

INCOMPATIBILIDADE PÓLEN/PISTILO EM VARIEDADES

DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

A.M. CORDEIRO⁽¹⁾, P.C.S. MARTINS⁽¹⁾, M. MENDES ROSA⁽¹⁾, F.MOURO⁽¹⁾,

R.BOTELHO⁽¹⁾ e A.RAMOS⁽²⁾

⁽¹⁾Estação Nacional de Melhoramento de Plantas – Departamento de Olivicultura.

Apartado 6, 7350-951 Elvas

⁽²⁾Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Q^{ta}. Senhora de Mércules,

Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco

RESUMO

A incompatibilidade intraespecífica em oliveira é geralmente aceite como a incapacidade do pólen germinar sobre o próprio estigma ou do crescimento do tubo polínico poder ser detido no seu percurso até ao ovário. Neste trabalho experimental pretendeu-se verificar a compatibilidade do pólen através do acompanhamento da germinação *in vivo* dos grãos de pólen colhidos de ramos frutíferos em autopolinização e em polinização livre das variedades ‘Cobrançosa’, ‘Conserva de Elvas’ e ‘Picual’ cultivadas em sequeiro na região de Elvas nos anos de 2002 e 2003.

A aderência de grãos de pólen foi menor em autopolinização, particularmente ao 2º dia após a ântese e as diferenças foram maiores em 2002. Nesse ano foi também maior a diferença de tubos polínicos em crescimento presentes nos dois sistemas de polinização. Os mecanismos de incompatibilidade verificaram-se em todas as variedades, mas em menor expressão na ‘Picual’. Na ‘Conserva de Elvas’ um reduzido número de grãos de pólen e de tubos polínicos em crescimento foram observados tanto em autopolinização como em polinização livre.

SUMMARY

Intra specific incompatibility in olive-tree is generally accepted as the inability of the pollen to germinate over its own stigma or as the pollen tube germination being stopped before reaching the ovary. In this experimental work, *in vivo* germination of the pollen collected from fruiting shoots in self-pollination *versus* free-pollination was studied in three non-irrigated olive-tree varieties ('Cobrançosa', 'Conserva de Elvas' and 'Picual') at the years of 2002 and 2003.

The adherence of the pollen was less in self-pollination, particularly at the 2nd day after anthesis, and differences were greater in 2002. In that year, pollen tube growth was also greater in both pollination systems. Incompatibility mechanisms were observed in all varieties, although weaker at 'Picual'. In 'Conserva de Elvas' the pollen adherence and the pollen tube growth were reduced in both self- and free-pollination systems.

1- INTRODUÇÃO

Na oliveira a incapacidade do pólen fecundar as flores de uma mesma variedade (autoincompatibilidade) ou de outras variedades (interincompatibilidade) é determinada pela presença de uma série alélica no genoma haplóide do pólen que controla o desenvolvimento do tubo polínico no pistilo. O sistema de incompatibilidade é gametofítico, caracterizado pela germinação do grão de pólen e posterior interrupção do crescimento do tubo polínico antes de alcançar o óvulo. Na oliveira, as interações entre o tubo polínico e o estilete representam um importante ponto de controlo da fecundação, ou seja, uma selecção gamética, pela qual uns gametas são preteridos em relação a outros (Rapoport, 1997).

A oliveira é uma espécie parcialmente auto-incompatível e a resposta é condicionada pelas condições climáticas. As temperaturas elevadas no período de floração podem afectar a receptividade do estigma, a longevidade do óvulo e o crescimento do tubo

polínico (Griggs et al., 1975; Cuevas et al., 1995). As temperaturas máximas e médias registadas no período de Fevereiro a Maio verificou-se condicionarem a data e a duração da floração, nomeadamente um somatório das temperaturas máximas elevado correspondeu a uma antecipação da época de floração (Cordeiro & Martins, 2002). Na variedade ‘Manzanilla de Sevilla’ registaram-se diferentes respostas de incompatibilidade em anos diferentes, tendo sido atribuídas a um efeito das temperaturas elevadas durante o período de floração (Griggs et al., 1975). Recentemente Cuevas (1992) concluiu pela inexistência de um efeito directo das altas temperaturas mas apenas um efeito indirecto, pela influência na qualidade da flor.

