

# BRAGANTIA

*Boletim Técnico do Instituto Agrônomico do Estado de São Paulo*

Vol. 21

Campinas, janeiro de 1962

N.º 8

## MACROSPOROGENESE, FORMAÇÃO DO SACO EMBRIONÁRIO, DESENVOLVIMENTO DO ENDOSPERMA E DO EMBRIÃO EM UMA FORMA TETRAPLÓIDE DE MELANCIA (*CITRULLUS VULGARIS* SHRAD)<sup>1</sup>

DIXIER M. MEDINA, *engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomico*

### RESUMO

Na melancia tetraplóide da variedade Keckley Sweet, observa-se ainda em estádios iniciais do desenvolvimento, uma diferenciação no tamanho dos óvulos, diferenciação essa que se acentua cada vez mais.

Nos óvulos maiores, a macrosporogênese ocorre antes da abertura da flor. Quando isso se verifica, quase todos os sacos embrionários estão completos e a fertilização se dá entre 24 e 48 horas após a abertura. As primeiras divisões da célula-ovo aparecem do 7.º dia em diante, quando o endosperma já apresenta 6 a 16 núcleos.

Observou-se a formação do haustório do endosperma de forma tubular, cujo desenvolvimento é máximo cerca de 10 dias após a abertura, ocasião em que o embrião ainda se apresenta globular. Em óvulos de 13 e 14 dias o haustório se mostra atrofiado, o embrião é cordiforme e o endosperma bastante desenvolvido. Aos 20 e 22 dias de idade, as sementes completam seu desenvolvimento, encontrando-se, de dentro para fora: o embrião tomando todo o espaço correspondente ao endosperma e ao nucelo; o nucelo, reduzido a uma película fina e transparente; finalmente, o tegumento externo, duro e bastante espesso.

Uma correlação entre o desenvolvimento do saco embrionário e o crescimento do nucelo pôde ser estabelecida.

Nesta variedade de melancia, constatou-se grande eliminação de óvulos durante o processo de desenvolvimento do fruto: parte antes da fertilização, parte naqueles que foram fertilizados. Essa eliminação se traduz num atraso cada vez mais acentuado no desenvolvimento das diversas partes da semente, produzindo no fruto maduro uma série de sementes "abortadas" e "chôchas". Somente uma pequena fração dos óvulos se transforma em sementes normais e, em consequência, esta forma tetraplóide apresenta poucas sementes.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 3 de janeiro de 1962.

## 1 — INTRODUÇÃO

No decorrer das investigações sôbre obtenção de melancia sem sementes, levadas a efeito na Seção de Citologia, vários estudos citológicos foram efetuados, alguns dos quais incluídos em trabalho anteriormente publicado (6) sôbre a poliploidia artificial em melancia (*Citrullus vulgaris* Shrad).

Uma forma tetraplóide ( $2n=44$ ) da variedade Keckley Sweet foi obtida artificialmente, tratando o presente trabalho das observações nela realizadas sôbre a macrosporogênese e a formação e desenvolvimento do saco embrionário, do endosperma e do embrião.

## 2 — MATERIAL E MÉTODO

Ovários de diversas idades foram coletados de pequenos campos de cultura instalados especialmente para essa finalidade.

Coletou-se uma pequena parte do material em dezembro de 1958, em "Carnoy" (álcool absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1); as flôres masculinas e femininas foram protegidas na véspera da abertura; efetuou-se a polinização quando as flôres se abriram e colheram-se os ovários 6, 24, 30 e 48 horas e 3, 5, 10 e 20 dias após a polinização.

Uma segunda série de ovários foi coletada em dezembro de 1959, em "Craf" (ácido crômico, ácido acético e formalina), provenientes de flôres livremente polinizadas; neste caso a idade dos ovários foi relacionada com a abertura até 8 dias após, a intervalos de um dia, e ovários mais velhos com 13, 14 e 22 dias. Os resultados das observações, porém, são apresentados em conjunto, quer se trate do material cuja polinização foi controlada, quer não.

A fim de garantir uma boa fixação, os ovários foram, na hora da fixação, subdivididos em porções menores e submetidos a vácuo. Seguiu-se depois a desidratação através da série de álcool butílico e a inclusão em parafina. Do interior dos ovários mais velhos os óvulos foram extraídos, tendo sido desidratados e incluídos livres dos tecidos envolventes. Efetuaram-se os cortes à espessura de 12 microns nos ovários mais jovens e a 15 a 20 nos mais velhos, quando só os óvulos foram seccionados.

A coloração das lâminas foi feita pela hematoxilina de Heidenhain. Quando se utilizou material coletado em Carnoy para a obtenção de cortes seriados em lâminas permanentes, foi êle primeiramente refixado em "Craf", para depois receber a coloração pela hematoxilina.

O endosperma, o haustório e o embrião em desenvolvimento, também foram examinados sob a forma de "whole mounts", de acordo com a sugestão encontrada nos trabalhos de Chopra (1, 2, 3). Para isso, dos óvulos mais desenvolvidos, cujo tamanho permitisse, fixados em Carnoy e conservados em álcool 70%, extraía-se sob a lupa e com auxílio de agulhas muito finas, o nucelo, que envolvia o endosperma. Colocado o material sobre uma lâmina, prosseguia-se a dissecação, eliminando-se todo o nucelo; sobre o endosperma colocava-se uma gôta de carmim acético e depois de alguns minutos cobria-se com uma lamínula.

Fizeram-se os desenhos das diversas fases da macrosporogênese e desenvolvimento do saco embrionário com o auxílio de câmara clara, enquanto os do endosperma e do embrião em "whole mounts" dos óvulos mais desenvolvidos, foram feitos com um aparelho de projeção adaptado ao microscópio.

Finalmente as microfotografias foram tiradas com o Fotomicroscópio Zeiss, tendo-se utilizado o dispositivo automático e filme Adox F. 17. Para reprodução, os aumentos foram convenientemente modificados e acompanham as figuras apresentadas.

### 3 — OBSERVAÇÕES

Em botão fechado, cerca de dois dias antes da abertura da flor, já se pode observar a célula-mãe do macrósporo, distinguindo-se das outras pelo seu maior tamanho, na parte central do nucelo. As observações que se seguem, são de botões assim jovens.

O nucelo constitui uma protuberância da placenta formada por uma massa de células parenquimatosas (fig. 1-A), contornada lateralmente por dois tegumentos: o interno, diretamente sobre o nucelo, é delgado, formado por duas a três camadas de células retangulares; o externo é muito mais espesso, formado de células poliédricas envolvendo lateralmente o interno (fig. 1-B). A micrópila ainda não está formada, de modo que a extremidade livre do nucelo está diretamente em contacto com a epiderme da parede interna do ovário.

