *Rosaceae*, nutrientes para germinação, tubo polínico.

[1]Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: anexg@hotmail.com - Bolsista Capes
[2] Profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel
[3] Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

ARTICLE 3

BORIC ACID AND CALCIUM NITRATE IN THE CULTURE MEDIUM TO *in vitro* GERMINATION OF POLLEN GRAINS OF SCION CULTIVARS AND SELECTIONS OF PEAR

ABSTRACT - The adding of calcium nitrate and boric acid to the culture medium is important to promote germination and elongation of the pollen tube. The work aimed to evaluate the *in vitro* germination of pollen grains of seven scion cultivars and three pear selections from Vacaria/RS and Pelotas/RS. The temperature and incubation time were established to each genotype according previous experiments. Different combinations of boric acid and calcium nitrate were added to the basic germination medium (100 g L^{-1} of sucrose and 10 g L^{-1} of agar). In general, the pear cultivars similarly behave to the adding of boric acid and calcium nitrate in the culture medium. Furthermore, the crescent concentrations of calcium nitrate and boric acid in the culture medium inhibit *in vitro* germination of pollen grains of pear. Either basic culture medium or medium enriched with 200 mg L^{-1} of boric acid promote higher rates of *in vitro* germination of pollen grains for the samples C2, C3, C4, C5, C7, C9, S1, S2 and S5. In general, the assessed pear cultivars respond similarity to the addition of boric acid and calcium nitrate to the culture medium. The percentage of germination decreases when adding 1200 mg L^{-1} of calcium nitrate, independently boric acid concentration.

Index Terms: *Rosaceae,* nutrients for germination, pollen tube.

INTRODUÇÃO

A pereira pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae, e gênero *Pyrus,* o qual compreende mais de 20 espécies (Nakasu & Faoro, 2003), originárias do continente asiático ou europeu (Rehder, 1967).

Nas regiões de clima temperado são cultivadas duas espécies principais de *Pyrus*, a pereira européia (*Pyrus communis* L.), geralmente cultivada na Europa e América e a pereira asiática [*Pyrus pyrifolia* (Burn) Nak.)], que geralmente é cultivada no Japão, China, Korea e Taiwan e vem se expandindo para Europa e Estados Unidos. Existem outras espécies como

Pyrus calleryana Dcne e *Pyrus betulaefolia* Bge que são utilizadas como porta-enxertos (Chevreau & Skirvin,1992).

A viabilidade do grão de pólen pode ser avaliada por meio de polinização direta no estigma da flor, ou seja, *in vivo* e por germinação em meio artificial específico, ou seja, *in vitro*. Os grãos de pólen das angiospermas geralmente precisam de fontes de carbono, boro e de outros nutrientes para que sua germinação seja promovida (Galletta, 1983). Os componentes mais importantes do meio de cultura para a germinação de pólen têm sido combinações de concentrações de açúcares e de ácido bórico (Miranda & Clement, 1990), além do cálcio, devido a sua importância na manutenção da integridade da membrana (Van Steveninck, 1965; Kell & Donath, 1990; Sheen et al.,1992).

Quando adicionado ao meio de cultura, o cálcio induz respostas fisiológicas como, menor sensibilidade do tubo polínico e dos grãos de pólen às variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida (Bhojwani & Bhatnagar, 1974).

Por outro lado, a adição de ácido bórico no meio de cultura geralmente aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Agulhon, 1910; Gauch & Dugger, 1953; Martin & Yocum, 1918; Visser, 1955). O ácido bórico forma um complexo ionizável sacarose-borato, que reage com as membranas celulares (Askin et al., 1990). Em trabalhos sobre germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros, após um período de um ano de armazenamento, a germinação foi estimulada com a utilização de ácido bórico e nitrato de cálcio (Sahar & Spiegelroy, 1980). E ainda, em trabalhos com 86 espécies e 39 famílias, verificou-se que a adição de cálcio e boro atua como fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro* (Brewbaker & Kwack, 1963).

Desta maneira, com o presente trabalho objetivou-se testar a influência do ácido bórico e do nitrato de cálcio sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen, para diferentes genótipos de pereira em incubadora tipo BOD.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Vegetal, da Embrapa Clima Temperado - CPACT, Pelotas/RS. A temperatura e o tempo de incubação utilizados variaram de acordo com cada genótipo (Tabela 1), em função das melhores

condições de germinação dos grãos de pólen *in vitro*, baseado em resultados de experimentos anteriores.

Para os genótipos utilizados neste estudo, as flores em estágio de balão foram coletadas no campo, durante a primavera de diferentes anos (Tabela 1) e, estavam armazenados em dessecador a -18°C. Para a coleta dos botões florais, utilizou-se uma tesoura pequena ou mesmo os dedos; os botões florais foram guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras.

Em laboratório, com a fricção das flores em uma peneira fina de náilon, as anteras foram removidas dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel de aproximadamente 10 x 20 cm de área com altura de 2 cm, por cerca de 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen estivesse totalmente seco, desprendido das anteras. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 5,0 cm de altura, etiquetados e tampados com algodão. Logo, foram colocados em dessecador que continha uma camada de sílica gel no fundo, com o propósito de absorver a umidade do interior do recipiente. As dimensões do dessecador eram de aproximadamente 30 cm de diâmetro e 20 cm de altura. O dessecador contendo os frascos com pólen foi mantido em freezer à temperatura de -18°C.

Ao meio de cultura básico, composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar, descrito por Medeiros (1979), acrescentou-se ácido bórico (H_3BO_3) em 3 concentrações (0, 200 e 400 mg L^{-1}) e nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2$) em 4 concentrações (0, 400, 800 e 1200 mg L^{-1}) (Tabela 2). O volume foi completado com água destilada e após a diluição dos componentes, o meio foi geleificado com àgar e aquecido em forno de microondas durante quatro minutos. Após o preparo este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material, com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Com o objetivo de distribuir homogeneamente os grãos de pólen, fez-se necessária a observação em lupa e o uso de um pincel (n°5), para que o pólen fosse aspergido sobre a superfície do meio de cultura nos anéis de PVC da lâmina.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido no fundo, simulando uma câmara úmida. As lâminas foram

colocadas em incubadora tipo BOD, variando o tempo e a temperatura de acordo com a amostra em questão, para a germinação dos grãos de pólen *in vitro*.

A avaliação da percentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. A contagem dos campos de visão do microscópio foi feita até que se atingisse a soma de 100 grãos de pólen entre germinados e não germinados.

O delineamento experimental utilizado nesta avaliação foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (contagem de 100 grãos de pólen cada) por genótipo estudado. As médias foram submetidas à análise da variância através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento foram avaliados três genótipos, sendo duas cultivares copa Carrick (C3) e Packham's 01 (C7) e, uma seleção Monte Bonito (S2). Para as amostras C3 e S2, as maiores percentagens de germinação de grãos de pólen *in vitro* ocorreram quando estas amostras foram submetidas aos tratamentos T1 (controle), T5 e T9, ou seja, o acréscimo de ácido bórico ao meio de germinação não influenciou na germinação, já o acréscimo de nitrato de cálcio foi prejudicial. Tais resultados foram semelhantes para a amostra C7, porém no tratamento T2, esta também apresentou elevado índice de germinação, onde o acréscimo de 400 mg L^{-1} de nitrato de cálcio foi positivo para a germinação (Tabela 3).

Freitas et al. (2006) observaram que adicionando de 794 e 838 mg L^{-1} de ácido bórico ao meio de germinação a percentagem de grãos de pólen viáveis era aumentada para as variedades de pereira Taiwan Nashi-C e Taiwan Mamenashi, respectivamente. Pio et al. (2004), trabalhando com germinação de pólen *in vitro* de citros, constataram que para as variedades Pêra e Natal as maiores percentagens de grãos de pólen germinados foram obtidas quando utilizou-se 200 mg L^{-1} de ácido bórico. Porém estes mesmos autores constataram que para a variedade Valência a melhor percentagem de germinação ocorreu na ausência de ácido bórico. Chagas et al. (2006) trabalhando com nectarineira observaram que não há necessidade de adição de ácido bórico para que ocorra à germinação dos grãos de pólen desta espécie.

Para a cultivar Abbé Fétel (C2) (Tabela 4), quando manteve-se a concentração de ácido bórico e variou-se a concentração de nitrato de cálcio, pode-se observar que as menores

percentagens de germinação foram obtidas nos tratamentos T8 e T12; possivelmente as elevadas dosagens de nitrato de cálcio tenham contribuído para inibir a germinação dos grãos de pólen. Conforme Galleta (1983), para haver a integridade dos grãos de pólen é necessário que haja manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos, este equilíbrio é determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações das substâncias do meio de cultura, como ácido bórico e nitrato de cálcio; assim, o excesso ou a deficiência de qualquer desses componentes pode promover o rompimento dos grãos de pólen. Resultados similares foram obtidos por Pio et al. (2004), trabalhando com germinação *in vitro* de citros, pois o maior índice de pólen viáveis foi encontrado quando utilizou-se a dosagem de 800 mg L^{-1} de nitrato de cálcio, e em concentrações mais elevadas houve diminuição na percentagem de germinação. Do mesmo modo Oliveira Júnior (1996), trabalhando com limoeiro cravo obteve melhores resultados ao utilizar a dosagem de 800 mg L^{-1} de nitrato de cálcio.

Com relação a cultivar Cascatense (C4) (Tabela 4), observa-se que os maiores índices de grãos de pólen germinados foram encontrados quando o meio de germinação foi composto apenas de 400 mg L^{-1} de nitrato de cálcio, 200 ou 400 mg L^{-1} de ácido bórico, sendo que quando o meio de germinação foi composto pela combinação de 400 mg L^{-1} de ácido bórico com 400 mg L^{-1} e 800 mg L^{-1} de nitrato de cálcio não diferiu significativamente da terceira concentração citada. Parton et al. (2002), realizando experimentos com a germinação de pólen de bromeliáceas, obtiveram os melhores resultados em meio contendo 200 g L^{-1} de sacarose, 10 g L^{-1} de ácido bórico e 5 g L^{-1} de ágar. Stanley & Linskens (1974) mencionam que existe maior permeabilidade da membrana do tubo polínico quando o nitrato de cálcio não está presente, pois acarreta na liberação de metabólitos internos para o meio externo.

Ainda para a amostra C4, observou-se que quando se acrescentou 400 mg L^{-1} de ácido bórico ao meio de germinação a percentagem de germinação também foi diminuída. Resultado que pode ser comparado ao de Raseira & Raseira (1996), testando concentrações de sacarose e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de araçazeiro, constataram que apesar do boro melhorar a germinação não há necessidade de mais que 40 mg L^{-1} de ácido bórico. Este resultado se aproxima dos encontrados por Chagas et al. (2006), onde observaram que para a germinação de grãos de pólen de nectarineira, cultivar Centenária e Colombina, existe a necessidade da adição de cálcio. Brewbaker & Kwack (1963) fazem referência ao cálcio e boro como elementos essenciais para o início do prolongamento da intina (parede de celulose que envolve o grão de pólen) e formação do tubo polínico *in vitro.*

Para a cultivar Século XX (C9) (Tabela 4), observou-se que o maior índice de grãos de pólen *in vitro* viáveis foi obtido quando utilizou-se o meio de germinação básico ou acrescido apenas de 200 ou 400 mg L^{-1} de ácido bórico. Resultados que diferem dos encontrados por Milutinovic et al. (1996), ao trabalhar com macieira, pois observaram que para as cultivares Jonathan (64,2%) e Golden Delicious (88,3%) a adição do ácido bórico favorece o aumento das taxas de germinação. Feijó et al. (2005), citam que o boro é um microelemento bastante importante para promover a germinação e o crescimento do tubo polínico. Também Silva (1996) estudando meio de germinação adequado para o pólen de maracujazeiro (*Passiflora edulis*), utilizou a composição de 50 g L^{-1} de sacarose, 0,2 g L^{-1} de ácido bórico e 1,0 g L^{-1} de nitrato de cálcio.

As menores percentagens de germinação dos grãos de pólen *in vitro* para esta cultivar foram observados quando empregou-se os tratamentos T3 e T4 possivelmente pelo fato de possuírem concentrações elevadas de nitrato de cálcio, embora algumas estejam combinadas com ácido bórico. Fato que pode ser explicado com as referências citadas a seguir, pois para nectarineira, o acréscimo de cálcio e boro reagiu como fator limitante para a germinação (CHAGAS et al., 2006), já para nespereira (Cavallari et al., 2006) e pereira (Freitas et al., 2006) verificou-se que o requerimento de cálcio e boro depende da variedade, sendo assim é possível afirmar que a necessidade de adição de cálcio e boro no meio de cultura para a germinação de grãos de pólen depende também da espécie e da cultivar.

Na Tabela 5 estão descritas as cultivares Forelle (C5) e Housui 01 (C10) e as seleções Coelho Borges (S1) e Seleção 9.93 (S5). Para a amostra C5, observou-se que as maiores percentagens de grãos de pólen viáveis ocorreram quando submetidos aos tratamentos T1, T5, T10 e T11. Supõe-se que o equilíbrio entre as substâncias utilizadas e a ausência delas tenha influenciado a germinação. Wang et al. (2002), testando a influência do ácido bórico sobre a germinação do pólen de *Picea meyeri*, verificaram que o ácido bórico em baixas concentrações (0,001 a 0,01%) estimulava a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico, porém este mesmo nutriente em concentrações acima de 0,01% inibia a germinação dos grãos de pólen bem como o crescimento do tubo polínico. Tais resultados concordam com os resultados obtidos por Potts & Marsden-Smedley (1989) ao estudarem a germinação do pólen de *Eucalyptus.*

As amostras C10 e S5, apresentaram o mesmo comportamento, tanto quando variou-se a concentração de ácido bórico como quando variou-se a concentração de nitrato de cálcio; para

nitrato de cálcio, constatou-se que os genótipos em questão apresentaram maior percentagem de grãos de pólen viáveis quando submetidos aos tratamentos T1, T5, T6, T9 e T10. Acredita-se que houve excesso na concentração dos nutrientes empregados, onde 800 e 1200 mg L^{-1} de cálcio influenciaram de maneira negativa a germinação. A adição de ácido bórico e/ou de nitrato de cálcio apresentaram respostas variáveis, dependendo da espécie, Maisonneuve & Den Nijs (1984), testando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de tomate, em distintos períodos de incubação, acrescentaram 50 mg L^{-1} de ácido bórico ao meio de cultura.

CONCLUSÃO

O meio de cultura básico ou acrescido de 200 mg L^{-1} de ácido bórico promove elevados índices de germinação *in vitro* de grãos de pólen para as amostras C2 (‘Abbé Fétel’), C3 (‘Carrick’), C4 (‘Cascatense’), C5 (‘Forelle’), C7 (‘Pakham’s 01’), C9 (‘Século XX’), S1 (‘Coelho Borges’), S2 (‘Monte Bonito’) e S5 (Seleção 9.93).

As cultivares de pereira estudadas, de uma maneira geral respondem de modo semelhante à adição de ácido bórico e nitrato de cálcio ao meio de cultura, sendo que percentagem de germinação é dimunuída quando acrescenta-se a concentração de 1200 mg L^{-1} de nitrato de cálcio, independente da concentração de ácido bórico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULHON, H. Emplodiu bore comme angrais calalytique. **Compt. Rend. Acad.Sci**., Paris, v.150, p.288-291, 1910.

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, Dergise, v. 27, n.3, p.105-116, 1990.

BEYOUNG, H.K. The effects of calcium on pollen germination. **American Society of Horticultural Science**, v.86, p.818-823, 1965.

BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi, 1974. 264p.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.50, n.9, p.859-865, 1963.

CAVALLARI, L. L.; PIO, L. A. S.; CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M. Germinação de grãos de pólen de nêspera utilizando nitrato de cálcio e ácido bórico em diferentes níveis de pH. In: CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais...** Lavras, 2006. Brasil. CD-ROM.

CHAGAS, E. A; PIO, R. B. W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; FRACAROLLI, B. B. C.; MENDONÇA, V.; ONO, T. K. Efeito da adição de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação *in vitro* de polens de nectarineira. CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais…** Lavras, 2006. Brasil. CD-ROM.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M. Pear. **Biotechnology of perennial Fruit Crops**. F. A. Hammerschlang and R. E. Litz. Ed., 1992. 550p. (Biotechinology in agriculture, 8).

FEIJÓ, J. A.; MALHÓ, R.; OBERMEYER, G. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. **Protoplasma**, v.187, p.155-167, 1995.

FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; NETO, J. E. B.; MENDONÇA, V.; CHAGAS, P. C. Germinação de grãos de pólen de pereira sob diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico do meio de cultura. *In:* CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais…** Lavras, 2006. Brasil.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p.23-47.

GAUCH, H.G.; W.M. DUGGER, Jr. The role of boron in the translocation of sucrose. **Planto Physiology**, v.28, p.457-466, 1953.

KELL, A.; DONATH, E. Effect of ionophore A-23187 on plasma membrane integrity in isolated protoplasts of *Avena sativa*. **Plant Science**., v.69, p.35-138, 1990.

MAISONNEUVE, B.; DEN NIJS, A. P. M. *In vitro* pollen ation and tube growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) d its relation with plant growth. **Euphytica**, Wageningen, v.33, p.833-840, 1984.

MARTIN, J.N.; YOCUM, L.E. A study of the pollen and pistils of apples in relation to the germination of the pollen. **Proc. lowa**. **Ac. Sc**., v.25, p.391-411, 1918.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro *(Prunus persica* (L.) Batsch). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 5., Pelotas, 1979. **Anais...** Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p. 407-416.

MILUTINOVIC, M.; MOMIROVIC, G.S.; NIKOLIC, D. Functionality of poll and fruit set in apples. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.423, p. 167-169, 1996.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v.38, n.1, p.29-33, 1990.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: **Frutas do Brasil-46**. Pêra Produção. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.29-36.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de; RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D. et al. Efeito do Cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, 1996, Curitiba, **Abstract…** Curitiba: SBF, 2000. p.419.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Belgium, v.125, n.2, p.155-161, 2002.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.3, p.293-296, 2004.

POTTS, B. M.; MARSDEN-SMEDLEY , J. B. *In vitro* germination of *Eucalyptus* pollen: response to variation in boric acid and sucrose. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.37, p.429-441, 1989.

RASEIRA, M. C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum***, Pelotas: EMBRAPA/CPACT, 1996. p.33-45.

REHDER, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**. 2nd ed. New York: Macmillan, 1967.

SAHAR, N.; SPIEGELROY, P. Citrus pollen storage. **Horticulturae Science**, St. Joseph, v.15, n.1, p.81-82, 1980.

SHEEN, V.L.; DREYER, E.B.; MACKLIS, J.D. Calcium-mediated neuronal degeneration following singlet oxygen production. **NeuroReport**, n.3, p.705-708, 1992.

SILVA, M. M. da. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro (***Passiflora edulis* **f. flavicarpa Deg.)** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996 59f. Viçosa, MG.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen:** biology, biochemistry and management. NewYork: Springer-Verlag, 1974. 172p.

VAN STEVENINCK, R. F. M. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membrane and the effects of substitution with divalent ions. **Physiology Plant**. n.18, p.54-69, 1965.

VISSER, T. Germination and storage pollen. **Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Waganingen**, Nederland, n.55, v1, p.1-68, 1955.

WANG, Q.; KONG, L.; HAO, H.; WANG, X.; LIN, J.; SAMAJ, J.; BALUŠKA, F. Effects of brefeldin a on pollen germination and tube growth. Antagonistic effects on endocytosis and secretion. **Plant Physiology**, v .139. p 1692–1703, dec. 2005.

Tabela 1 - Genótipos de pereira e respectivas temperaturas e tempos de incubação em BOD, quando testou-se a adição de ácido bórico e nitrato de cálcio ao meio de cultura básico. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

			Data de Coleta	Procedência	Temperatura (°C)	Tempo (hs)
Cultivares	Abbé Fétel	C2	13/09/2006	Pelotas	20	2
	Carrick	C3	06/10/2003	Pelotas	20	1
	Cascatense	C4	09/08/1999	Pelotas	30	1
	Forelle	C5	Sem data	Vacaria	20	4
	Packham's 01	C7	Sem data	Pelotas	20	1
	Século XX	C9	Sem data	Pelotas	30	2
	Hosui 01	C10	14/09/2006	Vacaria	20	4
Seleções	Coelho Borges	S1	01/10/2003	Pelotas	20	4
	Monte Bonito	S2	01/09/2006	Pelotas	20	1
	Seleção 9.93	S5	30/09/2004	Pelotas	20	4

Tabela 2 - Tratamentos e respectivas concentrações de ácido bórico e nitrato de cálcio acrescidos ao meio de germinação básico. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

Tratamento	Concentrações	
	(H_3BO_3) mg L^{-1}	$(Ca(NO_3)_2)$ mg L^{-1}
T1	**0**	**0**
T2		**400**
T3		**800**
T4		**1200**
T5	**200**	**0**
T6		**400**
T7		**800**
T8		**1200**
T9	**400**	**0**
T10		**400**
T11		**800**
T12		**1200**

Tabela 3 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Carrick (C3) e Packham's 01 (C7) e da seleção Monte Bonito (S2), variando a concentração de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de culura, incubadas durante uma hora a temperatura 20°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

Tratamento	Concentrações		Genótipos		
			Cultivares		Seleção
	(H_3BO_3) mg L^{-1}	$(Ca(NO_3)_2)$ mg L^{-1}	Carrick	Packham's 01	Monte Bonito
T1	**0**	**0**	38,00 A a	56,25 A b	61,50 A a
T2		**400**	23,75 B a	59,25 A a	23,75 B b
T3		**800**	16,00 BC a	38,00 B a	25,00 B ab
T4		**1200**	07,25 C a	07,25 C b	03,75 C a
T5	**200**	**0**	37,75 A a	65,25 A a	58,50 A a
T6		**400**	23,00 B a	52,75 B a	39,75 B a
T7		**800**	21,25 B a	42,00 C a	29,25 C a
T8		**1200**	05,75 C a	28,75 D a	09,25 D a
T9	**400**	**0**	23,00 A b	52,50 A b	43,50 A b
T10		**400**	13,50 B b	31,00 B b	22,00 B b
T11		**800**	07,00 B b	26,75 B b	17,75 BC b
T12		**1200**	05,00 B a	10,25 C b	09,25 C a
CV (%)				**17,38**	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna para cada concentração de ácido bórico e minúscula na coluna com a mesma concentração de nitrato de cálcio em cada concentração de ácido bórico não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Abbé Fétel (C2) incubada durante duas horas a 20°C, Cascatense (C4) incubada durante uma hora a 30°C e Século XX (C9) incubada durante duas horas a temperatura de 30°C em BOD, sob diferentes concentrações de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

Tratamento	Concentrações		Genótipos/Cultivares		
	(H_3BO_3) mg L^{-1}	$(Ca(NO_3)_2)$ mg L^{-1}	Abbé Fétel	Cascatense	Século XX
T1	**0**	**0**	20,75 A b	40,25 A b	51,00 A a
T2		**400**	14,50 A b	29,50 A a	23,25 B b
T3		**800**	22,50 A ab	11,25 B a	05,25 C b
T4		**1200**	19,75 A a	00,75 B a	03,00 C b
T5	**200**	**0**	36,75 A a	55,75 A a	44,00 A b
T6		**400**	37,00 A a	41,00 B a	27,75 B ab
T7		**800**	31,00 A a	21,50 C a	16,50 C a
T8		**1200**	12,00 B a	10,00 C a	06,00 D ab
T9	**400**	**0**	21,75 AB b	24,50 A c	26,00 B c
T10		**400**	23,25 A b	11,75 AB a	34,00 A a
T11		**800**	16,75 AB b	12,00 AB a	15,50 C a
T12		**1200**	13,50 B a	09,00 B a	11,00 C a
CV (%)			**22,51**	**31,90**	**17,23**

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna para cada concentração de ácido bórico e minúscula na coluna com a mesma concentração de nitrato de cálcio em cada concentração de ácido bórico não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Forelle (C5) e Hosui 01 (C10) e, das seleções Coelho Borges (S1) e Seleção 9.93 (S5), variando a concentração de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura, incubados durante quatro horas a 20°C em BOD. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

			Genótipos			
	Concentrações		**Cultivares**		**Seleções**	
Tratamento	**(H_3BO_3) mg L^{-1}**	**($Ca(NO_3)_2$) mg L^{-1}**	**Forelle**	**Hosui**	**Coelho Borges**	**Seleção 9.93**
T1	**0**	**0**	39,25 A a	43,00 A a	28,50 A b	47,75 A a
T2		**400**	27,50 B b	25,75 B b	19,00 B b	23,00 B b
T3		**800**	18,50 C a	14,25 C b	11,50 BC b	11,75 C b
T4		**1200**	08,00 D a	12,25 C a	08,00 C a	04,50 C a
T5	**200**	**0**	38,00 A a	45,50 A a	44,00 A a	51,25 A a
T6		**400**	32,00 AB a	38,75 A a	27,75 B a	45,00 A a
T7		**800**	26,00 B a	22,75 B a	18,75 C a	28,00 B a
T8		**1200**	07,50 C a	12,00 C a	06,25 D a	09,25 C a
T9	**400**	**0**	08,25 B b	23,75 A b	09,00 A c	33,00 A b
T10		**400**	20,25 A b	22,25 A b	08,75 A c	26,50 A b
T11		**800**	21,00 A a	16,25 AB ab	08,25 A b	12,75 B b
T12		**1200**	10,50 B a	09,50 B a	03,75 A a	04,75 B a
CV (%)			**22,17**			

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna para cada concentração de ácido bórico e minúscula na coluna com a mesma concentração de nitrato de cálcio em cada concentração de ácido bórico não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ARTIGO 4 (Segundo as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN *in vitro* DE CULTIVARES COPA E SELEÇÕES DE PEREIRA EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO BÓRICO AO MEIO DE CULTURA E DE DIFERENTES HORAS E TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

CIANE XAVIER GONÇALVES[1], ANDREA DE ROSSI RUFATO[2], MÁRCIA WULFF SCHUCH[2], JULIANA DEGENHARDT[3]

RESUMO - Este experimento foi realizado com o intuito de avaliar a germinação *in vitro* de grãos de pólen de genótipos de pereira, sendo duas cultivares copa, três seleções e um porta-enxerto procedentes de Vacaria e Pelotas, ambos municípios no estado do Rio Grande do Sul. Variou-se a temperatura e o período de incubação em estufa tipo BOD, em ausência de luz. Ao meio de germinação básico, acrescentou-se ácido bórico em duas concentrações. Conclui-se que de maneira geral, para os genótipos de pereira estudados, é recomendável a germinação de grãos de pólen *in vitro* em meio de cultura básico ou acrescido de 100 mg L^{-1} de ácido bórico.

Termos para Indexação: Meio de germinação básico, Carrick, Kieffer, Seleção 6.93, Seleção 7.93, Seleção 9.93, *Pyrus calleryana*, ácido bórico.

[1]Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: anexg@hotmail.com - Bolsista Capes
[2]Profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel
[3]Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

ARTICLE 4

In vitro GERMINATION OF POLLEN GRAINS OF SCION CULTIVARS AND SELECTIONS OF PEAR REGARDING BORIC ACID PRESENCE IN THE CULTURE MEDIUM AND DIFFERENT HOURS AND TEMPERATURES OF INCUBATION

ABSTRACT - This experiment was carried out aiming to evaluate the *in vitro* germination of pollen grains of pear genotypes: two scion cultivars, three selections and one rootstock from Vacaria and Pelotas, in the state of Rio Grande do Sul. The temperature and period incubation was varied in the BOD incubator with lightless. It was added to the basic germination medium boric acid into two concentrations. In general, for the assessed pear genotypes it is recommended the *in vitro* germination of pollen grains in basic culture medium or enriched with 100 mg L^{-1} of boric acid.

Index Terms: Basic germination medium, Carrick, Kieffer, Selection 6.93, Selection 7.93, Selection 9.93, *Pyrus calleryana*, boric acid.

INTRODUÇÃO

A pereira, originária do hemisfério Norte, pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e ao gênero *Pyrus*. Abrange mais de vinte espécies, encontradas na Europa e nos países Asiáticos (Janick & Moore, 1975; Lombard, 1992). No Brasil, a cultura da pereira, é bastante antiga e existem coleções de cultivares com numerosas introduções, principalmente na Região Sul; são utilizadas como cultivares copa, pereiras do tipo européia (*Pyrus communis* L.), japonesas [*Pyrus pyrifolia* (Burn). Nak.], chinesas (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) e híbridas, enquanto que *Pyrus calleryana* (Dcne.), *Pyrus betulaefolia* Bge. e marmeleiros são usados com porta-enxerto (Faoro, 2001; Nakasu & Faoro, 2003; Camelatto et al., 2003).

O melhoramento genético de pereira representa uma boa alternativa, em longo prazo, para a expansão da cultura. Visto que esta espécie apresenta alta taxa de fecundação cruzada, devido à auto-incompatibilidade gametofítica e os cruzamentos interespecíficos produzem sementes viáveis (Olmstead, 1989; De Nettancourt, 1993; Sato, 1993).

O teste de germinação de grãos de pólen *in vitro* é bastante importante para os programas de melhoramento de frutíferas, pois através deste torna-se possível verificar sua

viabilidade. Para Stone et al. (1995), avaliar a viabilidade do pólen a ser utilizado na polinização artificial e em programas de melhoramento genético é bastante interessante assim como a compreensão dos problemas de esterilidade (Rodriguez-Riano & Dafni, 2000).

O ácido bórico tem função bastante importante no crescimento e desenvolvimento vascular das plantas (Cakmak & Romheeld, 1997; Stangoulis et al., 2001). Também é importante para a polinização, desenvolvimento de frutos e para a absorção e uso do cálcio. Sua deficiência causa alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas, como inibição do alongamento da raiz (Neales, 1960; Cohen & Lepper, 1977), pobreza no florescimento e polinização e, frutos de tamanho reduzido. Tais sintomas são facilmente notados durante o florescimento, pois produzem inflorescências deformadas, brotações de tamanho reduzido, com folhas pequenas e coriáceas. Também pode ocorrer uma redução significativa na produção, visto que a gema terminal poderá morrer ou ainda, pode causar a baixa germinação do grão de pólen e o não desenvolvimento do tubo polínico.

O meio básico utilizado em testes de germinação *in vitro* é composto de açúcar e de ácido bórico podendo também variar a combinação com outros nutrientes (Miranda & Clement, 1990; Galletta, 1983). O açúcar fornece energia necessária para o desenvolvimento do tubo polínico e ainda, promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação (Stanley & Linskens, 1974). O boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade dos mesmos se romperem e também aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Franzon et al., 2005).

