

# BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 20

Campinas, agosto de 1961

N.º 34

## PESQUISAS CITOLÓGICAS E GENÉTICAS EM TRÊS ESPÉCIES DE *COFFEA*. AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *COFFEA CANEPHORA* PIERRE EX FROEHNER. (1)

CÂNDIDA HELENA T. M. CONAGIN e A. J. T. MENDES, *engenheiros-agrônomo*s, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo

### RESUMO

As pesquisas realizadas com três espécies de *Coffea* (*canephora*, *congensis* e *dewevrei*) durante o período de 1943 a 1950 são aqui relatadas com a finalidade principal de apresentar os dados colhidos para uma futura continuação do trabalho. Parte desses dados acha-se publicada parceladamente.

Essas três espécies são auto-estéreis, isto é, não produzem frutos quando suas flôres são autopolinizadas. No entanto, o desenvolvimento do saco embrionário e a microsporogênese são normais; além disso nenhum outro fator mecânico ou físico impede a polinização. Os grãos de pólen mostram uma grande variabilidade em tamanho, não havendo diferença estatística que separe as três espécies.

Em *C. congensis* de Uganda, a germinação do pólen foi anormal, formando expansões disformes do citoplasma em vez de tubos polínicos. O pólen conservado em laboratório perdeu o poder germinativo ao fim de sete dias. As autopolinizações efetuadas durante os anos de 1943 e 1944 não produziram frutos. No período de 1944 a 1950 foram realizados cruzamentos intra-específicos entre clones de cada espécie, procurando combinações compatíveis. Na espécie *C. canephora* foram feitas outras observações além dessas, tais como sobre a queda dos frutinhas e a vitalidade das sementes.

As pesquisas realizadas levaram à conclusão de que nas espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei* existe o fenômeno da auto-incompatibilidade genética. Observações mais detalhadas na espécie *C. congensis* mostraram que, além da auto-incompatibilidade, existe, nesta espécie, a esterilidade masculina.

Tendo-se analisado um grande número de cruzamentos de *C. canephora* foi possível estabelecer o mecanismo genético da auto-incompatibilidade; este mecanismo é o mesmo descrito para o gênero *Nicotiana* por East e Mangelsdorf, segundo o qual uma série de fatores alelomórfos S controlam as relações entre tubo polínico e estigma. Os dados apresentados permitem admitir para *C. canephora* a existência de três fatores S e classificar uma parte das plantas estudadas em três grupos: S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>3</sub> e S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>.

(1) Recebido para publicação em 26 de junho de 1961.

## 1 — INTRODUÇÃO

As espécies conhecidas do gênero *Coffea* podem ser separadas em dois grupos com relação ao número de cromossomos: *C. arabica*, que é tetraplóide com  $2n=44$  cromossomos, e as outras, como *C. canephora*, *C. dewevrei*, *C. congensis* etc., que são diplóides, com  $2n=22$  cromossomos. Estes dois grupos também se distinguem pelo fato de *C. arabica* ser a única espécie autofértil; as demais até hoje conhecidas são auto-estéreis.

Pela literatura que nos foi possível consultar, sabe-se que a primeira referência ao fenômeno da auto-esterilidade no gênero *Coffea* é de von Faber (4). Num estudo detalhado da biologia da flor do cafeeiro (Café Robusta, Café Abeokutae, Café excelsa, Café Java e Café Quillou) êsse autor relata suas observações sôbre a penetração do tubo polínico em estilos da própria flor e de flôres de outras plantas, chegando à conclusão de que, no primeiro caso, êle é muito mais lento do que no segundo; conforme suas observações, mesmo nos casos em que a autopolinização se realiza já no botão, como no Liberica, o pólen estranho alcança o ovário antes do pólen próprio. Para explicar êste fenômeno, o autor supõe que semelhanças ou diferenças químicas sejam responsáveis pelo crescimento lento ou rápido dos tubos polínicos respectivamente nos casos de autopolinização ou de cruzamento.

Nas suas pesquisas efetuadas em Java, Ferwerda (6) confirma a auto-esterilidade para as espécies *robusta*, *excelsa* e *liberica*, estudando o seu comportamento em autopolinizações e combinações de clones; não fêz, porém, pesquisas citológicas.

Muito recentemente foi publicado um trabalho longo e detalhado sôbre a auto-esterilidade em *C. canephora* (2) e do qual tivemos conhecimento enquanto escrevíamos êste trabalho. Tivemos a satisfação de ver realizadas no Congo Belga as mesmas pesquisas que, entre os anos de 1943 e 1950, realizamos aqui, pesquisas essas que conduziram os experimentadores às mesmas conclusões a que chegamos. A interpretação da auto-esterilidade no *C. canephora* coincide com a nossa. Apenas pudemos ir mais adiante, estabelecendo um esquema que confirma a hipótese formulada.