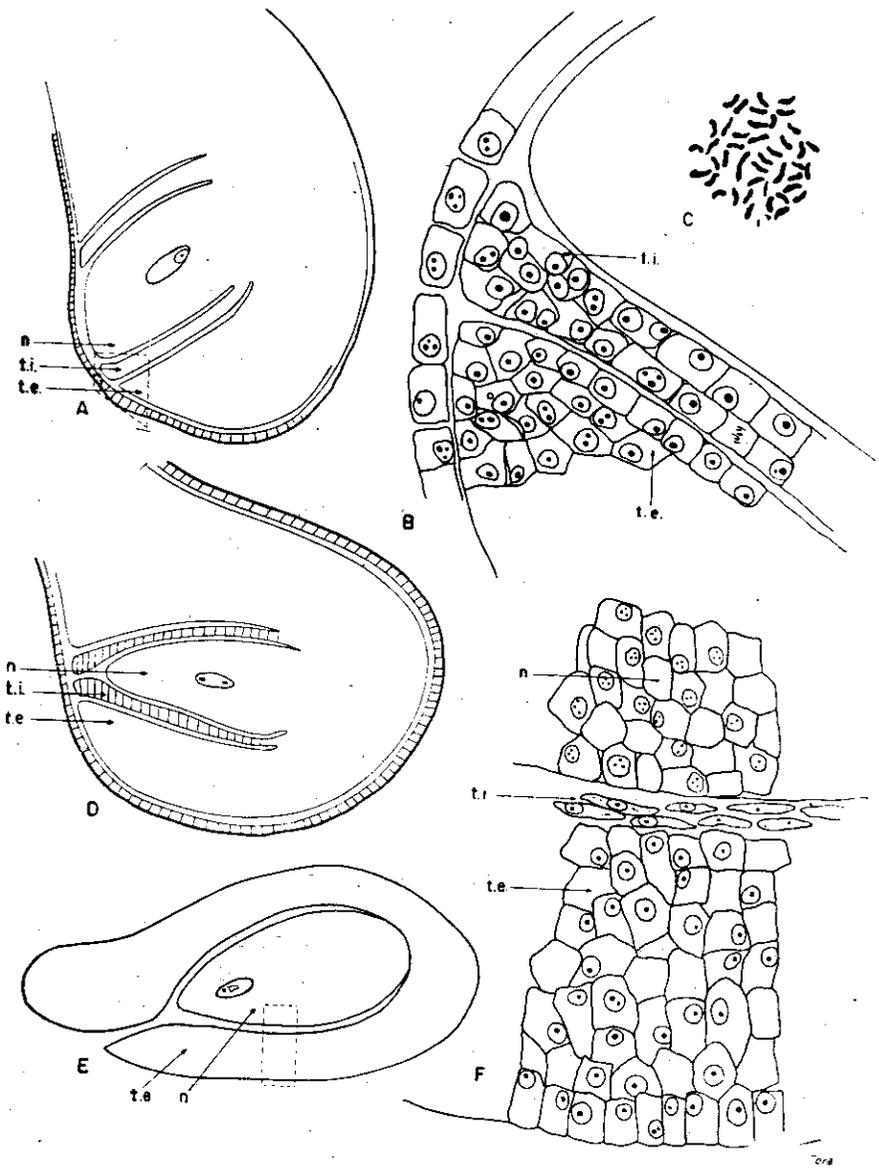


FIGURA 1. — Melancia tetraplóide. *A*, *D* e *E* — Aspectos no desenvolvimento do óvulo com saco embrionário com macrósporo funcional, dois núcleos e fertilizado, respectivamente *A*  $\times$  132, *D*  $\times$  89 e *E*  $\times$  55. *B* e *F* — Detalhes das regiões marcadas, respectivamente, em *A* e *E*. *B*  $\times$  580. *F*  $\times$  400. *C*. Metáfase em célula do nucelo mostrando  $2n=44$  cromossomos.  $\times$  1.825. *n*=nucelo; *t.i* = tegumento interno; *t.e* = tegumento externo

A célula mãe do macrósporo caracteriza-se também pela forma alongada e pelo grande tamanho do núcleo e do nucléolo; além disso sua membrana celular é muito fina. Na figura 2-A tem-se uma célula-mãe do macrósporo em prófase, podendo-se apreciar os cromossomos em paquitene; em metáfase da primeira divisão meiótica, os cromossomos se arranjam no centro da célula (fig. 2-B), na qual a membrana nuclear desaparece; um pouco mais avançado é o estado apresentado na figura 2-C em que os cromossomos anafásicos podem ser observados; finalmente completa-se a divisão com a formação de duas células achatadas na face em que se tocam (fig. 2-D). A figura 2-E mostra um estado ainda mais avançado em que os núcleos de cada célula-filha já se dividiram uma segunda vez. Ao se completar a meiose encontram-se quatro células (fig. 2-F), uma das quais, a calazal, é de forma ovalada, com o citoplasma concentrado na parte central e dois grandes vacúolos, um em cada extremidade. As outras três, embora apresentem os núcleos ainda visíveis, já mostram deformações indicando o início da sua degenerescência.

O macrósporo funcional cresce, passando em seguida por uma divisão para formar um saco embrionário de dois núcleos, os quais se localizam na extremidade da célula, deixando no centro um grande vacúolo (fig. 2-G). Ao mesmo tempo, os demais macrósporos degeneram completamente.

Nesse espaço de tempo os tegumentos mostram sensível desenvolvimento, projetando-se além da extremidade livre do núcleo; a micropila é formada apenas pelo tegumento interno; o núcleo adquire uma forma oval cuja extremidade mais fina é a micropilar e sua posição torna-se relativamente mais interna que nas fases anteriores (fig. 1-D).

Na véspera da abertura, os óvulos podiam ser classificados em grandes e pequenos; posteriormente os óvulos de tamanho médio puderam constituir uma terceira classe. A fim de facilitar a seqüência das diversas fases serão relatadas, primeiramente, as observações realizadas nos óvulos classificados como grandes.