Thompson & Batjer (1950), constataram que o acréscimo de boro ao meio de germinação dos grãos de pólen aumentou significativamente a percentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico de certas espécies frutíferas de clima temperado. Sendo assim, com realização deste experimento objetivou-se avaliar a influência dos fatores genótipo, tempo e temperatura de incubação e concentração de ácido bórico no meio de cultura básico sobre a germinação de grãos de pólen de pereira *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Embrapa Clima Temperado - CPACT, Pelotas/RS. Foram testados seis genótipos, sendo duas cultivares copa (Carrick - coletada em 11/09 e Kieffer - coletada em 14/09), três seleções (Seleção 6.96, Seleção 7.93 e Seleção 9.93 - coletadas em 12/09) e um porta-enxerto (*Pyrus*

calleryana - coletado em 31/08). Todas as amostras de pólen foram coletadas em Pelotas na primavera de 2007. Testaram-se as temperaturas de 20, 30 e 40°C, os tempos de 1, 2 e 4 horas em incubadora tipo BOD e as concentrações de 0, 100 e 200 mg L^{-1} de ácido bórico.

Para a coleta dos botões florais, utilizou-se uma tesoura pequena ou mesmo os dedos; os botões florais foram guardados em sacos de papel, até a chegada no laboratório, para posteriormente ser feita a remoção das anteras.

Em laboratório, com a fricção das flores em uma peneira fina de náilon, as anteras foram removidas dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel de aproximadamente 10 x 20 cm de área com altura de 2 cm, por cerca de 30 horas, à temperatura entre 20 e 25ºC, até que o pólen estivesse totalmente seco e desprendido das anteras. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 5,0 cm de altura, etiquetados e tampados com algodão. Logo, foram colocados em dessecador que continha uma camada de sílica gel no fundo, com o propósito de absorver a umidade do interior do recipiente. O dessecador contendo os frascos com pólen foi mantido em freezer à temperatura de -18°C.

Ao meio de cultura básico, composto de 100 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de ágar, descrito por Medeiros (1979), acrescentou-se ácido bórico em 2 concentrações (0, 100 e 200 mg L^{-1}). O volume foi completado com água destilada e após a diluição dos componentes, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante quatro minutos. Após o preparo do meio de germinação, este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, de diâmetro interno de 14 mm, fixados para evitar o escoamento do material. Com a utilização de um conta-gotas, foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel.

Para a distribuição homogênea dos grãos de pólen nos anéis de PVC da lâmina, fez-se necessária à observação em lupa e o uso de um pincel (n°5). Em seguida, as lâminas foram colocadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido no fundo, simulando uma câmara úmida. As lâminas foram colocadas em estufa tipo BOD, variando o tempo de incubação em uma, duas e quatro horas e a temperatura de incubação em 20 e 30°C para a germinação dos grãos de pólen *in vitro*.

A avaliação da percentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro

do próprio grão de pólen. A contagem dos campos de visão do microscópio foi feita de acordo com a necessidade, para que se atingisse a soma de 100 grãos de pólen entre germinados e não germinados.

O delineamento experimental utilizado nesta avaliação foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (contagem de 100 grãos de pólen cada) por genótipo estudado. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Para todos os genótipos em questão os dados, expressos em percentagem, foram transformados em arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X representa o valor percentual obtido para cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a 'Carrick' (Tabela 1), as maiores percentagens de germinação foram obtidas em ausência de ácido bórico independente do tempo e da temperatura testada; ou quando as concentrações de ácido bórico eram de 100 e 200 mg L^{-1} a 20°C independendo do tempo aplicado. Calzoni et al. (1979); Daniel & Vároczy (1957); Galleta (1983); Johri & Vasil (1961); Singh et al. (1961); Stott (1972); Thompson & Batjer (1950), afirmam que a adição de ácido bórico ao meio de cultura aumenta a percentagem de germinação dos grãos de pólen, bem como a comprimento do tubo polínico dependendo da concentração aplicada ao meio germinativo básico. As menores percentagens de germinação ocorreram quando se acrescentou 200 mg L^{-1} de ácido bórico a temperatura de 30°C durante 2 horas de incubação. E ainda observou-se que em 100 mg L^{-1} de ácido bórico, durante 4 horas a 30°C de incubação, a germinação dos grãos de pólen foi prejudicada. Countaceau (1962), estudando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de ameixeira, constatou que a temperatura entre 22 e 27°C é ideal para a germinação, bem como para o crescimento dos tubos polínicos e, que a 35°C a germinação é diminuída, tornando-se nula aos 35°C e, abaixo de 5°C.

Para a cultivar Kieffer (Tabela 2), com relação as concentrações de ácido bórico observou-se que os menores índices de germinação ocorreram quando os grãos de pólen foram incubados durante 1 hora em ausência de ácido bórico a 20°C e durante 2 horas com o acréscimo de 200 mg L^{-1} de ácido bórico a 20°C, em ambos casos, não houve diferença significativa quando o material foi incubado durante 2 horas a 20°C com acréscimo de 100 mg L^{-1} de ácido bórico. Para que o ácido bórico colabore com a germinação de grãos de pólen, é necessário que este seja utilizado em doses corretas, de acordo com a cultivar em questão.

Almeida et al. (1987), ao testarem quatro concentrações de ácido bórico (0,015; 0,020; 0,025 e 0,030%) acrescidas ao meio de germinação para grãos de pólen de algodão, observaram que a concentração de 0.030% de boro promoveu a maior percentagem de germinação dos grãos de pólen.

Para a Seleção 6.93 (Tabela 2), observou-se que em as maiores médias de germinação foram obtidas em meio de cultura básico ou em meio de cultura acrescido de 100 mg L^{-1} de ácido bórico a temperaturas de 20 e 30°C durante uma hora de incubação. E em meio de cultura básico, a temperaturas de 20 e 30°C durante quatro horas de incubação. A percentagem de germinação dos grãos de pólen pode ser variável, dependendo da espécie em questão, bem como da concentração dos nutrientes adicionados ao meio básico de germinação. Thompson & Batjer (1959) citam que a concentração de ácido bórico que proporciona maior percentagem de germinação de grãos de pólen está entre 2,5 e 160 mg L^{-1}. Também Carvalho (1989), estudando a concentração de boro para a germinação de grãos de pólen de ameixeira japonesa, constatou que a percentagem de germinação do pólen e o comprimento dos tubos polínicos são inibidos pela utilização de altas concentrações de ácido bórico.

Para a Seleção 7.93 (Tabela 2), com relação às concentrações de ácido bórico observou-se durante uma hora de incubação as percentagens de germinação independeram das concentrações de ácido bórico bem como das temperaturas aplicadas. Durante duas horas de incubação as menores percentagens de germinação ocorreram quando se adicionou 100 mg L^{-1} de ácido bórico a temperatura de 20°C e estes resultados não diferiram significativamente quando os grãos de pólen foram incubados a 20°C em concentração de 200 mg L^{-1} de ácido bórico; e ainda, durante quatro horas de incubação as menores percentagens de germinação ocorreram quando o meio de cultura foi acrescido de 100 mg L^{-1} de ácido bórico a 30°C, não diferindo significativamente da germinação obtida quando incubados a temperatura de 30°C com 200 mg L^{-1} de acréscimo de ácido bórico ao meio de cultura. Cheng & Rerkasem (1993), estudando germinação de grão de pólen de trigo, observaram que em meio de cultura, sem a presença de boro a germinação foi pobre, porém a percentagem de germinação dos grãos de pólen e o comprimento dos tubos aumentaram quando utilizaram concentrações de boro entre 20-100 mg L^{-1}; pois, o acréscimo de boro ao meio de cultura está relacionado com maior disponibilidade de açúcares, aumento da atividade enzimática e respiração (Garg et al., 1979). Corrêa et al. (2006), estudando a viabilidade de grãos de pólen de mirtilo, observaram que o meio básico ou com adição de 40 mg L^{-1} de ácido bórico, são adequados para a realização

destes testes, porém meios muito concentrados, como adicionados de 80 mg L^{-1} de boro são prejudiciais.

Com relação às concentrações de ácido bórico para a Seleção 9.93 (Tabela 2), observou-se que quando os grãos de pólen foram incubados durante uma hora não houve diferenças significativas. Quando incubados durante duas horas as menores pecentagens de germinação foram obtidas com o acréscimo de 100 e 200 mg L^{-1} de ácido bórico a 20 e 30°C, respectivamente, ambas as percentagens de germinação obtidas não diferiram estatisticamente para o créscimo de 200 mg L^{-1} de ácido bórico a temperatura de 20°C. Gaugh & Dugger (1953) concordam que há melhor absorção de sacarose na presença de boro. Daniel & Varóczy (1957); Calzoni et al. (1979), relatam que o meio de germinação acrescido de ácido bórico, auxilia na síntese de materiais pécticos da parede celular, aumenta a absorção de oxigênio, aumenta a translocação e o metabolismo de açúcares. A temperatura influencia no crescimento dos tubos polínicos, este interfere na polinização e frutificação efetiva (Fraser, 1931; Horticultural Education Association Fruit Commite, 1961).

Para o porta-enxerto *Pyrus calleryana* (Tabela 2), com relação às concentrações de ácido bórico no meio de cultura foi possível observar que o as maiores percentegens de germinação ocorreram em ausência de ácido bórico a 20 e 30°C independendo do tempo de incubação utilizado. Quando se acrescentou 100 mg L^{-1} de ácido bórico ao meio de cultura as maiores percentagens de germinação foram obtidas 20 a 30°C, durante quatro horas. Com o acréscimo de 200 mg L^{-1} os maiores índices de germinação foram obtidos a 30°C durante quetro horas de incubação. E ainda com o acréscimo de 100 e 200 mg L^{-1} de ácido bóricodurante duas horas de incubação. Com relação a espécies distintas Nunes et al. (2001), estudando pólen de macieira, testaram o meio de germinação contendo 10% de sacarose e 40 mg L^{-1} de ácido bórico, e observaram que houve menor percentagem de germinação para a cultivar Fuji. Dantas et al. (2005), trabalhando com macieira, testaram o meio de germinação contendo 40 mg L^{-1} de ácido bórico, onde a percentagem de germinação dos grãos de pólen foi inibida para as cultivares Catarina, Imperatriz, Gala, Fuji, M.9 e Marubakaido. Burke et al. (2002), estudando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de algodão, constataram que a percentagem de germinação dos grãos de pólen e o alongamento dos tubos polínicos, diminuíram quando incubadas a temperaturas de 37 e 32°C, respectivamente.

CONCLUSÕES

De maneira geral, para os genótipos de pereira estudados, é recomendável a germinação de grãos de pólen *in vitro* em meio de cultura básico ou acrescido de 100 mg L^{-1} de ácido bórico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, J. F. da; ALVES, J. F.;SI LVA, F. P da; ALMEIDA, F. A. G.; Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*. II - Efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês - **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.1, n.18, p.117-123, jun. 1987.

BURKE J. J.; VELTEN, J.; OLIVER, M. J. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. **Agronomy Journal**. 2002. Disponível em: <http://agron.scijournals.org>. Acesso em: janeiro de 2007.

CAKMAK, I.; ROMHELD, V. Boron deficiency-induced impairment of cellular functions in plants. **Plant and Soil,** n.193, p.71-83, 1997.

CALZONI, G. L.; SPERANZA, A.; BAGNI, N. In vitro germination of Apple pollen. **Scientia Horticulturae,** n.10, vol.1, p.49-55, 1979.

CAMELATTO, D.; NACHTIGALL, G.R.; ARRUDA, J.J.P.; HERTER, F.G. Efeito De Flutuações de Temperatura, Horas de Frio Hibernal e Reguladores de Crescimento no Abortamento de Gemas Florais de Pereiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.22, n.1, p.111-117, 2003.

CARVALHO, T. C. P. **Comportamento de algumas cultivares de ameixeira japonesa** (*Prunus salicina*) **quanto a polinizaçõa no Rio Grande do Sul**. 1989. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHENG, C.; RERKASEM, B. Effects of boron on pollen viability in wheat. **Plant and Soil.**, n.1, p.155-156, october de 1993.

COHEN, M. S.; LEPPER, R. Effects of boron on cell elongation and division in squash roots. **Plant Physiology**. v.59, p.884-887.1977.

CONTACEAU, M. **Fruticultura** (Arboriculture). Barcelona: Occidente, 1962. 590p.

CORRÊA, E. R.; FRANZON, R. C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E. D.; RASEIRA, M. do C. B. **Avaliação da viabilidade de pólen de mirtilo em diferentes meios**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br> Acesso em: junho de 2006.

DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, p.241-244. 2000.

DANIEL, L.; VÁROCZY, R. Pollen physiological studies II. The effect of baron on the germination of pollen grains and on the growth of pollen tubes. **Novenytermeles**, 1957, n.4, p.329-30.

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

DE NETTANCOURT, D. Self-and cross-incompatibility systems. In: HAYWARD, M. D.; BOSEMARK, N. O.; ROMAGOSA, I. (Eds) **Planta Breeding, Principles and Prospects**. London, Chapman; Hall, 1993, p.203-212.

FAORO, I. D. Morfologia e fisiologia. In: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa,** Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. p.67-94.

FRANZON, R.C.; CORRÊA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. In vitro pollen germination of feijoa (***Acca sellowiana*** (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.5, n.2, p.229-233, 2005.

FRASER, S. The plum. In: **American Fruits**. Nova York: Orange Judde Publishing Company, 1931. p.455-70.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983, p.23-47.

GARG, O. K.; SHARMA, A. N.; KONA, G. R. S. S. Effect of boron on the pollen vitality and yield of rice plants (Oryza sativa L. var. Jaya). **Plant and Soil**, v.52, n.4, set. 1979.

GAUCH, H. G.; DUGGER, Jr. W. M. The role of boron in the translocation of sucrose. **Plant Physiology**, Rockville, v.28, p.477-466, 1953.

HORTICULTURAL EDUCATION ASSOCIATION FRUIT COMMITTEE. London. The pollination of fruits crops. **Scientific Horticulture**, v.15, p.126-50, 1961.

JANICK, J., MOORE, J. N. **Advances in fr** Seleção **it breeding**. Indiana: Purdue University Press. West Lagayette, 1975. p.38-70.

JOHRI, B. M.; VASIL, J. K. Physiology of pollen. **The Botanical Review**, v.3, n.27, p.325-381, 1961.

LOMBARD, P. B. Pear pollination and fruit set in: Van Der Zet, T.; Childers, N.F. **The pear: Florida,** Gainesville, 1992, p.91-103.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro *(Prunus persica* (L.) Batsch). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 5., Pelotas, 1979. **Anais...** Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p. 407-416.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v.38, n.1, p.29-33, 1990.

NAKASU, B.H.; FAORO, I. D. Cultivares. *In*: Nakasu, B. H.; Quezada, A. C.; Herter, F.G. **Pêra. Produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Brasilia: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. cap.5, p.29-36.

NEALES, T. E. Some aspects of boron in root growth. **Australian Journal of Biological Sciences** , v.13, p.232-248, 1960.

NUNES, J.C.O.; DANTAS, A. C. M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Goldeen Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p. 35-39, 2001.

OLMSTEAD, R. G. The origin and function of sef-incompatibility in flowering plants. **Sexual Plant Reproduction**, v.2, n.3, p.127-136, 1989.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sex Plant Reprod**, v.12, p.241-244, 2000.

SATO Y. Breeding of self-compatible Japanese pear. *In*: HAYASHI, T.; OMURA, M.; SCOTT, N.S. (Eds) **Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees.** Tsukuba, Japão: Fruit tree research station, 1993. p.241-247.

SINGH, R. W.; RANDHAWA, G. S.; SHARMA. Pollen storage and pollen germination in fruit crops - a review. Indian **Journal of Horticulture**, v.18, p.85-96, 1961.