O presente trabalho é, ao mesmo tempo, um relatório das pesquisas realizadas durante o período de 1943 a 1950, com três espécies (*C. dewevrei*, *C. congensis* e *C. canephora*) e a apresentação dos resultados a que chegamos sôbre a auto-incompatibilidade em *C. canephora*.

## 2 — PESQUISAS CITOLÓGICAS

### 2.1 — MATERIAL E MÉTODO

As pesquisas citológicas incluíram o estudo da microsporogênese, da formação do saco embrionário, da morfologia do pólen assim como a sua germinação em meios natural e artificial.

Para a microsporogênese foram feitos esfregaços de anteras em carmim acético e para o estudo do saco embrionário foram feitos cortes de ovários incluídos em parafina e depois coloridos pela Hematoxilina férrica de Heidenhain. As anteras foram colhidas em fixador de Carnoy (álcool 3 : ácido acético 1) e os ovários em fixador de Craff (17). Também o pólen foi examinado pelo carmim acético e a sua germinação foi tentada em algumas combinações de ágar e açúcares, técnicas estas que serão melhor discutidas em capítulos próprios.

### 2.2 — MICROSPOROGENESE

A microsporogênese foi estudada nas três espécies: *canephora* (15), *dewevrei* (10) e *congensis* (1). Trata-se de um processo normal; os cromossomos profásicos são muito emaranhados, tornando muito difícil a sua identificação individual; o nucléolo é bem grande e colorido, havendo sempre um cromossomo nitidamente a êle ligado. Em diaquinese, metáfase e anáfase é fácil contar os 11 pares de cromossomos característicos das três espécies. A separação em anáfase é normal, o mesmo acontecendo com a segunda divisão, que dá origem aos quatro microsporócitos finais, cada um com  $n=11$ .

### 2.3 — DESENVOLVIMENTO DO SACO EMBRIONÁRIO

A formação do saco embrionário acha-se muito bem estudada por diversos autores que se ocuparam desse assunto nas diversas espécies de *Coffea* (4, 7, 8, 9, 11, 13, 16).

É um processo normal, dando como produto final um saco embrionário típico, com três antípodas na região chalazal, duas sinérgidas e a oosfera na região micropilar e dois núcleos polares no centro.

Um estudo detalhado sobre a formação do saco embrionário em *C. canephora* já foi por nós anteriormente publicado (16).

### 2.4 — PÓLEN

Os grãos de pólen das espécies diplóides de café resultam, como já ficou visto, dum processo normal de meiose; quando maduros e sol-

tos das tetrades adquirem forma esférica bem regular; apresentam uma exina lisa, provida de três sulcos germinais como a maioria dos dicotiledôneos (18, pág. 157).

**Medições** — As flôres fornecedoras de pólen eram protegidas antes da abertura; os grãos de pólen eram distribuídos em uma gota de carmim acético, sobre uma lâmina; cada lâmina continha uma mistura de anteras de três ou quatro flôres. De cada planta foram medidos no mínimo 100 grãos.

Foram feitas medições em grãos de pólen em 11 plantas de *C. congensis*, 17 plantas de *C. dewevrei* e 59 plantas de *C. canephora*.

Os resultados são apresentados nos quadros 1, 2 e 3, nos quais os números em negrito significam os limites extremos, isto é, o menor e o maior diâmetros, o menor e o maior diâmetros médios.

QUADRO 1. — Medidas de grãos de pólen em *Coffea congensis*

Planta	Diâmetro do grão		
	maior	menor	média
	μ	μ	μ
<b>UGANDA</b>			
749 .....	39,10	29,00	33,74
752 .....	33,25	<b>21,16</b>	29,47
753 .....	33,25	24,18	29,32
758 .....	33,25	21,16	27,51
Pl. 5 .....	33,25	21,16	<b>26,27</b>
796 .....	43,70	29,90	<b>34,52</b>
<b>BANGELAN</b>			
Pl. 20 .....	36,28	21,16	27,36
788 .....	42,32	21,16	31,98
793 .....	30,23	24,18	33,25
794 .....	<b>45,30</b>	30,20	32,95
832 .....	36,24	27,18	31,95
Média geral .....	—	—	32,04

Foi verificado, estatisticamente, que a variação do tamanho dos grãos de pólen é muito grande tanto entre plantas de uma mesma espécie como dentro de uma mesma planta. Esta medida, portanto, não tem valor como característica da espécie, mas dá uma idéia do tamanho relativo dos seus grãos de pólen.