Assim é, pois, que no material da véspera da abertura da flor, a maior parte dos óvulos grandes já completou a meiose, sendo que em muitos deles vê-se o saco embrionário de dois núcleos (quadro 1). O progresso é rápido, pois que, no dia da abertura, mais de 50% dos óvulos (20 em 35) mostraram sacos embrionários completos. As sucessivas divisões de que resultam sacos embrionários com 4 e 8 nú-

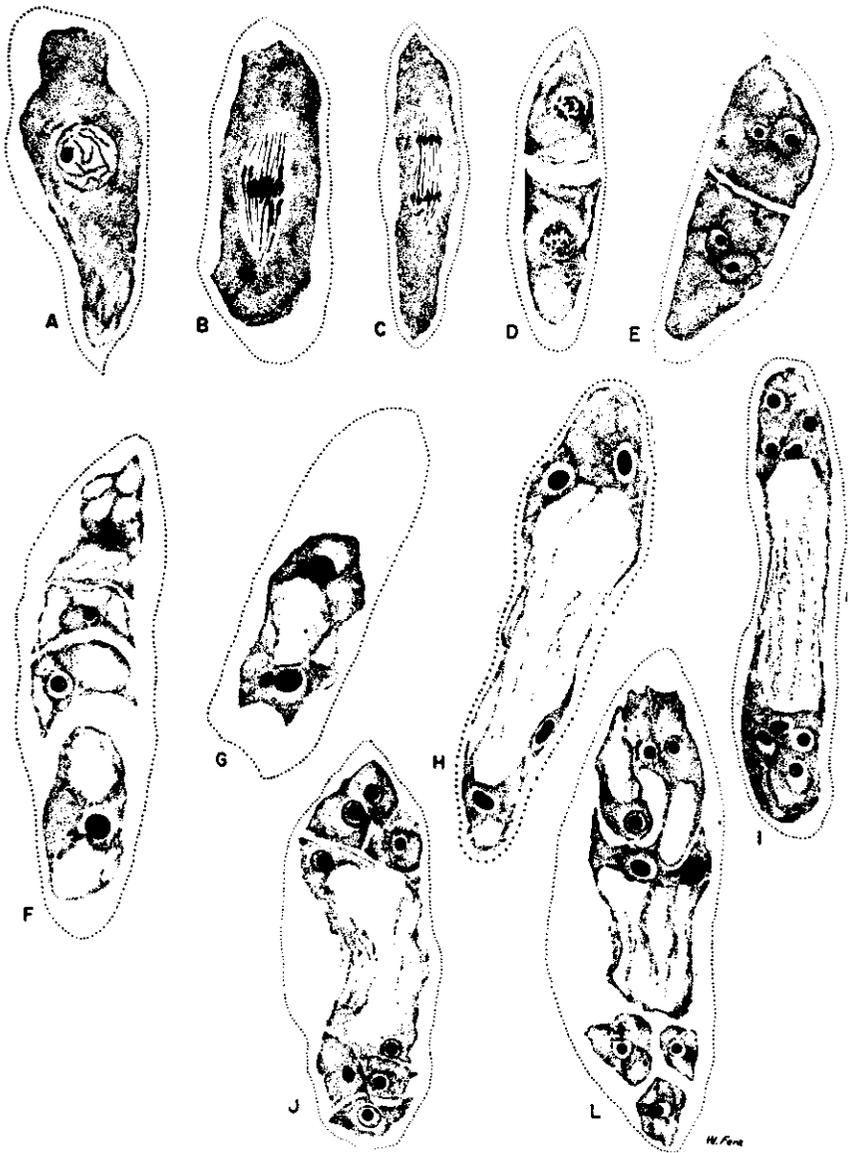


FIGURA 2. — Melancia tetraplóide. A a F — Fases da macrosporogênese mostrando desde paquitene até a formação dos quatro macrósporos.  $\times 950$ . G a L — Saco embrionário com dois, quatro, oito núcleos e completo. J — Saco embrionário incompletamente diferenciado com sete células e os núcleos polares ainda distantes. G a H  $\times 950$ ; I a L  $\times 860$ .

cleos são acompanhadas por um crescimento dos mesmos, o que pode ser observado comparando-se as figuras 2-H a J. Nesses estados de desenvolvimento, o contorno dos núcleos nem sempre é visível, pelo menos através do processo de coloração usado, sendo os núcleos identificados, muitas vezes, pelos seus grandes nucléolos. Observou-se, em alguns casos, os nucléolos micropilares bem maiores que os calazais (fig. 2-H).

Em um saco embrionário completo (fig. 2-L) nota-se o seguinte: duas sinérgidas bastante desenvolvidas, apresentando um grande vacúolo que se estende quase até o centro do saco embrionário; uma oosfera de forma ovalada, tendo a parte mais larga próxima aos núcleos polares; seu citoplasma se concentra nesta parte e tem a forma de crescente; apresenta também um grande vacúolo, voltando para a micrópila; dois núcleos polares, de grande nucléolo, situados na parte central do saco embrionário próximo à oosfera e à base das sinérgidas; o citoplasma desta célula central se prolonga lateralmente, como que envolvendo parte do conjunto micropilar; mostra, também, um vacúolo calazal que se prolonga até as antípodas. Finalmente vêem-se três antípodas, muito pouco desenvolvidas, poliédricas, situadas na região calazal.

No dia seguinte à abertura da flor, a maioria dos óvulos examinados apresentava saco embrionário completo; a presença do tubo polínico, porém, só foi notada em um deles (fig. 6-C). Dois dias após a abertura, todos os sacos embrionários estavam completos e uma parte já apresentava o endosperma em desenvolvimento (quadro 1).

À medida que se processam a formação e o desenvolvimento do saco embrionário, o tegumento interno vai se reduzindo em espessura; em geral, quando o saco embrionário está completo ou o desenvolvimento do endosperma, apenas se iniciando, o tegumento interno mostra-se em degenerescência, sendo representado por uma a duas camadas de células alongadas de citoplasma mal diferenciado e que se colore intensamente pela hematoxilina (fig. 1-F). Dessa forma, a micrópila passa a ser constituída apenas pelo tegumento externo (fig. 1-E). Este fato foi observado por Singh (8) em diversas espécies de cucurbitáceas, variando apenas a época em que tal degenerescência ocorre. No caso presente, restos do tegumento interno puderam ser observados mesmo em óvulos de 10 dias de idade, ocasião em que eles se apresentam bem mais desenvolvidos.

A fusão dos núcleos polares deve se dar quase ao mesmo tempo que a fertilização, pois raramente se pôde observar núcleos polares fundidos em saco embrionário não fertilizado; pelo contrário, foi muito comum observá-los ainda separados, se bem que próximos, e o tubo polínico presente no saco embrionário. Na figura 3-A observam-se os gametas masculinos, um próximo ao núcleo da oosfera e outro entre os dois núcleos polares.