STANGOULIS, J. C. R.; REID, R. J. P. H.; BROWN, R. D. Graham. Kinetic analysis of boron transport in Chara. **Planta**, n.213, p.142-146, 2001.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Berlin: Heidelberg, 1974. 307p.

STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, v.82, p.1186-1197, 1995.

STOTT, K. G. Pollen germination and pollen tube characteristics in orange of apple cultivars. Journal of **Horticultural Science and Biotechnology**, n.47, p.191-8, 1972.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduos tree fruits. **American Society for Horticultural Science**, v.56, p.227-30, 1950.

Tabela 1 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Carrick e Kieffer, das seleções 6.93, 7.93 e 9.93 e, do porta-enxerto *Pyrus calleryana*, quando submetidos a diferentes temperaturas (20 e 30°C), tempos de incubação (1, 2 e 4 horas) e em diferentes concentrações de ácido bórico (0, 100 e 200 mg L^{-1}). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Tempo (horas)	Ácido bórico (mg L^{-1})	Temperatura (°C)	Genótipos					
			Cultivares		Seleções			Porta-enxerto
			Carrick	Kieffer	Seleção 6.93	Seleção 7.93	Seleção 9.93	Pyrus calleryana
1	0	20	18.59 A a α	03.37 B b β	02.16 B ab α	07.50 B a β	02.40 B a α	35.68 A a α
		30	27.35 A a α	10.92 B a α	06.45 A a α	17.43 AB a α	05.55 A a α	09.81 A a β
	100	20	15.86 A a α	18.47 A a α	06.45 A a α	11.33 B a α	01.47 B a α	12.74 B b α
		30	08.72 B b β	17.43 A a α	02.34 A ab β	12.65 A a α	03.80 A a α	02.97 A b β
	200	20	12.35 B a α	12.64 A a α	01.74 B b α	13.91 B a α	01.74 A a α	02.62 AB c α
		30	01.01 B c β	14.29 A a α	01.86 A b α	16.41 A a α	03.53 A a α	01.01 A b α
2	0	20	22.25 A a α	28.78 A a α	11.71 A a α	29.63 A a α	10.85 A a α	29.39 A a α
		30	21.35 A a α	19.76 AB a α	06.66 A a α	14.34 B a β	08.44 A a α	08.15 A a β
	100	20	21.67 A a α	25.39 A ab α	08.44 A a α	15.65 AB b α	04.73 AB b α	15.53 AB b α
		30	19.42 A a α	27.33 A a α	03.63 A a β	16.93 A a α	05.40 A a α	04.01 A a β
	200	20	16.96 AB a α	15.30 A b α	05.91 A a α	20.45 AB ab α	05.35 A ab α	05.45 A c α
		30	01.96 B b β	17.46 A a α	04.96 A a α	12.86 A a α	01.01 A b β	03.30 A a α
4	0	20	25.28 A a α	27.69 A a α	15.95 A a α	29.09 A a α	12.71 A a α	29.59 A a α
		30	18.81 A a α	27.31 A a α	12.55 A a α	25.44 A a α	08.81 A a α	04.40 A a β
	100	20	24.06 A a α	20.74 A a α	06.79 A b α	23.36 A a α	08.41 A ab α	23.43 A a α
		30	14.42 AB a β	24.41 A a α	04.17 A b α	12.71 A b β	03.32 A b β	03.35 A a β
	200	20	22.00 A a α	18.20 A a α	02.40 AB b α	24.38 A a α	03.53 A b α	01.47 B b α
		30	21.69 A a α	18.81 A a α	02.03 A b α	15.40 A ab β	01.67 A b α	02.16 A a α
CV (%)								

*Letras maiúsculas distintas na coluna representam diferenças estatísticas entre as horas para cada temperatura e concentração de boro. Letras minúsculas distintas na coluna indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de boro em cada uma das temperaturas e das horas. Letras gregas distintas na coluna representam diferença significativa entre as temperaturas para cada concentração de boro em cada hora.

ARTIGO 5 (Segundo as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

COMPORTAMENTO DE SELEÇÕES, CULTIVARES E PORTA-ENXERTO DE PEREIRA QUANTO À POLINIZAÇÃO

Ciane Xavier Gonçalves[1], Andrea De Rossi Rufato[2], Márcia Wulff Schuch[2], Juliana Degenhardt[3]

RESUMO - Com o desenvolvimento deste trabalho objetivou-se estudar a compatibilidade gametofítica em seleções, cultivares e porta-enxerto de pereira (*Pyrus* sp.), através da autopolinização, da polinização livre e da polinização cruzada. Os cruzamentos foram os seguintes: Seleção 6.93 (autopolinização de campo, autopolinização de laboratório e polinização livre); Seleção 7.93 (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); Seleção 9.93 (autopolinização e polinização livre); Seleção 96.13.07 (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); 'Red Bartlett' (autopolinização e polinização cruzada com 'Kieffer'); 'Kieffer' (autopolinização de campo, autopolinização de laboratório, polinização livre e polinização cruzada com 'Carrick'); 'Shinseiki' (autopolinização, polinizações cruzadas com 'Abate Fetel', 'Forelle' e 'Kieffer'); 'Williams' (autopolinização e polinizações cruzadas com 'Abate Fetel', 'Carrick', 'Forelle', 'Packham's' e 'Kieffer'); *Pyrus calleryana* (autopolinização e polinização cruzada com 'Abbé Fétel'). Avaliou-se a compatibilidade dos cruzamentos por meio do desenvolvimento do tubo polínico no pistilo da flor, 120 horas após a polinização. Pôde-se concluir que para a maioria dos genótipos e cruzamentos, a metade dos grãos de pólen ficaram concentrados no estigma e a outra metade desenvolveu seus tubos polínicos até atingir o ovário. A fecundação dos óvulos não ocorreu na quase totalidade de genótipos e tipos de polinização. De modo geral, a polinização cruzada beneficia a fecundação.

Termos para Indexação: *Rosaceae*, incompatibilidade gametofítica, auto-incompatibilidade, S-locus.

[1]Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: anexg@hotmail.com - Bolsista Capes
[2]Profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel
[3]Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

ARTICLE 5

THE BEHAVIOR OF SELECTIONS, CULTIVARS AND ROOTSTOCKS OF PEARS REGARDING POLLINATION

ABSTRACT - This experiment aimed to study the gametic compatibility in selections, cultivars and rootstocks of pear (*Pyrus* sp.) through self-pollination, open-pollination and cross-pollination. The crosses were as following: Selection 6.93 (self-pollination in the field and laboratory and open-pollination); Selection 7.93 (self-pollination and cross-pollination in 'Kieffer'); Selection 9.93 (self-pollination and open-pollination); Selection 96.13.07 (self-pollination and cross-pollination with 'Kieffer'); 'Red Bartlett' (self-pollination and cross-pollination with 'Kieffer'); 'Kieffer' (self-pollination in the field and laboratory, open-pollination and cross-pollination with 'Carrick'); 'Shinseiki' (self-pollination, cross-pollination with 'Abate Fetel', 'Forelle' and 'Kieffer'); 'Williams' (self-pollination and cross-pollination with 'Abate Fetel', 'Carrick', 'Forelle', 'Packham's' and 'Kieffer'); *Pyrus calleryana* (self-pollination and cross-pollination with 'Abate Fetel'). It was evaluated the compatibility of the crosses through pollen tube growth in pistil of flower 120 hours after pollination. For most genotypes and crosses, half of the pollen grains were concentrated on the stigma and half developed their pollen tube to reach the ovary. The ovule fecundation did not occur at most genotypes and pollination type. In general, the cross pollination benefits fecundation.

Index Terms: *Rosaceae*, gametic compatibility, self-incompatibility, S-locus.

INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus* sp.) compreende mais de 20 espécies (Nakasu & Faoro, 2003) originárias do continente asiático ou europeu (Rehder, 1967). Este gênero pertence à família Rosaceae, assim como outros gêneros de grande relevância para a fruticultura brasileira, como *Malus, Prunus e Rubus* (Antunes, 2002).

Em Rosaceae, o gene S-RNase, apresenta a estrutura básica formada por cinco regiões altamente conservadoras (C1, C2 C3, RC4 e C5), em que uma destas regiões é

altamente variável (RHV) (Broothaerts et al., 1995). S-RNases são glicoproteínas de aproximadamente 30kDa, que são secretadas na matriz extracelular do estigma, no pistilo e na epiderme do ovário. A rejeição específica conferida pelos alelos S requer níveis extremamente altos de expressão de S-RNase (Cruz Garcia et al., 2003). A S-RNase, foi identificada primeiramente em membros da família Solanaceae, com base nos resultados obtidos, também foram clonados para plantas de Rosaceae (Sassa et al., 1994). Dentro da família Rosaceae, a pereira japonesa foi a primeira espécie em que o mecanismo das ribonucleases foi detectado (Sassa et al., 1992).

A incompatibilidade impede que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando auto-polinizadas, promovendo a alogamia entre indivíduos não relacionados (Quezada & Nakasu, 2003). É o insucesso da interação entre o grão de pólen/tubo polínico em penetrar ou crescer normalmente no estigma (Hiratsuka & Tomita, 1989) ou no tecido do ovário (Modlibowska, 1945).

A inibição do tubo polínico pode ocorrer desde a germinação do pólen (Lewis & Modlibowska, 1942) até a fertilização do óvulo/primeira divisão do zigoto (Carvalho & Raseira, 1990). Em algumas espécies quando deposita-se o pólen no estigma da flor, este pode não germinar, ou pode acontecer de a germinação ocorrer muito lentamente e não alcançar o ovário em tempo de fertilizar o óvulo (Leite & Souza, 2003).

A auto-incompatibilidade pode ser classificada em heteromorfa e homomorfa, esta segunda reação ocorre quando o cruzamento é incompatível, resultando na inibição do crescimento do tubo polínico que é dependente da interação entre os produtos dos alelos S idênticos, que estão no pólen e na parte feminina da flor. A forma homomorfa apresenta duas divisões: o sistema esporofítico, de maior incidência em Brassicas (Leite & Souza, 2003), e o sistema gametofítico, bastante importante para espécies frutíferas da família Rosaceae (Muñoz & Casilda, 1998), como por exemplo, a *Pyrus calleryana* (Zielinski, 1965), a pereira européia *(Pyrus communis)*, a ameixeira, a macieira, a cerejeira (Leite & Souza, 2003), amêndoa, damasco, e outras espécies de *Pyrus* (Tomimoto et al., 1996; Zuccherelli et al., 2002). É considerado o tipo de incompatibilidade mais distribuído nas angiospermas, pois além de estar presente na família Rosaceae também encontra-se nas famílias Solanaceae, Papaveraceae, Liliaceae, Onagraceae, Leguminosae, Commelinaceae e Amaryllidaceae (Gibbs, 1986). Grande parte das cultivares comerciais de pereira são auto-incompatíveis, pois não produzem frutos com sementes; outras são parcialmente auto-

produtivas, pois produzem frutos sem sementes quando auto-polinizadas, ou seja, acontece o fenômeno de partenocarpia estimulativa (Leite & Souza, 2003).

Este tipo de incompatibilidade é um mecanismo controlado geneticamente que impede a autopolinização e promove a polinização cruzada, onde o grão de pólen germina e a reação de incompatibilidade ocorrerá entre o tubo polínico e o estilete (Newbigin et al., 1993). Este mecanismo é controlado pelo S-locus que, é um lócus multialélico que codifica glicoproteínas com atividade ribonucleásica. Tais enzimas atuam bloqueando o crescimento do tubo polínico no estilete, de forma a impedir a polinização (Zisovich et al., 2004; Zuccherelli et al., 2002).

Um dos maiores problemas envolvidos na produção de pêra é a baixa frutificação, causada pelas limitações que envolvem o processo de polinização. Pois quando a polinização é insuficiente, conseqüentemente há formação de poucas sementes. Desta maneira, através da realização deste trabalho objetivou-se determinar a ocorrência de compatibilidade e incompatibilidade gametofítica para os cruzamentos realizados para as seleções 6.93, 7.93, 9.93, 96.13.07, para as cultivares Red Bartlett, Kieffer, Shinseiki e Williams e para o porta-enxerto *Pyrus calleryana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Vegetal, e no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado (CPACT), Pelotas, RS; e no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel, Pelotas, RS.

Tanto para os experimentos realizados a campo como para os experimentos realizados em laboratório, referentes à Tabela 1, as polinizações foram executadas no momento em que os genótipos a serem polinizados apresentavam número suficiente de flores em estádio de balão para compor os tratamentos. A metodologia empregada é semelhante à utilizada para outras fruteiras como ameixa, pessegueiro, damasqueiro, adaptada do método desenvolvido para gramíneas por Wilson & Brown (1957).

No campo, os ramos cujas flores foram designadas para autopolinização, foram ensacados com TNT (Tecido Não Tecido), com estruturas adaptadas, que foram feitas a partir de círculos em arame, para dar sustentação, envolto com TNT e, identificados com fitas plásticas amarradas na base. Fez-se necessário o ensacamento das flores designadas

para autopolinização, pois diferentemente da polinização dirigida, haveria risco de contaminação com pólens indesejáveis, uma vez que as abelhas não são atraídas por flores sem pétalas e emasculadas (Furr & Carpenter, 1961; Socias, 1987).

Os ramos com flores em estádio de balão, designados para polinização livre, apenas foram identificados com fitas plásticas. As fitas plásticas diferiam de cor, dependendo do tratamento (Figura 1).

Para os cruzamentos de laboratório, coletou-se no campo, os ramos com flores em estádio de balão. Em laboratório, foram realizadas autopolinização e polinização cruzada.

Para emascular as flores de pereira utilizou-se uma tesoura pequena, ou a unha para a remoção da corola e do androceu, deixando-se apenas o pistilo no alto e o receptáculo na parte distal. Em seguida, realizou-se a polinização, passando-se levemente o dedo ou o pincel contendo bastante pólen sobre o estigma da flor. Para a autopolinização destes genótipos, exceto para *Pyrus calleryana*, as flores dos ramos selecionados foram emasculadas e polinizadas com o próprio pólen. Tanto para a autopolinização de *Pyrus calleryana* como para a polinização cruzada dos demais genótipos a polinização foi dirigida, pois assim foi possível depositar bastante quantidade de grãos de pólen no estigma, maximizando a probabilidade de todos os óvulos serem penetrados. Visto que em polinizações naturais, o número de grãos de pólen depositados no estigma nem sempre é suficiente para que haja penetração dos tubos polínicos em todos os óvulos presentes no ovário (Waser & Price, 1991; Stephenson & Bertin 1983; Bawa & Webb 1984).

Após cada cruzamento as mãos foram lavadas com álcool etílico 70% para evitar a contaminação de um pólen com o outro. Os ramos foram mantidos em frascos com água, à temperatura ambiente, por cinco dias (120 horas) (Figura 1).

As polinizações foram executadas no momento em que os genótipos a serem polinizados apresentavam número suficiente de flores em estádio de balão para compor os tratamentos.

Na retirada dos pistilos para observação foi feito um corte de 0,5 cm no pedúnculo da flor e a parte externa foi retirada, permanecendo apenas o ovário, o estilete e o estigma. Em seguida os pistilos foram colocados em pequenos frascos de vidro contendo uma solução fixativa, composta por formol, ácido acético e álcool etílico na proporção de 1:1:8. Os frascos foram armazenados em geladeira a temperatura de 4°C, até serem observados, sendo o período mínimo de 24 horas de armazenagem antes da observação.