São vários os sintomas de autoincompatibilidade na oliveira. Cuevas (1992) e Cuevas et al. (1995) observaram diferenças na aderência de grãos de pólen e na capacidade dos tubos polínicos em penetrar no estigma mas não encontraram diferenças na velocidade de crescimento de tubos polínicos após ultrapassarem o chamado “local de selecção”. Griggs et al. (1975) e Cuevas (1992) observaram pistilos com tubos polínicos inchados, com bifurcações ou enrolados. A observação directa *in vivo* é o método mais utilizado para o estudo da interacção pólen/pistilo e baseia-se na coloração da calose por certos corantes emitindo luz fluorescente quando é iluminada por radiações no espectro da luz azul ou do ultravioleta. Esta calose, de acordo com Barroso (1990) é um polissacarídeo constituído, principalmente, por glucopirranose. De acordo com o mesmo autor, uma maior acumulação de calose em tubos polínicos incompatíveis poderá dever-se à sua menor utilização na formação das paredes dos tubos polínicos. Pelo contrário, em oliveira Cuevas (1992) observou menor acumulação de calose nos tubos polínicos incompatíveis.

Neste trabalho experimental pretendeu-se estudar a compatibilidade do pólen/pistilo em três variedades de oliveira ‘Cobrançosa’, ‘Conserva de Elvas’ e ‘Picual’ com o objectivo de ampliar o conhecimento sobre a polinização e o vingamento da azeitona.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho experimental foi realizado em árvores adultas das variedades ‘Cobrançosa’, ‘Conserva de Elvas’ e ‘Picual’ cultivadas em condições de sequeiro na Herdade do Reguengo, em Elvas nos anos de 2002 e 2003. Foram seleccionadas quatro árvores em safra de cada variedade e em cada uma delas marcaram-se quatro ramos frutíferos para a polinização livre e quatro ramos frutíferos para a autopolinização garantida através da utilização de sacos de papel cristal ceroso. Procurou-se que a selecção dos ramos fosse representativa dos quatro quadrantes da árvore.

Após o início do estado fenológico F (abertura das primeiras flores) (Colbrant e Fabr e, 1972), no primeiro dia nos ramos marcados excluíram-se todas as flores, deixando os botões florais e simultaneamente os ramos marcados para a autopoliniza o foram posteriormente ensacados. No dia seguinte em todos os ramos removeram-se manualmente os botões florais e excluíram-se as flores. Em cada data de colheita recolheram-se 10 pistilos em cada modalidade que foram rapidamente transportados para o laboratório em tubos etiquetados onde se juntou uma soluço fixadora composta por formalina, ácido acético glacial e etanol 70% (FAE) numa propor o de 1:2:17. Os pistilos permaneceram mergulhados no fixador até   sua observa o ao microscópio. A prepara o das amostras consistiu na elimina o do fixador, amolecimento dos pistilos, e colora o das amostras, de acordo com o procedimento proposto por Cuevas (1992).

As observa es foram realizadas num microscópio Olympus BX-41, equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100W, filtros de excita o selectiva de banda larga no violeta

($\lambda=330 - 385$ nm) e uma ampliação de 10x10 e 10x20. As fotografias foram obtidas através de uma câmara digital Olympus DP-11.

3- RESULTADOS E DISCUSÃO

A metodologia utilizada neste trabalho experimental permitiu a observação de grãos de pólen no estigma, a sua germinação e o desenvolvimento dos tubos polínicos no estilete. Nas fotos obtidas (A, B, C, D, E, F), os grãos de pólen e os tubos polínicos apresentam uma fluorescência branco-esverdeada.

A aderência de grãos de pólen ao estigma é uma etapa importante no processo de polinização/vingamento da azeitona já que, como refere Cuevas (1992), um maior número de grãos de pólen aderentes ao estigma aumentará a probabilidade de fecundação. Em 2002, no 2º dia após a ântese, a aderência de grãos de pólen em autopolinização (Quadro I) foi reduzida na ‘Conserva de Elvas’ e na ‘Picual’ e média na ‘Cobrançosa’. Ao 4º e 6º dias verificou-se um aumento de grãos aderentes, mas apenas na ‘Picual’ se registou uma presença elevada. Posteriormente, ao 8º dia após a ântese havia uma menor quantidade de grãos aderentes e uma diminuição na intensidade de fluorescência em consequência da senescência dos grãos de pólen em todas as variedades. Nesse ano a aderência de pólen em polinização livre foi elevada em

Quadro I: Caracterização da aderência de grãos de pólen ao estigma de flores de oliveira em variedades em autopolinização / polinização livre, no ano 2002.