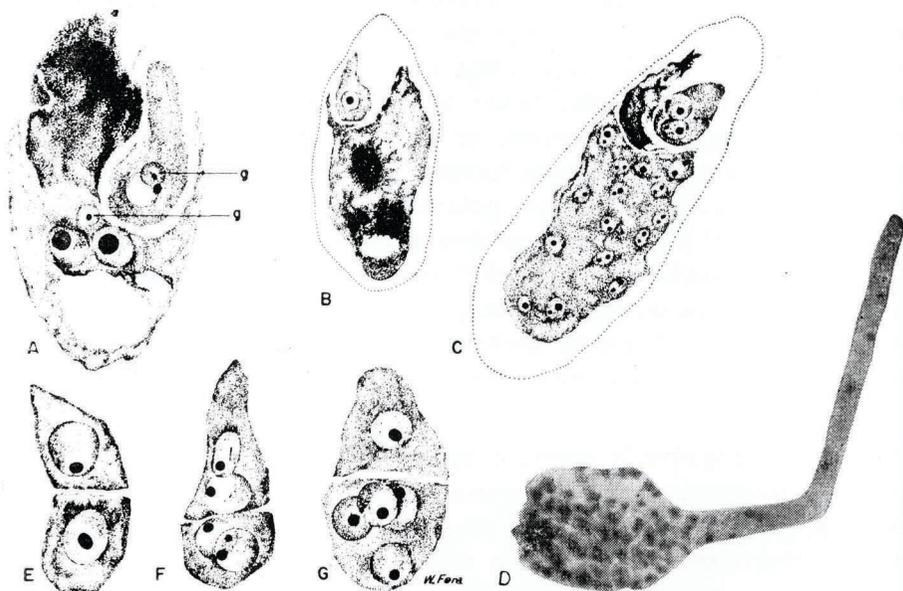


FIGURA 3. — Melancia tetraplóide. *A* — Saco embrionário sendo fertilizado: gametas masculinos indicados pelas flechas.  $\times 950$ . *B* — Saco embrionário fertilizado: célula-óvo mais endosperma com três núcleos.  $\times 445$ . *C* — Célula-óvo com dois núcleos e endosperma com cêrca de 15 núcleos.  $\times 445$ . *D*. Microfotografia de endosperma mostrando o haustório calazal  $\times 36$ . *E* a *G* — Primeiras divisões na célula-óvo.  $\times 950$ .

Os vestígios do tubo polínico podem permanecer até que o endosperma tenha atingido certo desenvolvimento e a célula-óvo esteja prestes a se dividir (fig. 3-C).

Logo após a fertilização, o endosperma se multiplica com grande rapidez; é do tipo nuclear e assim permanece por muito tempo, o citoplasma concentra-se ao redor dos núcleos que apresentam dois ou mais nucléolos. O endosperma se alarga na região superior, que apresenta uma concavidade voltada para a micrópila e ao mesmo tempo se alonga em direção à calaza (fig. 3-B e C).

Em estados mais adiantados do desenvolvimento, verifica-se que êsse alongamento continua só na região mediana da parte inferior do endosperma (fig. 3-D) e toma o aspecto de um tubo com vários núcleos distribuídos ao longo do seu comprimento e que constitui o haustório. Trata-se de uma estrutura muito comum na família das Cucurbitáceas, tendo sido já constatada em *Citrullus vulgaris* por Chopra (1, 2, 3) e em *Cucumis melo* var. *pubescens* Will por Sing (9). É difícil examinar o haustório em todo seu comprimento através de cortes seriados: êle é melhor observado em "whole mounts" de endosperma e embrião, extraídos do interior das sementes pela dissecação destas sob a lupa (fig. 4-A a D).

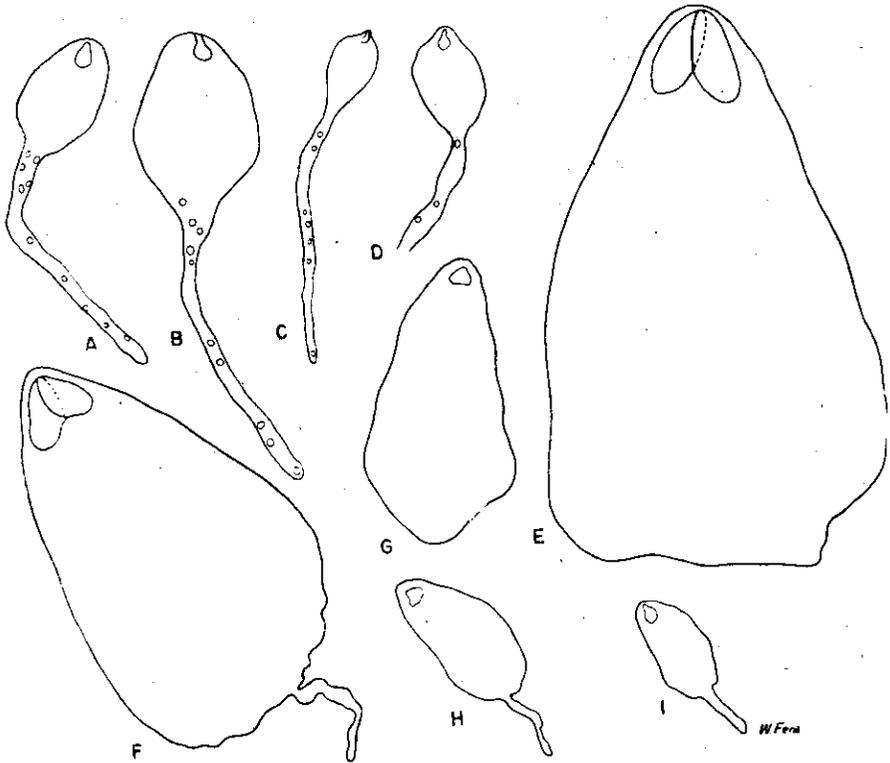


FIGURA 4. — Melancia tetraplóide. A a D — Endospermas com os respectivos embriões encontrados em dissecação de óvulos de 10 dias (após a abertura da flor), mostrando o haustório calazal em seu máximo desenvolvimento.  $\times 45$ . E a I. Idem em óvulos de 14 dias, mostrando o haustório atrofiado.  $\times 22,5$ .

Depois de fertilizada, a oosfera conserva sua forma característica, piriforme, o vacúolo desaparece, o citoplasma é bem mais denso que o do endosperma (fig. 3-B) e o núcleo apresenta, às vezes, além de um nucléolo grande, mais um ou dois menores.

Embora se tenha observado uma divisão da célula-ôvo aos dois dias após a abertura da flor, é a partir do sexto dia, aproximadamente, que ocorrem as suas primeiras divisões. As figuras 3-C a G mostram fases sucessivas do início do desenvolvimento do embrião, quando o endosperma se apresentava com 6 a 16 núcleos em ovários de sete a oito dias.

A primeira divisão da célula-ôvo produz duas células desiguais (fig. 3-B), a basal, de seção triangular, e a apical, que se assemelha a uma calota esférica, com a face arredondada voltada para o endosperma. A primeira divisão na célula apical, de acordo com a figura 3-F, é longitudinal.