Antes de se realizar a observação, os pistilos foram lavados três vezes com água destilada, para que fixativo fosse retirado, e então, colocados em solução 8N de NaOH, durante 24 horas a temperatura ambiente, em torno de 25°C. Decorridas 24 horas, os pistilos foram novamente lavados por 3 vezes em água destilada, para a retirada dessa solução. Em seguida foram colocados em frascos contendo hipoclorito de sódio a 20% por um período de 20 minutos. Logo após o material foi lavado por três vezes com água destilada, para remover os resíduos do hipoclorito de sódio e foi então transferido para frascos contendo corante diferencial Lacmoide (Ressorcinol azul a 1% - 1g de Lacmoide para 100ml de água destilada), durante 10 minutos.

Após estes procedimentos, os pistilos estavam preparados para a observação no microscópio óptico. Para o preparo das lâminas colocou-se o pistilo, procurando deixá-lo bem esticado, sobre uma lâmina de vidro e adicionaram-se três gotas de corante diferencial lacmoide diluído em água destilada (1:2). Logo se cobriu a lâmina com lamínula, pressionando-a levemente, até que o pistilo ficasse amassado (Figura 2).

Para avaliar a compatibilidade entre os genótipos observou-se o crescimento do tubo polínico no estigma das flores 120 horas depois da polinização, com o auxílio de um microscópio foram estabelecidas onze etapas de percurso, de acordo com o desenvolvimento do tubo polínico, com base na classificação de Franken et al., (1988), modificada, conforme mostra a Tabela 2.

O delineamento experimental utilizado nestes experimentos foi o inteiramente casualizado com três repetições de 20 flores; exceto para as polinizações realizadas em *Pyrus calleryana*, onde utilizou-se quatro repetições de 50 flores. As médias foram submetidas à análise da variância através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Para os cruzamentos realizados em seleção 96.13.07 e cultivar Williams os dados, expressos em percentagem, foram transformados em arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X representa o valor percentual obtido para cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas amostras avaliadas, as cultivares Abbé Fétel, Carrick, Kieffer, Red Bartlett, a Seleção 7.93 e o porta-enxerto *P. calleryana* podem ser condideradas boas polinizadoras, uma vez que, o pólen é considerado bom quando apresenta germinação em torno de 70% ou mais, porém existem cultivares que apresentam taxa de germinação em

torno de 30% ou menos, sendo consideradas más polinizadoras (Horticultura Education Association Fruit Commitee, 1961). Através de testes de viabilidade de grãos de pólen *in vitro*, obteve-se germinação para os genótipos de pereira utilizados nas polinizações (Tabela 3).

Experimentos realizados a campo e em laboratório

Com relação às polinizações realizadas na Seleção 6.93 (Tabela 4), observa-se que tanto na autopolinização a campo, quanto em laboratório e na polinização livre, um número bastante elevado de grãos pólens não formaram tubos polínicos, pois os mesmos não coloriram na presença do corante diferencial Lacmoide (Etapa 0). Porém este número foi estatisticamente superior na polinização livre. Raseira & Raseira (1996), ao estudarem a polinização livre em pistilos de araçazeiro 'Amarelo planalto', também observaram baixa quantidade grãos de pólen germinados. A maior percentagem de grãos de pólen que não desenvolveram tubo polínico no caso da polinização livre pode estar relacionada a fatores ambientais. Conforme menciona Carlone (1956), a fecundação pode ser afetada em maior escala por fatores ambientais do que por fatores morfo-fisiológicos ou genéticos.

Relacionando-se os três tipos de cruzamentos nota-se que em todos os casos aproximadamente 50% dos tubos polínicos chegaram ao interior do ovário (Etapa 7), porém não houve fertilização, pois das etapas 8 a 10 do percurso, o desenvolvimento dos tubos polínicos foi nulo.

Ainda na Tabela 4, observa-se que, estatisticamente, não houve benefício da condição controlada (laboratório) sobre a fecundação do óvulo na autopolinização, já que em ambos casos (laboratório e campo), cerca de 22% dos grãos de pólen não germinaram e aproximadamente 50% chegaram a penetrar o ovário, porém sem fertilização.

Para os cruzamentos realizados na cultivar Kieffer (Tabela 5), observa-se que a maior percentagem de tubos polínicos inviáveis, ou seja, presentes na etapa zero do percurso ocorreu para a autopolinização feita em laboratório; importante salientar que estes resultados não diferiram significativamente para a etapa 7 do percurso. Souza (1999) constatou que na autopolinização, no estigma das flores de pereira, das cultivares Ya-li (S-locus S_1_), Carrick e Kieffer havia bastante quantidade de grãos de pólen não coloridos pelo corante diferencial Lacmoide, indicando a inviabilidade polínica. Conforme Frankel & Galum (1977), quando os alelos são idênticos, a velocidade de crescimento do tubo polínico torna-se mais lenta, ou mesmo nula, retardando a sua penetração até o ovário, e quando

atinge o mesmo dificilmente ocorrerá à fecundação, porque geralmente a fase de receptividade do óvulo já passou.

Comparando-se os cruzamentos de autopolinização (campo e laboratório) e polinização livre, observa-se que a maior percentagem de tubos polínicos está concentrada na etapa 7 do percurso (Tabela 5). Este resultado que pode ser considerado positivo, se comparado com os resultados obtidos por Souza (1999), pois o autor observou que a reação de incompatibilidade das auto-polinizações está concentrada na região do estigma das flores e, estudando a autopolinização das cultivares de pereira Ya-li, Carrick e Kieffer, observou que o crescimento dos tubos polínicos, após 120 horas, de polinização alcançou no máximo 1/3 do comprimento do estilete.

Ainda na Tabela 5, nota-se que a polinização cruzada entre 'Kieffer' x 'Carrick' apresentou os melhores resultados, pois o maior percurso percorrido pelos tubos polínicos atingiu a etapa 8, ou seja, os tubos polínicos atingiram o ovário e estão próximos ao óvulo. Souza (1999), estudando o mesmo parâmetro citado, observou que quando foi realizado o cruzamento 'Kieffer' x 'Carrick', 'Kieffer' x 'Garber' e 'Carrick' x 'Kieffer', estes apresentaram elevados índices de fertilização, sendo considerados compatíveis; entretanto quando realizou o cruzamento entre 'Kieffer' x 'Ya-li' (progenitor masculino), houve 50% de germinação dos tubos polínicos no estigma das flores, desenvolvendo até o interior do óvulo, porém quando o cruzamento foi ao inverso, poucos tubos polínicos desenvolveram até penetrar no ovário.

Pode-se constatar que a cultivar Kieffer é auto-incompatível, pois nas duas autopolinizações (de campo e de laboratório), a etapa 7 foi o maior percurso atingido pelos tubos polínicos (Tabela 5); este desenvolvimento lento, atingindo a proximidade do óvulo é característico da incompatibilidade gametofítica (Garcia & Romero, 1998). Resultados que concordam com Souza (1999), que encontrou cerca de 35% dos tubos polínicos, no ovário, quando realizou a autopolinização para a cultivar Kieffer.

Comparando-se a polinização cruzada com a polinização livre observa-se que o cruzamento dirigido ('Kieffer' x 'Carrick') beneficiou a fecundação já que mais de 24% dos tubos polínicos atingiram a etapa 8 do percurso (Tabela 5). Conforme menciona Souza (1999), a cultivar Kieffer não tem parentesco com a cultivar Carrick, facilitando a fecundação cruzada. A polinização livre pode ter sido afetada por fatores climáticos, já que

somente uma pequena quantidade de tubos polínicos atingiu o ovário, chegando às proximidades do óvulo.

Experimentos realizados a campo

Para a Seleção 9.93 (Tabela 6), verificou-se que ambos cruzamentos apresentaram grande quantidade de tubos polínicos inviáveis posicionados no estigma das flores, sendo que na autopolinização a média foi significativamente superior à polinização livre; fato que pode evidenciar a auto-incompatibilidade para a Seleção 9.93.

Ainda na Tabela 6, tanto para a autopolinização quanto para a polinização livre, cerca de 50% dos tubos polínicos alcançaram a etapa 7 no percurso, ou seja, penetraram no ovário; não diferindo significativamente entre si. A partir dos resultados encontrados para a polinização livre, acredita-se que esta foi influenciada pelos fatores ambientais, pois para frutificação efetiva foi constatado que as variações climáticas (alternância de frio e calor) após a polinização (Whilliams & Maier, 1977; Soltész, 1997); bem como, as baixas temperaturas após a floração (Petri & Pascoal, 1981; Schramm, 1985), afetaram o crescimento e a penetração dos tubos polínicos. Além dos fatores ambientais, a polinização livre pode ter sido provavelmente afetada pela pouca disponibilidade de pólen livre no ambiente.

Experimentos realizados em laboratório

Tanto para a autopolinização como para a polinização cruzada, realizadas na Seleção 7.93 (Tabela 7), observou-se que os tubos polínicos penetraram no ovário. É importante salientar que a autopolinização apresentou quase o dobro de tubos polínicos na etapa 7 do percurso com relação a polinização cruzada (Seleção 7.93 x 'Kieffer'), porém o desenvolvimento dos tubos polínicos até o interior dos óvulos ocorreu apenas para a polinização cruzada (Seleção 7.93 x 'Kieffer'), onde 6.32% dos tubos polínicos fecundaram os óvulos 120 horas após a polinização; nas três últimas etapas do percurso, a polinização cruzada com 'Kieffer' foi superior à autopolinização. Este resultado comprova que existe certo grau de compatibilidade entre os genótipos deste cruzamento. Modlisbwska (1945); Teskey & Shoemaker (1978); Sttot (1972) ao estudarem a compatibilidade de tubos polínicos, concluíram que os incompatíveis crescem mais lentamente que os compatíveis. Também Gibbs e Bianchi (1999) ao estudarem espécies de Bignoniaceae com auto-incompatibilidade gametofítica tardia (LSI), observaram que houve certo atraso para a incidência da penetração dos óvulos em pistilos autopolinizados quando comparados com os

pistilos de polinização cruzada em ‘Tabebuia nodosa’ e ‘Dolichandra cynanchoides’, mesmo que após 96 horas o número de óvulos penetrados tenha se igualado para os dois cruzamentos.

Para a seleção 96.13.07 (Tabela 7), quando se compara autopolinização com a polinização cruzada com ‘Kieffer’ o maior número de tubos polínicos não coloridos, situados no estigma das flores, pertencem à autopolinização. Para Lewis (1994), há inibição do tubo polínico na parte superior do estilete em espécies com incompatibilidade de tipo homomórfica esporofítica. Em Compositae, tais reações são chamadas de reações P*, e são encontradas em cruzamentos que apresentam reações do tipo +/-; reações do tipo +/- representam cruzamentos parcialmente compatíveis, quando o sistema de incompatibilidade apresenta controle gametofítico; estas reações acontecem quando as plantas envolvidas em determinado cruzamento possuem um alelo em comum, resultando assim, na inibição da metade dos grãos de pólen que possuem esse alelo (-) e para a outra metade ocorre à fertilização (+).

O desenvolvimento dos tubos polínicos nos pistilos da autopolinização ocorreu até a etapa 8 e, para a polinização cruzada atingiu a etapa 9 do percurso, porém com médias muito pouco expressivas. Estes resultados, que indicam certo grau de incompatibilidade, podem ser explicados por Thiele & Stridom (1964). Estes autores, ao pesquisarem combinações de ameixeira, observaram que em casos de incompatibilidade ocorre germinação dos grãos de pólen em 24 horas após sua aplicação, porém 48 horas depois o tubo polínico ainda não atingiu a metade do pistilo, e com 72, 96 e 120 horas os tubos polínicos ainda continuam se desenvolvendo lentamente.

Com relação às polinizações realizadas na cultivar Red Bartlett (Tabela 7), observou-se que para a autopolinização a percentagem de tubos polínicos que nem germinaram, permanecendo no estigma foi aproximadamente três vezes maior em relação à polinização cruzada com ‘Kieffer’.

Para essa cultivar, verificou-se que em ambos cruzamentos, cerca de 40% dos tubos polínicos penetraram o ovário, mas não houve fertilização; e ainda que cerca de 5% dos tubos polínicos chegaram até a etapa 8 do percurso. Talvez os tubos polínicos tivessem penetrado nos óvulos se os pistilos fossem observados algumas horas depois. Pois, conforme Carvalho (1989), analisando o desenvolvimento dos tubos polínicos em cruzamentos de algumas cultivares de ameixeira, constatou que nem sempre o tempo de 120

horas é suficiente, sendo necessárias 144 horas, para que os mesmos fecundem os óvulos. Porém Dicenta et al. (1995), estudando a polinização cruzada e a autopolinização em amêndoas, verificaram que após 96 de polinização, 90% dos ovários foram penetrados pelos tubos polínicos.

Na Tabela 8, nos cruzamentos realizados para a cultivar Shinseiki que tem o S-locus S_3S_4, o maior número de tubos polínicos inviáveis na etapa 0 do percurso foi representado pela autopolinização e pela polinização cruzada com 'Forelle', porém estes resultados foram significativamente diferentes, destacando-se como representante de tubos polínicos inviáveis a autopolinização. Ainda com relação à autopolinização pôde-se observar que, embora não diferindo significativamente, das demais polinizações apresentou a mais baixa percentagem de tubos polínicos para fecundação dos óvulos.

Para a autopolinização (S_3S_4 x S_3S_4) e polinização cruzada com 'Abbé Fétel' (S-locus S_aS_b) a maior percentagem atingida pelos tubos polínicos foi 7. Já para os cruzamentos com 'Forelle' (S-locus S_jS_n) e 'Kieffer' a maior percentagem de tubos polínicos ocorreu na etapa 8 do percurso, sendo que a polinização cruzada com 'Kieffer' foi estatisticamente superior. Desta maneira, pôde-se constatar que o tempo, para o completo desenvolvimento dos tubos polínicos até o interior dos óvulos não foi suficiente, pois os cruzamentos 'Shinseiki' x 'Abbé Fétel' e 'Shinseiki' x 'Forelle' são completamente compatíveis; também pode ser que haja certo grau de compatibilidade entre o cruzamento 'Shinseiki' x 'Kieffer' pois, os tubos polínicos, deste cruzamento, desenvolveram-se semelhantemente aos cruzamentos que foram altamente compatíveis.

Talvez estes resultados possam ser explicados por Santos et al. (2007) que ao estudarem o sistema auto-incompatibilidade de *Acca sellowiana*, observaram que em autopolinizações e polinizações cruzadas após 12 horas, o crescimento do tubo polínico estava na superfície estigmática ou ao início do primeiro terço do pistilo, após 24 horas, o tubo ainda estava no primeiro terço do pistilo e, com 48 horas, os tubos polínicos estavam na região central do pistilo, sendo que o crescimento completo do tubo polínico até o ovário foi constatado em pistilos coletados 96 horas após a polinização, porém não foi possível observar a entrada do tubo polínico na micrópila do óvulo.

Para as polinizações realizadas na cultivar Williams (Tabela 9), a maior percentagem de tubos polínicos não coloridos na etapa zero, ocorreu para a polinização cruzada com a cultivar Carrick. Em seguida estão à autopolinização e a polinização cruzada com a cultivar

Packham's. A cultivar Carrick é originária do cruzamento entre 'Garber' e 'Seckel' (Nakasu & Leite, 1990), sendo assim deve ter herdado parte dos alelos de incompatibilidade gametofítica da cultivar Garber (S_1S_2 x S_1S_3), pois Souza (1999), ao cruzar as cultivares 'Carrick' x 'Garber', observou que os tubos polínicos apresentaram desenvolvimento como de cultivares semi-compatíveis, ou seja, embora em pequena quantidade, houve penetração do tubo polínico no ovário. E ainda, para confirmar este grau de incompatibilidade entre 'Williams' x 'Carrick', Sazon & Herrero (2002), utilizando iniciadores de maçã via S-PCR, identificaram o S-locus de dez cultivares de pereira européia, entre estas, encontra-se a 'Williams' (S_1S_2).