VARIETADE	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
Cobrançosa	++ / +++	++ / +++	++ / +++	+ / ++
Conserva	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Picual	+ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / ++

Legenda: + presença reduzida de grãos de pólen; ++ presença média de grãos de pólen; +++ presença elevada de grãos de pólen.

‘Cobrançosa’ e ‘Picual’ e reduzida em ‘Conserva de Elvas’ desde o 2º dia após a ântese. Em 2003, a aderência de pólen em autopolinização (Quadro II), ao contrário do verificado no ano anterior, foi reduzida na ‘Cobrançosa’ e na ‘Conserva de Elvas’ e

elevada na ‘Picual’, logo ao 2º dia após a ântese. Em polinização livre a aderência de pólen em 2003 (Quadro II) foi sempre elevada na ‘Cobrançosa’ e na ‘Picual’ e média na ‘Conserva de Elvas’.

Quadro II: Caracterização da aderência de grãos de pólen ao estigma de flores de oliveira em variedades em autopolinização / polinização livre e no ano 2003.

VARIETADE	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
Cobrançosa	+ / +++	++ / +++	++ / +++	+ / ++
Conserva	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / +
Picual	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / ++

Legenda: + presença reduzida de grãos de pólen; ++ presença média de grãos de pólen; +++ presença elevada de grãos de pólen.

Um atraso na receptividade do estigma tem sido encontrado em diferentes variedades de oliveira quando se comparam os dois sistemas de polinização e está associado com os mecanismos incompatibilidade (Cuevas, 1992; Cuevas et al., 1995). Nas variedades em estudo houve uma menor adesão em autopolinização, particularmente no 2º dia após a ântese, exceção feita a ‘Conserva de Elvas’ em 2002 (reduzida em ambas as modalidades) e a ‘Picual’ em 2003 (sempre elevada).

Para que ocorra a fecundação, a célula vegetativa do grão de pólen germina e forma o tubo polínico que atravessa o estilete transportando os gâmetas masculinos até ao ovário (fotos E, F). Na autopolinização, comparativamente à polinização livre, o crescimento do tubo polínico iniciou-se mais tardiamente. No ano de 2002 (Quadro III) a presença de tubos polínicos em crescimento era nula na ‘Conserva de Elvas’ e na ‘Picual’ e

Quadro III: Caracterização dos tubos polínicos em crescimento no pistilo de flores de oliveira de variedades em autopolinização / polinização livre e no ano 2002.

VARIETADE	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
Cobrançosa	+ / +	+ / ++	++ / ++	++ / ++
Conserva	- / +	+ / +	+ / +	+ / +
Picual	- / +++	++ / +++	+++ / +++	+++ / +++

Legenda: - ausência de tubos polínicos; + presença reduzida de tubos polínicos; ++ presença média tubos polínicos; +++ presença elevada de tubos polínicos.

reduzida na ‘Cobrançosa’ ao 2º dia após a ântese. Nos dias posteriores registou-se um acentuado aumento de tubos polínicos em crescimento, principalmente na ‘Picual’. Em 2003 (Quadro IV), ao contrário do ano anterior, já se observavam, ao 2º dia após a ântese alguns tubos polínicos em crescimento em todas as variedades. Em polinização livre observaram-se nos dois anos tubos polínicos em crescimento logo no 2º dia após a ântese e com maior incidência na ‘Picual’. As variedades não apresentaram igual quantidade de tubos polínicos em crescimento no estilete: ‘Conserva de Elvas’ registou

Quadro IV: Caracterização dos tubos polínicos em crescimento no pistilo de flores de oliveira de variedades em autopolinização / polinização livre e no ano 2003.