No material de 10 dias de idade, o exame dos cortes seriados revelou a existência de óvulos degenerados e de óvulos fertilizados. Aquêles são muito pequenos e apresentam, invariavelmente, o saco embrionário não fertilizado e degenerado; êstes, embora de tamanho variado, são maiores e contêm endosperma e embrião em desen-

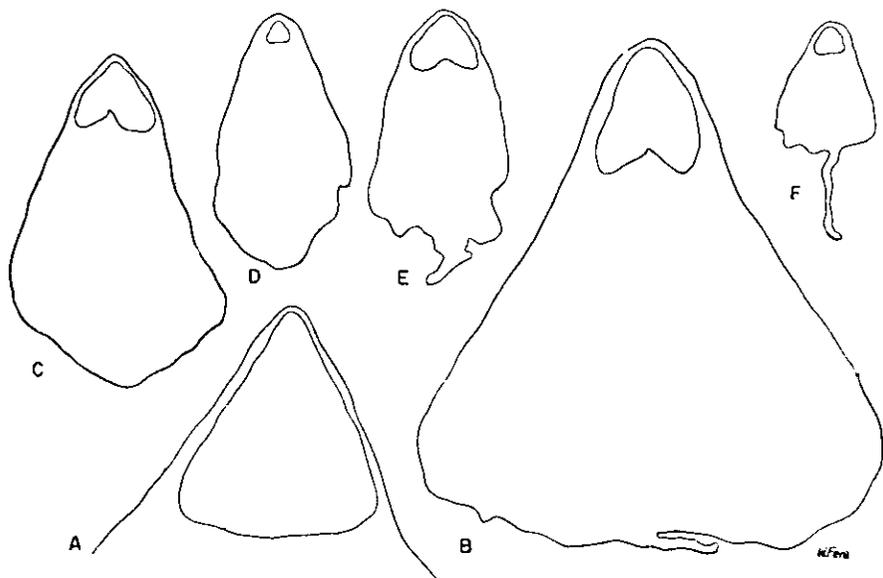


FIGURA 5. — Melancia tetraplóide. A a F — Endospermas e embriões encontrados em óvulos de 22 dias, constituindo a série de sementes abortadas.  $\times 22,5$ .

volvimento. O embrião se apresenta ainda de forma globular com 10-20 células em grande atividade e o endosperma é oval, ainda coenocítico, às vezes iniciando a se transformar em celular. Em um caso constatou-se que todos os núcleos do endosperma se apresentavam no mesmo estado, isto é, em início de prófase, perfeitamente individualizados os cromossomos, podendo-se ver, de alguns dêles, o centrômero; todos os núcleos mostravam dois nucléolos, um grande e um pequeno.

O haustório está bem desenvolvido, sendo impossível, neste material, observá-lo ao longo de todo o comprimento. Em alguns pôde-se ver sua extremidade arredondada, na qual se situam dois ou três de seus núcleos; nessa região de contacto do haustório com o nucelo, as células dêste se apresentam esgotadas, sem citoplasma (fig. 6-A), formando uma concavidade na qual se encaixa a extremidade do haustório. Situação semelhante foi observada por Chopra em *Citrus fistulosus* (3) e anteriormente por Kirkwood em *C. citrullus* (5) e por Johri and Chhaya, em *C. colocynthis* (4).

Pôde-se observar, também, que o tegumento interno ainda não desapareceu completamente e que o mesmo está reduzido a uma só camada de células em adiantado estado de degenerescência.

Aos 13 e 14 dias, o endosperma mostra-se enormemente aumentado, e no embrião iniciam a se diferenciar os cotilédones, fazendo com que o embrião se apresente cordiforme. O haustório, por sua vez, é menor que no material mais nôvo e aparentemente atrofiado; em alguns dos óvulos, possivelmente nos mais adiantados, observou-se que o endosperma não apresentava um limite uniforme na região calazal, mas sim muito desigual, e que o haustório havia desaparecido (fig. 6-B). À medida que o processo de desenvolvimento avança, nota-se que as células da parte central do endosperma crescem muito e se tornam bem maiores que as periféricas e só estas últimas se apresentam em atividade. As células do endosperma que contornam o embrião também não mostram qualquer indício de divisão nuclear; são achatadas e seu aspecto é antes de degenerescência. As células do nucelo se apresentam cada vez mais inexpressivas, de núcleos deformados, à medida que se situam mais próximas ao embrião; as da região micropilar estão completamente vazias de citoplasma, de paredes amareladas (nos cortes coloridos pela hematoxilina) e comprimidas umas pelas outras (fig. 6-B).