A maior quantidade de tubos polínicos que atingiram a etapa 7 do percurso, estão presentes para a autopolinização e para as polinizações cruzadas com as cultivares Carrick, Packham's e Kieffer. Já nas polinizações cruzadas com 'Abbé Fétel', com S-locus S_aS_b (Zuccherelli et al., 2002) e 'Forelle' com S-locus S_jS_n (Zisovich et al., 2004), os tubos polínicos atingiram a etapa 8 do percurso. Sendo assim, verificou-se que os alelos destas cultivares são completamente compatíveis. E, para as polinizações cruzadas com 'Abbé Fétel' e 'Kieffer', embora em quantidade menor, houve fecundação. Desta maneira, é possível afirmar que o tempo para que ocorresse o completo desenvolvimento dos tubos polínicos até o interior dos ovários não foi o suficiente. Conforme menciona Modliboswka (1945), em cruzamentos semi-compatíveis, apenas os grãos de pólen que têm o alelo S na constituição genética, com índice diferente do alelo S dos tecidos diplóides dos pistilos, apresentam a capacidade de desenvolvimento, sendo esta classe representada por apenas 50% dos grãos de pólen que foram depositados no estigma das flores.

Para as polinizações realizadas em *Pyrus calleryana* (Tabela 10), observa-se que a percentagem de grãos de pólen que não germinaram foi maior para a polinização cruzada com a cultivar Abbé Fétel do que para a autopolinização (Etapa 0). Acredita-se que esta baixa percentagem de desenvolvimento do tubo polínico tenha ocorrido pelo fato de realizar-se a polinização cruzada com espécies diferentes (*P. calleryana* x *Pyrus communis*). Pois em angiospermas, a germinação dos grãos de pólen entre espécies distintas pode ocorrer, no entanto, pode ser que os tubos polínicos não atinjam os óvulos, pois o crescimento dos mesmos é lento; havendo incompatibilidade fisiológica de maior ou de menor extensão entre o pólen e o pistilo (Futuyma, 2002). De acordo com Modlibowsa (1945); Roy (1938); Thiele & Strydom (1964), estes resultados podem estar relacionados

com a incompatibilidade que existe entre os genótipos testados; ou ainda com as condições climáticas no momento de realização das polinizações e também após o florescimento (Thompson & Liv, 1973). Vale ressaltar que neste caso, as condições climáticas não influenciaram, pois este experimento foi realizado em laboratório, em condições controladas.

Na autopolinização (Tabela 10), grande quantidade de grãos de pólen formaram tubos polínicos, ficando a maioria bastante próxima à entrada do ovário, e 27,19% dos tubos polínicos chegaram ao interior do ovário e cerca de 7% fecundaram o ovário. Tanto para a autopolinização como para a polinização cruzada com 'Abbé Fétel' observou-se que a maioria dos grãos de pólen foram capazes de germinar e chegar perto do ovário ou mesmo promover a fecundação. Porém a percentagem de tubos polínicos que atingiu a etapa 10 do percurso após 120 horas de polinização foi baixa, sendo que para a autopolinização a taxa de fecundação foi considerada estatisticamente superior à polinização cruzada com 'Abbé Fétel'.

Os resultados encontrados neste experimento não são os que normalmente ocorrem, pois, quanto maior o grau de parentesco entre cultivares, maior é o grau de incompatibilidade (Modlibowska, 1945).

CONCLUSÕES

Para a maioria dos genótipos e cruzamentos, a metade dos grãos de pólen ficaram concentrados no estigma e a outra metade desenvolveu seus tubos polínicos até atingir o ovário.

A fecundação dos óvulos não ocorreu na quase totalidade de genótipos e tipos de polinização.

De modo geral, a polinização cruzada beneficia a fecundação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural.** Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

BAWA, K. S.; WEBB, C. J. Flower, fruit and seed abortion in tropical tree: Implications for evolution of paternal and maternal reproduction patterns. **American Journal of Botany,** v.71 , p.736-751, 1984.

BROOTHAERTS, W.; JANSSENS, G. A.; PROOST, P. and BROEKAERT, W. F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. **Plant Molecular Biology**, v.27, 499-511, 1995.

BURKHART, D. **Tipos de pie utilizados en noroeste de EEUU**. General Roca. Argentina, INTA, 1991. n.p. Trab. apres. no Curso Internacional de peras.

CARLONE, R. Influenza del diverso momento d' impollinazione sull' allegagione e sulla crescita del túbulo pollinico nel melo Golden Delicious. **Genética Agrária**, v.6, n.6, p.3-16. 1956.

CARVALHO, T. C. P. **Comportamento de algumas cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) quanto a polinização no Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 1989, 73f.

CARVALHO, T. C. P.; RASEIRA, M. D. B. Aspectos relacionados à polinização e autocompatibilidade em amexeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.). **Horti Sul**, Pelotas, v.1, n.2, p.29-32, 1990.

CRUZ-GARCIA**,** F.; HANCOCK, C. N.; MCCLURE, B. S-RNase complexes and pollen rejection. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.380, p**.**123-130, jan. 2003.

DICENTA, F.; ORTEGA, E.; MARTÍNEZ-GÓMES, P.; BOSKOVIC, R.; TOBUTT, K. R. Comparisonof homozygous and heterozygous self-compatible seedlings in an almond breeding programme. **Euphytica**, Editora e Gráfica Universitária 2.ed Pelotas: 1995. 178p.

FRANKEL, R.; GALUM, E. **Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding**. Springer-Verlag. 281p. 1977.

FRANKEN, J.; CUSTERS, J. B. M.; BINO, R. J. Effects of temperature on pollen tube growth and fruit set in reciprocal crosses between. *Cucumis sativus* and *C. metuliferus*. **Plant Breesing**, 1988, v.100, n.150, p.3.

FURR, J. R.; CARPENTER, J. B. Program for breeding citrus rootstocks tolerant to *Phytophthora* root rot. **Proceedings of Florida Station Horticultural Society**, v.18, p.18-23, 1961.

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. Ribeirão Preto: FUNPEC-RC, 2.ed. 2002, 631p.

GARCIA, J. R.; ROMERO, M. H. La polinización del albaricoquero. **Fruticultura Professional**. Barcelona, n.96 especial, p.66-70, 1998.

GIBBS**,** P. E. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanisms. **Plant Systematics and Evolution**, v.154, p.285-323, 1986.

GIBBS, P. E.; BIANCHI, M. B. Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family Clustering. Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, London, v.84, p.449-457, 1999.

HIRATSUKA, S.; TOMITA, A. Incompatible pollen tube growth and protein composition in styles of Japanese pear following high temperature treatments. **Euphytica**, Springer Netherlands, 1989, v.43, n.3, p.191-196.

HIRATSUKA, S.; ZHANG, S. L. Relationsips between fruit set, pollen-tube growth, and S-RNase concentration in the self-incompatible Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.309-318, 2002.

HORTICULTURAL EDUCATION ASSOCIATION FRUIT COMMITTEE. London. The pollination of fruits crops. **Scientific Horticulture**, v.15, p.126-50, 1961.

HUGARD, J. Origine du pollen et varietes pollinisatrices. **Le Fruit Belge,** n.381, 1978, p.11-32.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. de Polinização In: **Frutas do Brasil-46**, Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.23-28.

LEWIS, D. Gametophytic-sporophytic incompatibility. *In:* WILLIAMS, E. G.; CLARKE, A. E.; KNOX, R. B. **Advances in cellular and molecular biology of plants**: **genetic control of self incompatibility and reproductive development in flowering plants.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. v.2, p.88-101.

LEWIS, D.; MODLIBOWSKA, I. Genetical studies in pears IV. Pollen-tube growth and incompatibility. **Journal of Genetics**, v.43, p.211-222, 1942.

MODLIBOWSKA, I. Pollen tube growth and embryo-sac development in apple and pears. **Journal Pomology and Horticultural Science**, v.21, p.59-89, 1945.

MUÑOZ, A. F.; CASILDA, A. Ensayos de polinización de variedades de ciruelo japonês (*Prunus salicina* L.) em lãs vegas del Guadiana (Badajoz). **Fruticultura Professional**, Barcelona, n.96, p.72-76, 1998.

NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Indicação de porta-enxerto e cultivares de pereira para o Sul do Brasil. **Horti Sul**, Pelotas, v.1, n.2, p.20-24, 1990.

NAKASU, B.H.; FAORO, I.D. Cultivares. *In*: Nakasu, B. H.; Quezada, A. C.; Herter, F.G. **Pêra. Produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Brasilia: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, cap.5, p.29-36.

NEWBIGIN, E., ANDERSON, M.A., CLARKE, A. E. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell,** v.5, p.1315-1324, 1993.

PETRI, J., PASQUAL, M. **Polinização da macieira no alto do Rio do Peixe, Santa Catarina.** Florianópolis: EMPASC, 1981, 40p. (Boletim Técnico, 1).

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H. Classificação botânica, origem e evolução In: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.20-22.

RASEIRA, M. do C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro** (*Psidium cattlyanum*). Pelotas: Embrapa – CPACT. Pelotas, RS, 1996, 95p.

REHDER, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**. 2nd ed. New York: Macmillan, 1967.

ROY, B. Studies on pollen tube growth in Prunus. **J. Pomol**., n.16, p.320-329, 1938.

SANTOS, K. L. dos.; LENZI, M.; CAPRESTANO, C. A.; DANTAS, A. C. de M.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Evidência da atuação do sistema de auto-incompatibilidade tardia em *Acca sellowiana* (Berg) Burret. (Myrtaceae) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.29, n.1, p.120-123, ab. 2007.

SANZOL, J.; HERRERO, M. Identification of self-incompatibility alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cultivars, **Euphytica** (in press), 2002.

SASSA, H.; HIRANO, H.; IKEHASHI, H. Self-incompatibility related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). **Plant Cell Physiology,** n.33, p.811-814, 1992.

SASSA, H.; MASE, N.; HIRANO, H; IKEHASHI, H. Identification of self-incompatybility related glycoproteins in styles of apple (*Malus domestica*). **Theoretical Applied Genetics,**v.89. p.201-205. 194.

SCHRAMM, C. C. **Compatibilidade e incompatibilidade gametofítica entre as principais cultivares de macieiras** (*Malus domestica*, Borkh.) **em Pelotas**. Pelotas, 1985, 58f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas.

SOCIAS, R. La polinizacion de los frutales. **Hojas divulgadoras**, Zaragoza, n.17, p.3-18, 1987.

SOLTÉSZ, M. Lows of bloom phenology by apple. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.437, p.451-456, 1997.

SOUZA, C. M. de. **Incompatibilidade Gametofítica em cultivares de pereira** (*Pyrus* spp). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1999. 44f. Tese (Doutorado em Agronomia), 1999.

STEPHENSON, A. G.; BERTIN, R. I. Male competition, female choice and sexual selection in plants. *In:* **Pollination Biology** (L. A. REAL, ed.). New York: Academic Press, 1983. p.109-149.

STOTT, K. G. Pollen germination and pollen tube characteristics in orange of apple cultivars. **Journal Horticultural Science**, n.47, p.191-198, 1972.

TESKEY, B. J. E.; SHOEMAKER, J. S. **Plums**. Production, 3.ed., Westeport: Connecticut, USA, 1978. p.358-86.

THIELE, I.; STRYDOM, D. K. Incompatibility studies in some japanese plum cultivars (*P. salicina*, L) grown in South Africa. **South African Journal Agricultural Science**., n.7, p.165-168, 1964.

THOMPSON, M. M.; LIV, L. J. Temperature, fruit set and embryo sac development in *Italian Prune*. **Journal American Society Horticultural Science**, n.98, v.2, p.193-197, 1973.

TOMIMOTO, Y.; NAKAZAKI, T.; IKEHASHI, H.; UENO, H.; HAYASHI, R. Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. **Science Horticultural**, Amsterdam, n.66, p.159-167, 1996.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. Reproductive costs of self pollination in *Ipomopsis aggregate* (Polemoniaceae): are ovules usurped. **American Journal of Botany,** n.78, p.1036-1043, 1991.

WHILLIAMS, R. R., MAIER, M. Pseudo-compatibility after-pollination of the Cox's Orange Pippim. **The Journal of Horticultural Science,** Ashford, n.52, p.475-483, 1977.

WILSON, J. A.; BROWN, S. O. Differential staining of pollen tubes in grass pistils. **Agronomy Journal**, n.49. p.220-222, 1957.

ZIELINSKI, Q. B. Self-incompatibility of *Pyrus* species. Bull. **Torrey Botanical Club**, n.92, p.219-220, 1965.

ZISOVICH, A.; STERN, R.; SHAFIR, S. Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**., n.79, p.101-106, 2004.

ZUCCHERLLI, S.; TASSINARI, P.; BROOTHAERTS, W. TARTARINI, S; DONDINI, L.; SANSAVINI, S. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). **Sexual Plant Reproduction**. n.15, p.153-158, 2002.

Tabela 1 - Tipos de polinização, local de execução e genótipos de pereira usados para testar a compatibilidade polínica. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Genótipos	Polinizações			
	Autopolinizações		Polinização livre	Polinizações cruzadas
	Laboratório	Campo		Laboratório
Seleção 6.93	X	X	X	X
Seleção 7.93	X			X
Seleção 9.93		X	X	
Seleção 96.13.07	X			X
Kieffer	X	X	X	X
Red Bartlett	X			X
Shinseiki	X			X
Williams	X			X
Pyrus calleryana	X			X

Tabela 2 - Etapas de percurso estigma-ovário conforme o desenvolvimento dos tubos polínicos. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Etapa do percurso	Desenvolvimento do tubo polínico
0	Tubo polínico, não colorido, no estigma
1	Tubo polínico no início do pistilo
2	Tubo polínico a ¼ pistilo
3	Tubo polínico a 1/3 pistilo
4	Tubo polínico na metade do pistilo
5	Tubo polínico próximo ao ovário
6	Tubo polínico no interior do ovário
7	Ausência de tubo polínico próximo ao óvulo
8	Tubo polínico próximo ao óvulo
9	Tubo polínico no interior do saco embrionário
10	Tubo polínico no interior do óvulo

* Adaptado de Franken et al., 1988

Tabela 3 - Percentagem de germinação de grãos de pólen de genótipos de pereira utilizados nos cruzamentos. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Genótipos	**% Viabilidade**
Cultivares	Abbé Fétel	56,75
	Abbé Fétel 02	-
	Carrick	47,75
	Forelle	35,25
	Kieffer	50,00
	Red Bartlett	54,00
	Shinseiki	-
Seleções	6.93	37,50
	7.93	51,25
	9.93	36,25
	96.13.07	-
Porta-enxerto	*Pyrus calleryana*	*55,75*