VARIETADE	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
Cobrançosa	+ / ++	++ / ++	++ / +++	++ / +++
Conserva	+ / +	+ / +	+ / ++	+ / ++
Picual	+ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++

Legenda: - ausência de tubos polínicos; + presença reduzida de tubos polínicos; ++ presença média tubos polínicos; +++ presença elevada de tubos polínicos.

o menor número; ‘Cobrançosa’ um número intermédio e ‘Picual’ o maior número de tubos polínicos. A acumulação de calose e a sua observação ao longo dos tubos polínicos é, hoje em dia, uma técnica muito utilizada em estudos de biologia floral Barroso (1990). Neste trabalho experimental observou-se, nos tubos polínicos em polinização livre, uma mancha de calose fina e regular, sem qualquer tipo de alargamento na extremidade e com uma coloração mais intensa. Em autopolinização como também referiu Cuevas (1992), os tubos polínicos mostraram-se menos fluorescentes, tortuosos e com reduzido número de tampões de calose. De acordo com o anterior autor, considera-se que os tampões de calose nos tubos polínicos estão associados à mudança da condição autotrófica para heterotrófica, condição em que obtêm nutrientes a partir do pistilo.

As maiores diferenças entre os dois sistemas de polinização (aderência de grãos de pólen e tubos polínicos em crescimento) foram registadas em 2002, indicando que, tal

como referiram Griggs et al. (1975), a incompatibilidade gametofítica esteve condicionada por factores climáticos. Recentemente, confirmou-se que as temperaturas máximas e médias no período de Fevereiro a Maio têm influência na época de floração da oliveira em Elvas (Cordeiro & Martins, 2002).

Apreciaram-se diferenças entre as variedades. A variedade ‘Cobrançosa’ registou uma quantidade de tubos polínicos média a elevada, com uma trajectória tortuosa e fluorescência débil em muitos casos. Esta observação é referida por Rapoport (1997), como um processo de selecção gamética, pelo qual uns gâmetas são preteridos a outros na fecundação. A variedade ‘Picual’ apresentou uma maior quantidade de tubos em crescimento, com trajectórias maioritariamente rectilíneas e com maior fluorescência, permitindo uma observação nítida dos tampões de calose. A variedade ‘Conserva de Elvas’ apresentou uma pequena diferença entre os dois sistemas de polinização, com presença reduzida de grãos de pólen e de tubos polínicos, na sua maioria, muito finos, com uma fluorescência débil e as suas extremidades apresentaram uma acumulação de calose. Este comportamento observado na ‘Conserva de Elvas’ não parece estar associada a uma reacção de incompatibilidade, mas a um atraso na receptividade do estigma. Estas observações poderão justificar, parcialmente, o baixo vingamento e a elevada alternância que normalmente se verifica em olivais desta variedade que, apesar do elevado interesse económico na indústria da conserva da azeitona em verde, tem sido abandonada pelo olivicultor devido a irregularidade nas produções.

4 – CONCLUSÕES

Neste trabalho experimental as maiores diferenças entre autopolinização e polinização livre ocorreram ao 2º dia após a ântese, verificando-se um atraso na aderência de grãos de pólen e no início do crescimento do tubo polínico e a ocorrência de tubos polínicos

com trajectórias em geral tortuosas, que são mecanismos favorecedores da heterozigocidade.

As variedades incluídas neste trabalho experimental comportaram-se como parcialmente autocompatíveis, tendo 'Picual' um maior grau de autocompatibilidade que a 'Cobrançosa'. A 'Conserva de Elvas' apresentou um elevado grau de autocompatibilidade.

5 – BIBLIOGRAFIA

BARROSO, J.M.M., 1990. Estudo da biologia floral numa população regional de ameixeiras "Rainha Cláudia" (*Prunus domestica*). Dissertação apresentada à Universidade de Évora para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias. Évora.

COLBRANT, P. & FABRÉ, P. 1972. States repères de l'olivier. Document du Service de la Protection des Végétaux de Marseille. Marseille.