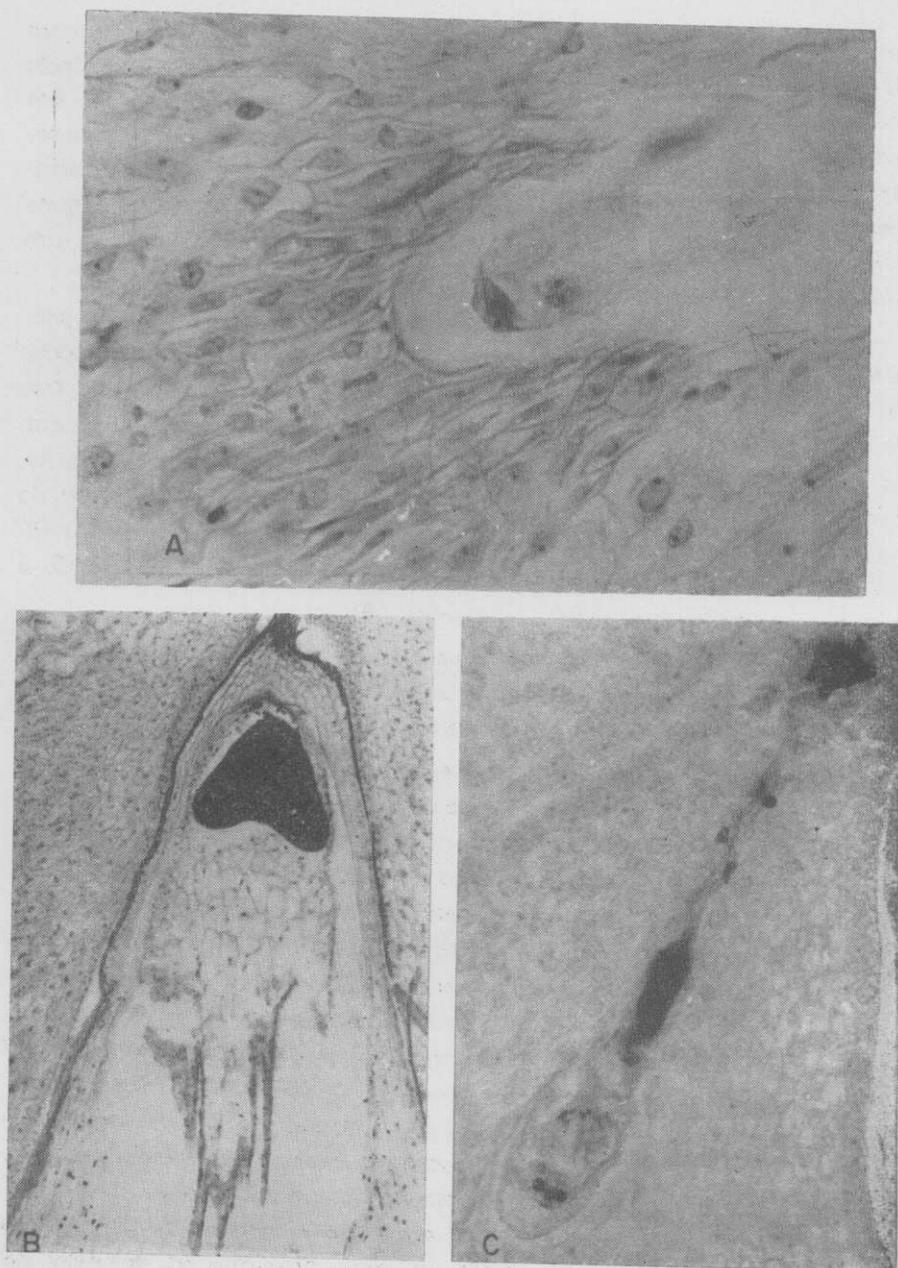


FIGURA 6. — Melancia tetraplóide. *A* — Aspecto da extremidade do haustório e da concavidade do nucelo ("nucellar pocket") encontrado em óvulo de 10 dias de idade.  $\times 375$ . *C* — Saco embrionário sendo fertilizado, um dia após a abertura da flor. Aspecto dos vestígios da penetração do tubo polínico.  $\times 375$ . *B* — Embrião em desenvolvimento, cordiforme, no interior do endosperma que está sendo por ele consumido; óvulo de 14 dias de idade.  $\times 63$ .

Dêse ponto em diante, o embrião vai se desenvolvendo rapidamente e consumindo o endosperma. Em ovários de 20 dias de idade, as sementes já estão perfeitamente formadas, encontrando-se o seguinte: um embrião com os cotilédones completamente desenvolvidos ocupando todo o espaço correspondente ao nucelo; êste se reduz, então, a uma película transparente, muito delgada, envolvendo o embrião; a seguir encontra-se o envoltório da semente, que se formou a partir do tegumento externo, de várias camadas de células bem diferenciadas e que lhe dá considerável espessura e resistência.

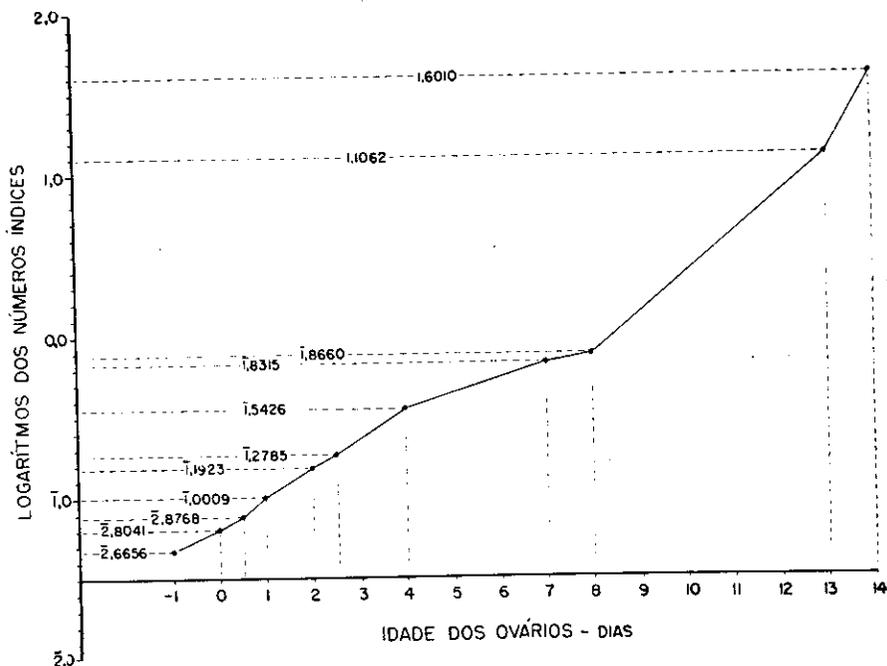


FIGURA 7. — Melancia tetraplóide. Representação gráfica da correlação entre o crescimento do nucelo e a idade do ovário. Em ordenados os números-índices dos volumes (V. texto) e em abscissas as idades dos ovários.

#### 4 — CORRELAÇÃO ENTRE DESENVOLVIMENTO DO SACO EMBRIONÁRIO E CRESCIMENTO DO ÓVULO

O estudo do desenvolvimento do saco embrionário e os estados iniciais do endosperma e do embrião foram observados em todos os óvulos, à medida que êstes iam surgindo nos cortes seriados. Desde que se notou, a partir de um certo ponto, aliás, bem cedo, uma dife-



renciação no seu tamanho, as observações foram grupadas em três classes, referentes a óvulos pequenos, médios e grandes. Os resultados podem ser apreciados no quadro 1.

Nos óvulos pequenos (quadro 1) pôde-se observar que a formação e o desenvolvimento do saco embrionário se processam lentamente: no dia da abertura da flor e no dia seguinte, uma parte dos sacos embrionários examinados (cêrca de metade), tinha apenas completado a meiose e apenas alguns, os mais adiantados, mostravam o macrósporo funcional. Só aos três dias após a abertura é que foram vistos sacos embrionários de 8 núcleos e completos, embora em pequena proporção. Daí por diante, até os 8 dias, não se notou mais progresso algum, encontrando-se apenas sacos embrionários em degenerescência.

O mesmo não acontece com óvulos de tamanho médio (quadro 1). Neste caso já existem sacos embrionários com oito núcleos no dia seguinte à abertura da flor e completos aos dois dias de idade. Embora, no material examinado, não tenha sido possível verificar a presença do tubo polínico, deduz-se que a fertilização ocorreu em alguns dêles, pois aos três dias foram encontrados sacos embrionários mostrando um endosperma em desenvolvimento e a célula-ôvo. Grande parte dêles, porém, estava em degenerescência.

Finalmente, nos óvulos "grandes" (quadro 1), o saco embrionário está completo no mesmo dia da abertura da flor; evidência de tubo polínico foi notada com grande freqüência aos dois dias; com essa idade, porém, boa porcentagem dos sacos embrionários apresentava endosperma em desenvolvimento e célula-ôvo; só a partir do sétimo dia é que se viu embrião em desenvolvimento.

Comparando-se as três classes de óvulos, vê-se, claramente, que os óvulos pequenos constituem uma classe diferente das outras duas, em que a formação e o desenvolvimento do saco embrionário se processam com tal atraso, que não permitem a fertilização, dando como resultado sacos embrionários em degenerescência.

Quanto às outras duas classes, observa-se que, entre os óvulos médios, há um atraso no desenvolvimento do saco embrionário quando comparados com os "grandes" e alta porcentagem de degenerescência. Ao mesmo tempo nota-se que entre os "grandes" há uma elevada proporção de óvulos que se apresentam com endosperma em desenvolvimento, mais célula-ôvo.