Tabela 4 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização (campo e laboratório) e da polinização livre da Seleção 6.93. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Etapas do percurso	Polinizações		
	Autopolinizações		Polinização livre
	Laboratório	Campo	
0	22,97 B b	22,69 B b	42,68 A b
1	21,09 A b	09,18 B c	04,30 B c
2	00,00 A c	03,47 A de	00,00 A c
3	01,72 A c	04,80 A de	00,00 A c
4	04,07 A c	06,28 A cd	01,33 A c
5	00,88 A c	01,95 A e	00,70 A c
6	00,88 A c	00,00 A e	00,70 A c
7	48,39 A a	51,63 A a	50.29 A a
8	00,00 A c	00,00 A e	00,00 A c
9	00,00 A c	00,00 A e	00,00 A c
10	00,00 A c	00,00 A e	00,00 A c
CV (%)		**27,91**	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização (campo e laboratório), polinização livre da cultivar Kieffer e da polinização cruzada ('Kieffer' x 'Carrick'). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Etapas do percurso	Polinizações			
	Autopolinização		Polinização livre	Polinização cruzada
	Campo	Laboratório		Carrick
0	12,74 B c	49,22 A a	01,82 D ef	08,70 C d
1	15,74 A b	00,00 C b	00,48 C fg	06,20 B e
2	04,81 A d	00,00 B b	00,32 B fg	00,00 B f
3	03,15 B d	00,00 C b	07,11 A d	04,95 B e
4	11,10 B c	00,00 C b	25,30 A b	11,10 B c
5	03,24 C d	00,00 D b	12,04 A c	06,82 B de
6	00,00 C e	00,00 C b	03,81 B e	12,24 A c
7	48,63 A a	50,78 A a	40,08 B a	21,10 C b
8	00,59 C e	00,00 C b	08,71 B d	24,68 A a
9	00,00 A e	00,00 A b	00,00 A g	02,12 A f
10	00,00 A e	00,00 A b	00,33 A fg	02,09 A f
CV (%)	**15,86**			

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 6 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização e polinização livre da Seleção 9.93. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Etapas do percurso	Polinizações	
	Autopolinização	Polinização livre
0	43,36 A b	21,52 B b
1	05,64 A c	06,90 A c
2	00,42 A d	03,37 A d
3	01,41 B d	07,95 A c
4	00,52 B d	06,61A c
5	00,21 A d	01,09 A e
6	00,00 A d	00,83 A e
7	47,65 A a	49,95 A a
8	00,79 A d	01,78 A e
9	00,00 A d	00,00 A e
10	00,00 A d	00,00 A e
CV (%)	**12,73**	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 7 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da polinização cruzada com 'Kieffer' para as Seleções 7.93 e 96.13.04 e cultivar Red Bartlett. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Genótipos						
Seleção 7.93		**Seleção 96.13.04**		**Red Bartlett**		
Polinizações						
Etapas do percurso	**Autopolinização**	**Polinização cruzada Kieffer**	**Autopolinização**	**Polinização cruzada Kieffer**	**Autopolinização**	**Polinização cruzada Kieffer**
0	45,86 A b	05,20 B de	46,37 A a	27,66 B a	44,02 A b	14,13 B b
1	02,18 A c	00,00 A f	00,84 B b	08,90 A bc	00,27 B de	14,09 A b
2	00,93 A c	01,20 A f	00,70 A b	01,13 A de	00,00 B e	02,56 A c
3	00,00 A c	01,20 A f	00,35 A b	00,47 A de	00,27 B de	13,29 A b
4	00,00 A c	03,20 A ef	00,57 A b	02,03 A de	02,35 A d	04,31 A c
5	00,00 A c	07,85 A d	00,64 A b	04,03 A cd	00,52 A e	00,69 A d
6	00,00 B c	29,94 A a	00,58 A b	01,34 A de	00,00 B e	04,34 A c
7	51,03 A a	26,66 B b	48,74 A a	40,04 A a	47,46 A a	40,93 B a
8	00,00 B c	12,80 A c	01,21 B b	14,33 A b	05,11 A c	04,68 A c
9	00,00 B c	05,63 A de	00,00 A b	00,07 A de	00,00 A e	00,98 A d
10	00,00 B c	06,32 A de	00,00 A b	00,00 A e	00,00 A e	00,00 A d
CV (%)	**23,78**		**46,27**		**17,55**	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 8 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da 'Shinseiki' e das polinizações cruzadas ('Shinseiki' x 'Abbé Fétel', 'Shinseiki' x 'Forelle' e 'Shinseiki' x 'Kieffer'). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

	Polinizações			
Etapas do percurso	**Autopolinização**	**Polinizações cruzadas**		
		Abbé Fétel	**Forelle**	**Kieffer**
0	36,97 A b	07,88 C c	11,85 B b	00,93 D d
1	00,00 A d	00,00 A d	00,62 A d	00,00 A d
2	00,39 A d	00,17 A d	00,00 A d	01,36 A d
3	00,00 A d	01,42 A d	00,00 A d	00,00 A d
4	03,39 BC d	15,94 A b	05,36 B c	01,98 C d
5	09,25 B c	16,42 B b	10,28 B b	12,75 B c
6	00,54 B d	03,71 B d	25,97 A a	26,57 A b
7	47,22 A a	43,50 A a	23,40 B a	23,90 B b
8	01,96 D d	10,71 C c	21,73 B a	30,73 A a
9	00,00 A d	00,00 A d	00,00 A d	00,89 A d
10	00,28 A d	00,25 A d	00,79 A d	00,89 A d
CV (%)		**30,96**		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 9 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização da 'Williams' e das polinizações cruzadas ('Williams' x 'Abate Fetel', 'Williams' x 'Carrick', 'Williams' x 'Forelle', 'Williams' x 'Packham's' e 'Williams' x 'Kieffer'). FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Etapas do percurso	Polinizações					
	Autopolinização	Polinização cruzada				
		Abbé Fétel	Carrick	Forelle	Packham's	Kieffer
0	23,32 B b	03,51 D d	36,85 A a	09,78 C bc	22,89 B ab	06,40 CD c
1	00,44 BC d	00,38 C ef	04,79 B b	01,56 BC d	05,87 A cd	01,58 BC de
2	00,15 AB e	00,00 B f	02,21 AB bcd	00,94 AB d	01,85 A e	00,45 AB e
3	06,56 A c	00,00 B f	01,01 B cd	05,93 A de	07,45 A c	03,77 A cd
4	02,21 B cd	01,41 BC de	01,01 C cd	11,79 A bc	02,85 BC de	01,30 BC de
5	04,61 B c	16,72 A c	01,45 C cd	15,69 A b	0777 B c	19,09 A ab
6	00,00 D e	26,79 A ab	00,97 D d	08,15 B c	01,49 C e	20,78 A ab
7	45,56 A a	19,64 CD bc	46,84 A a	15,68 D b	29,67 B a	27,97 BC a
8	17,08 B b	30,12 A a	03,66 C bc	29,73 A a	19,76 B b	15,20 B b
9	00,07 A e	00,07 A ef	00,97 A d	00,32 A e	00,20 A f	01,03 A de
10	00,00 C e	01,36 AB de	00,24 BC d	00,43 BC de	00,20 C f	02,43 A cde
CV (%)	30,71					

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na couna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 10 - Percentagem de tubos polínicos que atingiram as etapas do percurso estigma-ovário em função da autopolinização de *P. calleryana* e da polinização cruzada de *P. calleryana* X 'Abbé Fétel'. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

Polinizações		
Etapas do percurso	**Autopolinização**	**Polinização cruzada**
		Abbé Fétel 02
0	00,14 B d	10,76 A c
1	05,76 B c	22,52 A b
2	00,31 B d	06,03 A d
3	02,63 A d	03,66 A de
4	00,92 A d	02,73 A de
5	00,76 A d	02,49 A de
6	44,22 A a	01,79 B e
7	08,72 B c	45,22 A a
8	27,19 A b	02,94 B de
9	01,72 A d	01,00 A e
10	07,63 A c	00,86 B e
CV (%)	**25,82**	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Figura 1 - (A) Ramos protegidos com estruturas adaptadas em TNT para autopolinização. (B) Ramos designados para polinização aberta. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

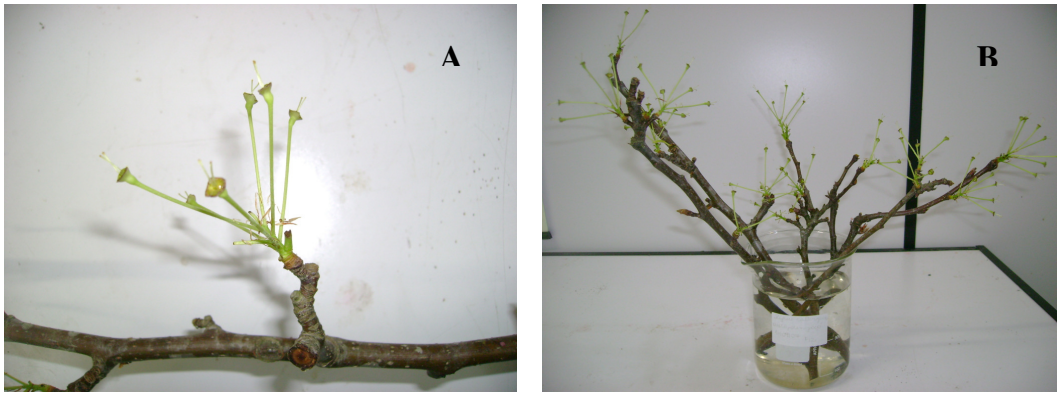

Figura 2 - (A) Pistilos emasculados para posterior polinização. (B) Becker contendo água para a conservação dos ramos com pistilos emasculados. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

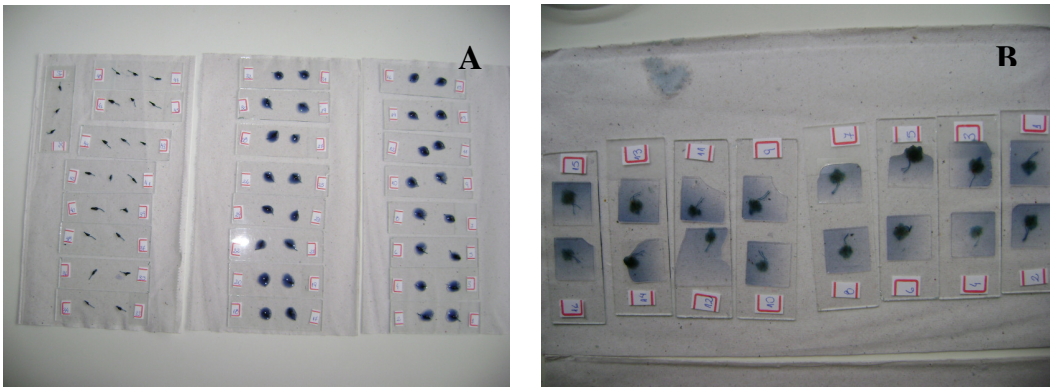

Figura 3 - (A) Pistilos e pistilos com gotas de corante diferencial Lacmóide. (B) Lâminas prontas para serem observadas em microscópio. UFPel/FAEM, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2007.

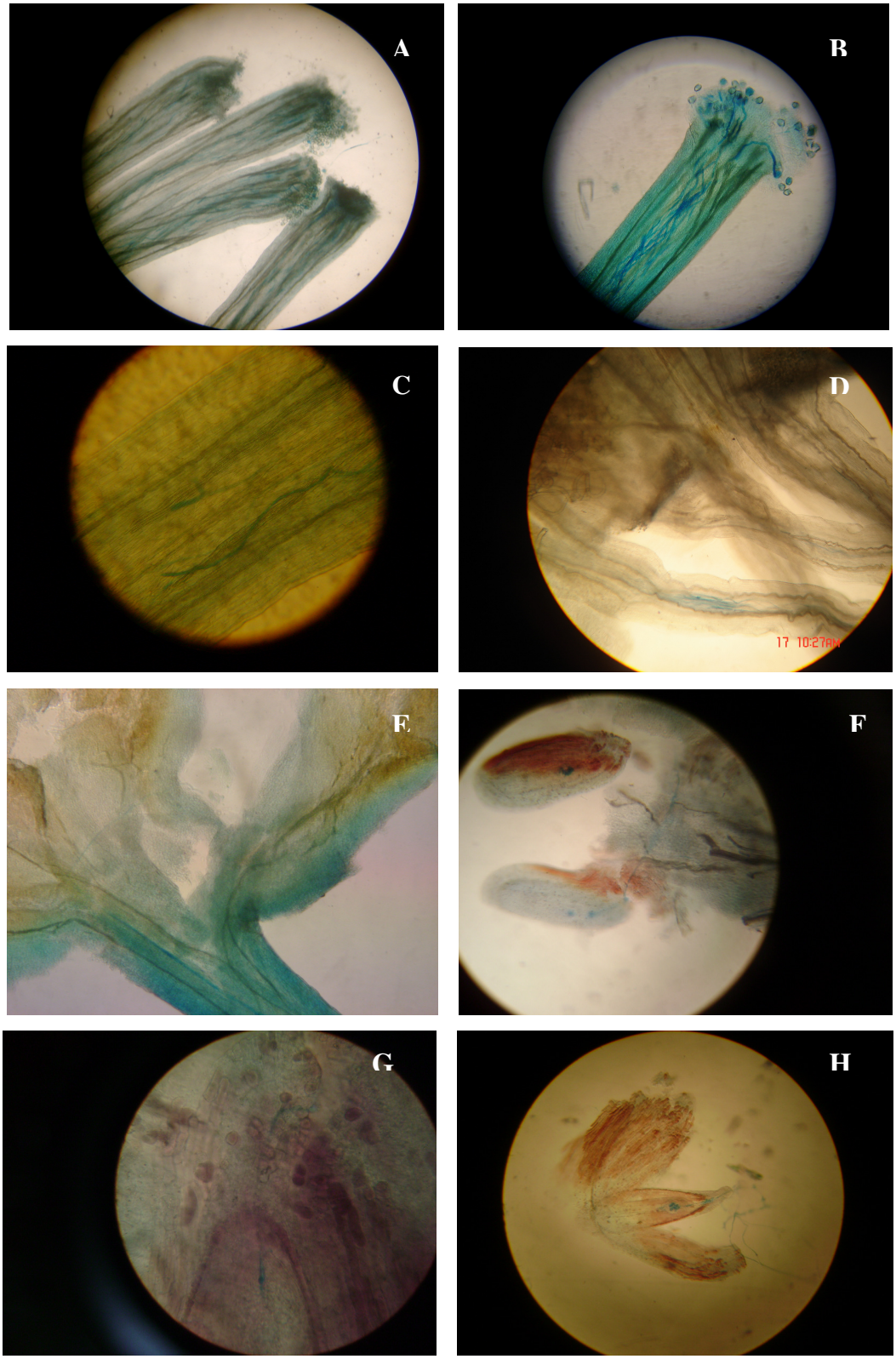

FIGURA 4 - (A, B e C) Germinação de grãos de pólen na superfície estigmática e no estilete. (D e E) Tubos polínicos atingindo o ovário. (F, G e H) Tubos polínicos atingindo os óvulos.

3 - CONCLUSÕES GERAIS

A percentagem de germinação *in vitro* dos grãos de pólen de pereira é dependente dos genótipos, das temperaturas e dos tempos de incubação.

A adição de nitrato de cálcio ao meio de cultura interfere negativamente na germinação dos grãos de pólen de pereira.

O ácido bórico em concentrações de até 100 mg L^{-1} parece melhor a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de genótipos de pereira.

No geral, a percentagem de fecundação dos cruzamentos realizados foi baixa. Fato que pode estar relacionado ao pouco tempo de interação entre grão de pólen-pistilo após a polinização, para que os tubos polínicos atingissem o ovário.

A maioria dos genótipos apresenta algum grau de incompatibilidade.