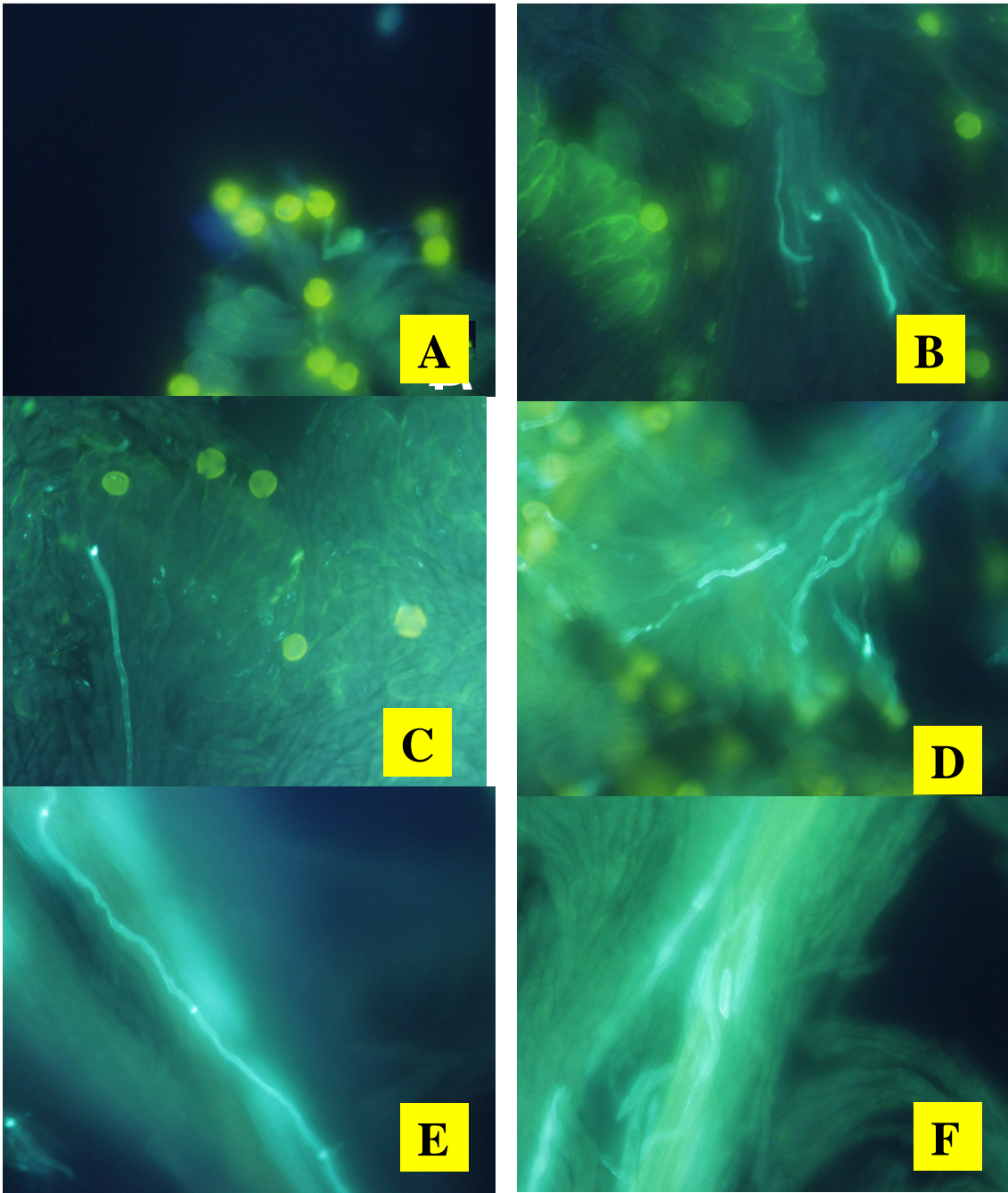
CORDEIRO, A. & MARTINS, P., 2002. Épocas de floração de variedades de oliveira na região de Elvas. *Melhoramento*, 38:205-214.

CUEVAS, J., 1992. Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y fructificación de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

CUEVAS, J.; RAPOPORT, H.F. & RALLO, L., 1995. Relationships among reproductive processes and fruited abscission in 'Arbequina' olive. *Advances in Horticultural Science*, 2:92-96.

GRIGGS, W.H.; HARTMANN, H.T.; BRADELY, M.V.; IWAKIRI, B.T. & WHISLER, J.E., 1975. Olive pollination in California. *Calif. Agricultural Experimental Station Bulletin*. 869, p-15.

RAPOPORT, H.F., 1999. Botánica y morfología. In BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L., coord.- El Cultivo del Olivo. 3ª Ed. Rev. e Ampl.. Madrid. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi-Prensa, Cap 2, p.35-60.



Fotos - Aspectos da germinação “*in vivo*” de pólen de oliveira. Estigmas mostrando grãos de pólen (A, B,C, D); germinação (A,C) e crescimento de tubos polínicos ao longo do estilete (D, E, F) (ampliação 10x20).