As diferenças patentes encontradas quanto ao estado de desenvolvimento do saco embrionário entre as três classes de óvulos, não devem ser interpretadas como efeito, mas sim como causa. Desde muito cedo os atrasos no desenvolvimento, as irregularidades que normalmente ocorrem, a falta de fertilização etc., é que devem ser apontados como motivo para a queda do ritmo do crescimento dos óvulos e mesmo pela cessação desse crescimento.

A separação em classes de tamanho serviu para mostrar, claramente, a correlação entre a marcha dos fenômenos que ocorrem dentro do saco embrionário e o crescimento do óvulo.

É interessante, constatar, por exemplo, que nos óvulos pequenos não se encontrou um único caso de saco embrionário fertilizado; êles estariam, assim, menores que o normal, justamente pelo atraso do desenvolvimento do saco embrionário, atraso tal que não permitiu a maturação com tempo de receber a fertilização. Óvulos de tamanho médio, que foram encontrados com endosperma e célula-ôvo, devem ser encarados como óvulos normais na ocasião da fertilização, que depois se atrasaram no desenvolvimento.

Se fizermos abstração da correlação entre desenvolvimento do saco embrionário e crescimento do óvulo, podemos reunir tôdas as observações realizadas tanto em óvulos grandes como médios e pequenos. É o que se faz no quadro 2 que, dessa forma, representa a totalidade das observações. Analisando tal quadro, verifica-se que, desde antes da abertura das flôres, há uma grande variabilidade no estado de desenvolvimento do saco embrionário.

A correlação entre o desenvolvimento do saco embrionário, do endosperma e do embrião e o crescimento do óvulo pôde ser aferida. Para isso, procurou-se medir os óvulos correspondentes às sucessivas transformações do saco embrionário, desde o macrósporo funcional, até o endosperma e o embrião, selecionando lâminas unicamente de óvulos classificados como grandes, desde a véspera até 14 dias após a abertura.

Devido à própria conformação do óvulo nos estágios iniciais de desenvolvimento, os tegumentos, especialmente o externo, variam de espessura nas diferentes regiões e as medições se tornam difíceis. Decidiu-se, por isso, tomar apenas duas medidas: o comprimento e a largura do nucelo.

QUADRO 2. — Melancia Tetraploide var. Keckley Sweet. Observações sobre o estado de desenvolvimento do saco embrionário em óvulos de diferentes idades.

Idade do óvulo em relação à abertura da flor	Estado de desenvolvimento												
	Total de óvulos examinados	Célula mãe do macrosporo	Tetrade de macrosporos	Macrosp. funcional	S. E. dois núcleos	S. E. quatro núcleos	S. E. oito núcleos	S. E. completa fertiliz.	S. E. fertiliz. t. político	S. E. em degener.	Endos-perma Cel-ovo	Endosperma e embrião	
1 dia antes	41	21	4	6	9	1	—	—	—	—	—	—	
Dia da abertura	90	27	20	6	3	10	4	20	—	—	—	—	
1 dia após	87	5	1	13	14	11	8	30	1	3	—	—	
2 dias após	86	8	3	—	5	7	3	21	9	16	13	1	
3 dias após	90	—	—	3	11	10	3	7	1	41	14	—	
4 dias após	23	—	—	—	1	1	—	1	—	12	8	—	
6 dias após	12	—	—	—	—	—	—	—	—	7	5	—	
7 dias após	26	—	—	—	—	—	—	3	—	11	7	4	
8 dias após	19	—	—	—	—	—	—	—	—	12	1	6	

Este quadro representa o total dos óvulos examinados incluindo "grandes", "médios" e "pequenos".

QUADRO 3. — Melancia tetraplóide. Números-índices (produto das duas maiores dimensões) de núcleos com idades variáveis desde a véspera até 14 dias após a abertura das flôres.

Idade do Ovário	Estado do Saco Embrionário	Números Índices	Média	Log. das Médias
Véspera da abertura . . . . .	S. E. de dois núcleos	0,0493	0,0463	$\bar{2},6656$
		0,0540		
		0,0589		
Dia da abertura . . . . .	S. E. de quatro núcleos	0,0432	0,0637	$\bar{2},8041$
		0,0476		
		0,0720		
		0,0920		
	S. E. completo	0,0680	0,0753	$\bar{2},8768$
0,0713				
0,0714				
0,0768				
0,0888				
Um dia após a abertura . . . . .	S. E. completo	0,0700	0,1002	$\bar{1},0009$
		0,0768		
		0,1144		
		0,1148		
		0,1248		
Dois dias após a abertura . . . . .	S. E. completo	0,1375	0,1557	$\bar{1},1923$
		0,1421		
		0,1512		
		0,1705		
		0,1771		
	Cel. ôvo + Endosperma	0,1485	0,1899	$\bar{1},2785$
		0,1683		
		0,1705		
		0,2304		
		0,2318		
Quatro dias após a abertura . . . . .	Cel. ôvo + Endosperma	0,2961	0,3488	$\bar{1},5426$
		0,3290		
		0,3500		
		0,4292		
Sete a oito dias após a abertura . . . . .	Cel. ôvo + Endosperma de alguns núcleos	0,4100	0,6785	$\bar{1},8315$
		0,5160		
		0,6215		
		0,7800		
		0,8268		
	Embrião 2-5 células + Endosperma + Haustório inicial	0,9167	0,7346	$\bar{1},8660$
		0,6120		
		0,6600		
		0,7611		
		0,9072		
13-14 dias após a abertura . . . . .	Embrião globular + Endosperma + Haustório	11,4275	12,7715	1,1062
		12,0050		
		13,6350		
		13,7700		
	Embrião com cotilédones + Endosperma	38,6750	39,9250	1,6010
41,1750				

De cada nucelo tomavam-se as duas maiores dimensões no corte que apresentasse maior extensão. Levando em consideração que o volume dos núclos, qualquer que fôsse a sua forma, seria calculado através de uma fórmula em que essas duas dimensões entrariam como fatores, tomou-se apenas o produto das mesmas como medida de comparação dos volumes, produto êsse que aparece no quadro 3, como número-índice do volume.

As medições foram efetuadas ao microscópio, com ocular milimetrada. Nos óvulos maiores, as medições foram feitas sob a lupa, com auxílio de uma lâmina milimetrada.

O crescimento do nucelo está relacionado com o desenvolvimento do saco embrionário e com a idade do ovário. Assim é que no quadro 3 observa-se um aumento na média dos números-índices, seja em sacos embrionários do mesmo estado, mas de idades diferentes, seja naqueles em diferentes estados de desenvolvimento, mas da mesma idade.

Para representação gráfica da correlação, os números-índices fôram transformados em seus logaritmos. Assim, na figura 7 têm-se em ordenadas os logaritmos dos números-índices e em abcissas os números de dias que representam a idade dos óvulos. A linha obtida pela ligação dos pontos de correspondência exprime a correlação em causa.