Nos cruzamentos realizados, o desenvolvimento dos tubos polínicos (50% deles) ocorre até a penetração do ovário. Na bibliografia, alguns autores consideram isso como fecundação realizada. Porém a penetração dos tubos polínicos nos óvulos foi nula ou quase que completamente nula para todos os genótipos e tipos de cruzamentos realizados.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

A contribuição da melissopanologia. Métodos de pesquisa – Laboratório de abelhas/USP. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>. Acesso em 25 de junho de 2006.

A EMBRAPA/COOPERAÇÃO INTERNACIONAL. **Especialistas japoneses avaliam projeto de pesquisa de pêra japonesa no RS e SC.** Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2001/junho/bn.2004-11-25.5191444773/>. Acesso em 2008.

ALLARD, R. W. Sistema de controle da polinização em plantas cultivadas. *In*: ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: USAID/Edgard Blücher, p.189-203. 1971.

ALVARENGA, L. R. de; FORTES, J. M. Cultivares de fruteiras de clima temperado **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.124, p.3-24, abr.1985.

BATLLE, I.; ALSTON, F.H.; EVANS, K.M. The use of the isoenzymic marker gene *Got1* in the recognition of incompatibility *S* alleles in apple. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v.90, p. 303-306, 1995.

BELL, R. L.; QUAMME, H. A.; LAYNE, R. E. C.; SKIRVIN, R. M. Pears. *In*: JANICK, J.; MOORE, J. N. **Fruit breeding, tree and tropical fruits**. West Lafayette: Purdue University Press, v.1, 441-514p, 1996.

BELLINI, E.; BINI, G. Fertility in Plum. **Rivista Della Ortoflorofrutticoltura Italiana**, v.62, n.6,p.403-422, 1987.

BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi, 1974. 264p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3ªed. Viçosa: UFV. 2001. 500p.

BREWBAKER, J. L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. The Journal of Heredity, v.8, p.271-277, 1957.

BROOKS, R. M.; OLMO, H. P. Register of new fruit & nut varieties. 2.ed. Berkeley: University of California, 1972.

BROOTHAERTS, W.; JANSSENS, G. A.; PROOST, P. and BROEKAERT, W. F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. **Plant Molecular Biology**, v.27, 499-511, 1995.

BURKHART, D. **Tipos de pie utilizados em noroeste de EEUU.** General Roca. Argentina, INTA, 1991. n.p. Trab. apres. no Curso Internacional de peras.

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; et al.**Variedades de Pêra para o Estado de São Paulo.**Campinas:IAC, 1996. 34p. (Boletim técnico, 164).

CARVALHO, T. C. P.; RASEIRA, M. D. B. Aspectos relacionados à polinização e autocompatibilidade em amexeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.). **Horti Sul**, Pelotas, v.1, n.2, p.29-32, 1990.

CERTAL, A.C.; SANCHEZ, A.M.; KOKKO, H.; BROOTHAERTS, W.; OLIVEIRA, M.M.; FEIJÓ, J.A. S-Rnases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. **Sexual Plant Reprodution**, Heidelberg, v.12, p.94-98, 1999.

CHAGAS, E. A.; PIO, R., BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; MENDONÇA, V.; SIGNORINI, G.; SCHIAVINATO, Y. O. Ajuste da concentração de ágar e sacarose para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina. *In:* CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais...** Lavras. 2006b.

CHAGAS, E. A; PIO, R. BARBOSA. W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; FRACAROLLI, B. B. C.; MENDONÇA, V.; ONO, T. K. Efeito da adição de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação *in vitro* de polens de nectarineira. *In:* CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Anais...** Lavras. 2006a. CD-ROM.

CHANDLER, C. A Method for Staining Pollen-Tubes within the Pistil. **Stain Technology**, v.2, n.1, p.25-26, 1931.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M. Pear. *In:* **Biotechnology of perennial Fruit Crops**. F. A. Hammerschlang and R. E. Litz. Ed., 1992. 550p. (Biotechnology in agriculture**,** 8).

CHILDERS, N. F. Cultivo del peral y del membrillero. *In:* CHILDERS, N. F. **Fruticultura Moderna**. ed. Hemisferio Sur, Madrid, 1986, p. 330-363.

CORBET, S. A; WILLIAMS, I. H.; OSBORNE, J. L. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. **Bee World**, v.72, n.2, p.47-59. 1991.

CRANE, M. B.; LEWIS, D. Genetical studies in pears. II. A classification of cultivated varieties. **J. Pomol**., v.18, 52-60, 1940.

EGEA, J.; BURGOS, L. Detecting cross-incompatibility of there north american apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. **Journal American Society Horticultural Scince**, Mount Vernon, v.121, n.6, p.1002-1005, 1996.

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

EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Normas técnicas para a pêra**. (EMPASC/ACARESC. Sistema de Produção, 10). Florianópolis, 1988, 28p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. de. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária. 1995. 178p.

FAO. **Faostat Database**. **Prodstat**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 5 fev. 2007.

FAORO, I. D. Morfologia e fisiologia. *In*: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa,** Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. p.67-94.

FLANKLIN, F.H.C.; LAWRENCE, M.J.; FLANKLIN-TONG, V.E. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Review of Cytology**, v.158, p.1-62, 1995.

FREITAS, B. M. A polinização do cajueiro. *In:* SOUZA, D.C.; PEREIRA, F. de M.; ALCOFORADO FILHO, F.G.; BATISTA, M. das G. de S. (Orgs.) *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11. **Anais…** 1996a. p.143-156.

FREITAS, B.M. Changes with time in the germinability of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains found on different body areas of its pollinator bees. **Revista Brasileira de Biologia,** v.5, n.2, p.289-294, 1997.

FREITAS, B.M. Pasto apícola: Volume, concentração e açúcar total do néctar secretado por flores de distintos materiais genéticos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L**.).** *In:* REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA XXXIII. **Anais...** v. 2, p. 395-397, 1996b.

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**, 13ed. São Paulo: NOBEL. 2007. 446p.

HARDER, L. D.; THOMSON, J. D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. **American Naturalist**. v.133, p.323-344. 1989.

HEDRICK U.P., HOWE G.H., TAYLOR O.M., FRANCIS, E.M., TUKEY H.B.,1921. **The pears of New-York**. Ann. Rpt. NY Dept Agri., v.2, part 2. 1921.

HIRATSUKA, S.; TOMITA, A. Incompatible pollen tube growth and protein composition in styles of Japanese pear following high temperature treatments. **Euphytica**, Springer Netherlands, v.43, n.3, p.191-196, 1989.

HORTICULTURAL EDUCATION ASSOCIATION FRUIT COMMITTEE. London. The pollination of fruits crops. **Scientific Horticulture**, v.15, p.126-50, 1961.

KAJIURA, I. Nashi. (*Japanese pear*). *In*: KONISHI, K.; IWAHORI, S.; KITAGAWA, H.; YAKUWA, T. (Eds.) **Horticulture in Japan**. Tokyo: Asakura, 1994, p.40-47.

KEARS, C. A.; INOUYE, D. **Techiniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993. 579p.

KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (eds). **Pollinating bees: the conservation link between Agriculture and Nature.** Brasília, DF: Ministry of Environment, 2002. 313p.

LARSEN, K. Incompatibility, pseudo-compatibility and preferential fertilization in *Beta vulgaris* L. *In*:MULCAHY, D. L.; OTTAVIANO, E. **Pollen: biology and implications for plant breeding**. Elsevier, New York, 1983, p.205-210.

LAYNE, R. E. C.; QUAMME, H. A. **Pears. Advances in Fruit Breeding**. Edited by Jules Janick and James N. Moore. Purdue University Press – West Lafayette, Indiana. 1975. 623p.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. De. Polinização. In: **Frutas do Brasil-46, Pêra: Produção**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.23-28.

LEITE, D. **Micropropagação de pereira** (*Pyrus* ssp.*)* **cultivar Carrick**. 78p.1992. Dissertação Mestrado – Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substrato, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OHxF97**. 1995. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) – FAEM, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

LEITE, G. B. **Evolution des etats des bougeons et de leur heterogeneite le long du rameau d´un an de pecher sous differents regimes de temperatures apres l´installation de l´endodormance**. 2004. 168f. Tese (Doutorado) - Univesité Blaise Pascal, Montpellier.

LEITE, G. B.; DENARDI, F. Porta-enxertos para pereira: adaptação e algumas condições ambientais. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.5, n.2, 47-49p, 1992.

LEWIS, D.; MODLIBOWSKA, I. Genetical studies in pears IV. Pollen-tube growth and incompatibility. **Journal of Genetics.** v.43, p.211-222, 1942.

LOMBARD, P. B. Principales cultivares y nuevas variedades de peras en USA. **Revista de Fruticultura**, v.5, n.5, p.241-256, 1990.

LOMBARD, P. B.; WILLIAMS, R. Artificial supplementary pollination trials on apples and pears in Britain. Oreg. **Hort. Soc. Proc**., v. 64, p.43-46. 1972.

LORETI, F.; GIL, G. Portainjertos para el peral: situacion actual y perspectivas**. Revista Fruticola**, n. 2, v. 15, p. 45, 1994.

LORETI, F.; MASSAI, R. Il contributo dell'Università di Pisa almiglioramento genético dei portinnesti. **Frutticoltura,** Bologna,n. 4, p.9-13, 1998.

MAIA, L. M.; AMARO, A. A.; GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. Produção e mercado de pêra e pêssego no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.26, n.2, p.33-41, 1996.

MARANGONI, B.; MALAGUTI, D. I portinnesti del pero. **L'Informatori Agrario**. Verona, v.51, p.26-29, 2002. Supl.1.

MATTON, D. P.; MAES, O.; LAUBLIN, G.; XIKE, Q.; BERTRAND, C.; MORSE, D.; CAPPADOCIA, M. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. **Plant Cell,** v.9, n.10, p.1757-1766. 1997**.**

MODLIBOWSKA, I. Pollen tube growth and embryo-sac development in apple and pears. **Journal Pomology and Horticultural Science**, 1945, v.21, p.59-89.

MORETTINI, A.; BALDINI, E.; SCARAMUZZI, F.; MITTEMPERGHER, L. Monografia delle principali cultivar di pero. Firenze: Consiglio Nazionale delle Ricerche - Centro Miglioramento Piante da Frutto.1967.412p.

Nakasu, B. H. EMBRAPA/CPACT, Pelotas/RS. 2008. Informação Verbal.

NAKASU, B. H. Introdução. *In:* Nakasu, B. H.; Quezada, A. C.; Herter, F.G. **Pêra. Produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Brasilia: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.9.

NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Pirus 9 - seleção de pereira para o Sul do Brasil. **Horti Sul**, Pelotas, v.2, n.3, p.19-20, 1992.

NAKASU, B.H.; FAORO, I. D. Cultivares. *In*: Nakasu, B. H.; Quezada, A. C.; Herter, F.G. **Pêra. Produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Brasilia: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.29-36.

NEVES, T.S.; MACHADO, G.M.E.; OLIVEIRA, R.P. Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.2,1997.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F.de; RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D.; RIBEIRO, V. G. Efeito do Cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'**.** *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba, **Anais…** Curitiba: SBF, 2000, p.419.

OLIVEIRA, E. L.; BARBOSA, W.; MAIA, M. L. Análise dos mercados brasileiro e mundial de pêra. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Resumos...** (cd room).

ONORATI, I. A.; TACCHINI, E. M. L. W. Autopolinización en cultivares de *Pyrus communis* L. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina, Biologia y Producción Vegetal, 1969, v.1, Série 2, n° 21.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R. et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Belgium, v.125, n.2, p.155-161, 2002.

PASQUAL, M.; LOPES, P. A.; PINTO, J. E. B. P.; CHALFUN, N. N. J. **Infuência de diversos fatores sobre a multiplicação do porta-enxerto de pereira** *pyrus calleryana* **Du.** "in vitro" **Ciência Prát**., v.14, n.1, P.28-34, 1990.

Pyrus communis L. ROSACEAE - PEAR, Cite as: USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1198259>. Acesso em janeiro de 2008.

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H. Classificação botânica, origem e evolução *In*: **Frutas do Brasil-46,** Pêra: Produção. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.20-22.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 35p.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1996. p.131-146.

RED BARTLETT. Disponível em: <http://www.redagraria.com/investigacion/fca_unc/tecno_frutas/Peras/Red_Bartlett.html >. Acesso em 2008.
REHDER, A. **Manual of cultivated trees and shrubs**. 2nd ed. New York: Macmillan, 1967.

RIBEIRO, P. A.; BRIGHENTI, E.; BERNARDI, J. **Comportamento de algumas cultivares de pereira** *Pyrus communis* **L. e suas características nas condições do Planalto Catarinense.** Florianópolis: EMPASC, 1991. 53p. (Boletim Técnico, 56).

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. London : Chapman & Hall, 1997. 529p.

SALAYA, G.F.G. **Fruticultura:** el potencial productivo. 2. ed. México: ALFAOMEGA, Ediciones Universidad Católica de Chile, 1999. 342 p.

SAWAZAKI, H. E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C. A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores rapd. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2. Aug. 2002.

SAX, K. The origin and relationships of the Pomoideae. J. **Arnold Arbor**., v.12, p.3-22, 1931.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. *In:* JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit brecding.** New York: John; Sons, 1995. p.325-440.

SILVA, M. M. da. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro (***Passiflora edulis* **f. flavicarpa Deg.)** 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1971. 530p.

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba, São Paulo : FEAJQ,1998. 760p.

SIMONETTO, P. R.; GRELLMANN, E. Pereira : porta-enxerto e algumas cultivares. **IPAGRO Informa**, Porto Alegre, 1988, n.37, p.5-10.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.56, p.227-230, 1950.

VASILAKAKIS, M.; PORLINGS, I. C. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. **HortiScience**, Alexandria, v.8, n.4, p.733-735, aug. 1985.

VITI, R.; MONTELEONE, P.; GUERRIERO, R. Incompatibility in apricot *Prunus armeniaca* L.): methodological considerations. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.72, n.6, p.961-970. 1997.

WESTWOOD, M. N**. Fruticultura de zonas templadas**. Madri: Mundi Prensa, 1982. 438p.

WESTWOOD, M. N. **Temperate-e Pomology**. São Francisco: w. h. Freeman and Co, 1978. 428p.

WHILLIAM, R. R., MAIER, M. Pseudo-compatibility after-pollination of the Cox's Orange Pippim. **The Journal of Horticultural Science,** Ashford, n.52, p.475-483. 1977.

WILLIAMS, R. R. The effect of summer nitrogen application on the quality of apple blossom. **Journal of Horticultural Science**, n.40, p. 31-41. 1965.

WORSLEY, R. G. F. The processing of pollen. **Silvae Genetica**. Frankfurt, 1959, v.8, n.5, p.143-148.

WREGE, M. S.; HERTER, F. G.; CAMELATTO, D.; STEINMETZ, S.; JÚNIOR, C. R.; GARRASTAZU, M. C.; FLORES, C. A.; IUCHI, T.; BERNARDI, J.; VERÍSSIMO, V.; MATZENAUER, R. **Zoneamento agroclimático para pereira no Rio Grande do Sul.** Documentos 182, ISSN 1806-9193. Pelotas, RS, dezembro, 2006, 32p.

ZIELINSKY, Q. B.; THOMPSON, M. M. Speciation in Pyrus: chromosome number and meiotic behaviour. **Botanical Gazette**, Chicago, v.128, p. 109-112, 1967.

ZISOVICH, A.; STERN, R.; SHAFIR, S. Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, n.79, p.101-106, 2004.

ZUCCHERLLI, S.; TASSINARI, P.; BROOTHAERTS, W. TARTARINI, S; DONDINI, L.; SANSAVINI, S. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). **Sexual Plant Reproduction**. n.15, p.153-158, 2002.