## 5 — DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE

Os frutos maduros de melancia são colhidos, em geral, cêrca de 40 dias após o florescimento. Já aos 10 dias, porém, êles atingem considerável tamanho, exigindo uma dissecação prévia para fixação dos óvulos individualmente.

Tendo colhido material com 10, 14 e 22 dias, constatou-se que os óvulos são muito variáveis em tamanho. Aos 10 dias, independentemente do tamanho, todos os óvulos apresentavam tegumentos flácidos, nucelo espêsso e carnoso. No seu interior havia um endosperma minúsculo, quase microscópico, no qual era muito característico o haustório, prolongamento calazal (fig. 4-A a D) cujo com-

primento era duas a três vêzes o do corpo do endosperma. No interior deste, via-se o microscópico embrião, de secção circular.

Aos 14 dias, os tegumentos ainda eram flácidos e o nucelo espesso, às vêzes mais reduzido que aos 10 dias. O endosperma e o embrião estavam mais desenvolvidos; neste último, agora cordiforme, os cotilédones se esboçavam. (fig. 4-E e F'). O haustório do endosperma não foi visto em muitas sementes; quando encontrado se apresentava atrofiado (fig. 4-F', II e I). Aos 22 dias, alguns dos óvulos (uma pequena parte) já se havia transformado em sementes que aparentemente em nada se diferenciavam das encontradas no fruto maduro: eram sementes grandes, de tegumento espesso e rijo, nucelo de espessura reduzida, transformado em uma película fina e transparente; o endosperma havia desaparecido. Parte dessas sementes tinha o embrião plenamente desenvolvido, ocupando todo o espaço interno do nucelo — eram as *sementes normais*. Noutras, em menor número, o embrião de tamanho variável, ocupando até 1/3 do espaço livre dentro do nucelo, era incompletamente desenvolvido — que no fruto maduro seriam classificadas como *sementes chôchas*.

A maior parte dos óvulos, porém, apresentava tegumentos flácidos, nucelo ainda espesso em algumas zonas e já transparente em outras, contendo endosperma e embrião de tamanhos variáveis e o haustório muito atrofiado quando ainda existente (fig. 5-A a F'). A grande série de *sementes abortadas* no fruto maduro, corresponde a estes óvulos.

De ovários de cada uma das idades de 10, 14 e 22 dias, retiraram-se os óvulos representando tôda a variação de tamanho existente e que permitissem a dissecção sob a lupa. Uma vez numerados na ordem decrescente de tamanho, de cada um dêles se extrairam o endosperma e o embrião. As três séries apresentadas nas fig. 4 e 5 mostram que há uma correlação bem apreciável entre o tamanho dos óvulos ou das sementes e o tamanho do endosperma e do embrião.

## 6 — DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Se bem que se tenham encontrado tôdas as fases de formação e desenvolvimento do saco embrionário, não se estudou detalhadamente a macrosporogênese. Tendo-se verificado previamente (6) que a microsporogênese é um processo cheio de anormalidades, o fato de ser encontrado grande quantidade de sacos embrionários não fertilizáveis leva a crer que também na macrosporogênese ocorram semelhantes anormalidades, resultando, daí uma primeira eliminação de óvulos.

Mesmo depois da fertilização ocorre uma segunda eliminação de óvulos: sòmente uma fração dos óvulos fertilizados se transforma em sementes e, conseqüentemente, esta forma tetraplóide apresenta muito menos sementes que a diplóide da qual se originou.

A obtenção de triplóides depende da polinização de tetraplóides por diplóides, sendo por isso um processo caro. O problema da obtenção de melancia sem sementes não se resume, pois, sòmente na obtenção do tetraplóide. Entre outros requisitos é necessário identificar entre os tetraplóides aquêles capazes de dar boa produção de sementes.

A própria melancia tetraplóide, no entanto, já consiste um avanço no melhoramento. Ela pode ser considerada uma variedade nova de pequeno número de sementes.

## SUMMARY

Megasporogenesis, embryo-sac formation and endosperm and embryo development were studied in a tetraploid variety of watermelon which was artificially obtained some years ago at the Instituto Agrônômico de Campinas, State of São Paulo.

Since the first stages of embryo-sac formation the ovules are of different sizes. In the "larges" ovules, megasporogenesis occurs before the opening of the flowers; almost all the ovules show complete embryo-sac at the day of anthesis and fertilization takes place 24 to 48 hours afterwards. Egg cell begins to divide about the seventh day; at this time the endosperm has about 16 nuclei.

Chalazal endosperm haustorium has been detected and its maximum length is shown in ten-day ovules, in which the embryo is at a globular stage. In the ovules of 13 and 14 days it has been observed well developed endosperm with an atrophied haustorium when present; the embryo was then heart-shaped. Completely mature seeds were found in unripe fruits 20 and 22 days old; in such seeds the embryo occupies the whole inner space before being filled by the endosperm and the nucellus; the latter is reduced to a thin and transparent envelop of the embryo; externally there is the hard and thick outer integument.

A relation between the embryo-sac development and nucellar growth has been well established.

It was noticed a very large elimination of ovules during fruit formation either before or after fertilization: the ovules became more and more delayed in the development of their different parts and eventually formed a large series of "aborted" seeds in the ripe fruit.

Only a small part of the ovules became normal seeds thus explaining why this tetraploid variety of watermelon shows a much smaller number of seeds than the original diploid.

#### LITERATURA CITADA

1. CHOPRA, R. N. The endosperm in some *Cucurbitaceae*. *Curr. Sci.* 22: 383-384. 1953.
2. ——— Occurrence of endosperm haustoria in some *Cucurbitaceae*. *Nature* 173:352-353. 1954.
3. ——— Some observations on endosperm development in the *Cucurbitaceae*. *Phytomorph.* 5:219-230. 1955.
4. JOHRI, B. M. and CHHAYA, ROY CHOWDHURY. A contribution to the embryology of *Citrullus colocynthis* Shrad. and *Melothria maderaspatana*. *New Phytol.* 56:51-60. 1957.
5. KIRKWOOD, J. E. The comparative embryology of the *Cucurbitaceae*. *Bull. N. Y. Bot. Gardn.* 3:313-402. 1904.
6. MEDINA, DIXIER M., PRADO, OLÍMPIO T., MENDES, A. J. T., [e outros]. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem sementes. *Bragantia* 17:[81]-100. 1958.
7. PURI, V. Studies in floral anatomy -VII: On placentation in the *Cucurbitaceae*. *Phytomorph.* 4:278-299. 1954.

8. SINGH, BAHADUR. Studies on the structure and development of seeds of the *Cucurbitaceae*. I: Seeds of *Echinocystis wrightii* Cogn. Phytomorph. 2:201-209. 1952.
9. SING, D. Embryological studies in *Cucumis melo* L. var. *pubescens* Willd. J Indian Bot. Soc. 34:72-78. 1955.