QUADRO 2. — Medidas de grãos de pólen em *Coffea dewevrei*

Planta	Diâmetro do grão		
	maior	menor	média
	$\mu$	$\mu$	$\mu$
<b>EXCELSA</b>			
Pl. 3 .....	33,22	<b>18,12</b>	24,46
751 .....	36,24	27,18	30,83
833 .....	<b>46,00</b>	27,60	<b>35,14</b>
<b>ABEOKUTAE</b>			
Pl. 23 .....	34,50	20,70	26,06
773 .....	<b>39,26</b>	21,14	27,81
Pl. 19 .....	24,16	<b>18,12</b>	21,25
<b>DYBOWSKY</b>			
Pl. 35 .....	32,20	18,40	25,53
Pl. 37 .....	<b>36,24</b>	21,14	29,17
777 .....	30,20	<b>18,12</b>	23,82
778 .....	27,18	<b>18,12</b>	19,32
Pl. 41 .....	30,20	<b>18,12</b>	23,40
<b>DEWEVREI</b>			
Pl. 64 .....	<b>60,40</b>	24,16	31,17
Pl. 68 .....	36,80	23,00	32,61
755 .....	33,22	21,14	27,66
762 .....	32,20	23,00	26,70
763 .....	33,22	<b>18,12</b>	27,15
775 .....	30,20	21,14	26,30
Média geral .....	—	—	29,44

A quantidade de grãos normais é grande, perfazendo entre 80 e 90% quando examinados pela solução iodo-iodurada ou pelo carmim acético.

**Germinação e longevidade** — Um dos trabalhos mais antigos e mais completos sobre este assunto é o de von Faber (5). O autor fez ensaios de germinação de pólen de «*C. liberica*, *C. arabica*, *C. laurentii* (Robusta), *C. abeokutae*, *C. excelsa*, *C. uganda*, *C. dewevrei* e *C. quillou*» semeando-os em lâminas com meios nutritivos e colocadas em câmaras úmidas. Os meios por ele experimentados foram: água de chuva, soluções aquosas de sacarose, ágar com diferentes concentrações de sacarose, glucose, lactose, dextrose e arabinose, soluções de  $KNO_3$ , NaCl e ácido málico, e também substâncias protéicas como peptonas e albumina. Nessas experiências, o melhor meio foi uma solução de ágar a 1% com 20% de sacarose, na qual os grãos de pólen de café germinaram

QUADRO 3. — Medidas de grãos de pólen em *Coffea canephora*

Planta	Diâmetro do grão		
	maior	menor	média
	$\mu$	$\mu$	$\mu$
<b>CANEPHORA</b>			
Pl. 1 .....	36,24	27,18	32,89
754 .....	36,24	27,18	30,83
Pl. 9 .....	33,22	<b>24,16</b>	28,26
Pl. 10 .....	<b>42,28</b>	24,16	30,86
Pl. 11 .....	39,26	27,18	33,89
Pl. 13 .....	33,22	24,16	29,44
Pl. 14 .....	36,24	24,16	30,23
Pl. 37 .....	33,25	27,21	29,77
<b>LAURENTII</b>			
785 .....	36,24	27,18	33,52
Pl. 2 .....	39,29	27,20	32,74
Pl. 3 .....	36,24	27,18	32,49
Pl. 4 .....	39,26	27,18	32,46
Pl. 8 .....	36,24	30,20	33,25
Pl. 9 .....	36,24	27,18	29,80
Pl. 10 .....	<b>45,30</b>	33,22	37,51
Pl. 11 .....	39,29	30,23	34,85
Pl. 12 .....	33,22	<b>21,14</b>	28,60
Pl. 14 .....	36,24	27,18	30,95
Pl. 15 .....	39,26	27,18	33,25
<b>BUKOBENSIS</b>			
451 .....	<b>45,30</b>	27,18	35,46
451 .....	36,24	27,18	33,10
Pl. 3 .....	36,24	<b>24,16</b>	30,74
<b>KOUILLOU</b>			
66-3 .....	40,05	26,70	29,74
66-3 .....	36,21	<b>24,16</b>	36,24
66-4 .....	34,99	30,23	36,24
66-5 .....	39,26	<b>24,16</b>	30,65
66-6 .....	34,71	26,30	29,34
66-6 .....	32,35	27,18	33,25
66-7 .....	40,05	26,70	29,45
66-8 .....	34,71	29,37	33,03
66-10 .....	36,24	27,18	31,39
66-10 .....	<b>42,28</b>	33,22	<b>38,09</b>
66-11 .....	42,28	27,18	33,40
66-15 .....	40,05	29,37	34,92
66-15 .....	32,04	<b>24,03</b>	27,63
<b>KOUILLOU</b>			
67-1 .....	32,04	<b>18,69</b>	23,12
67-2 .....	37,38	26,70	31,45
67-5 .....	36,24	27,18	32,34
67-10 .....	40,05	24,03	30,94

QUADRO 3. — (continuação)

Planta	Diâmetro do grão		
	maior	menor	média
	$\mu$	$\mu$	$\mu$
<b>KOUILLOU</b>			
67-12 .....	<b>42,72</b>	26,70	33,03
67-13 .....	34,71	24,03	29,45
<b>KOUILLOU</b>			
68-1 .....	37,38	26,70	32,33
68-2 .....	34,71	24,03	30,57
68-3 .....	37,38	24,03	30,94
68-4 .....	36,24	27,18	33,34
68-5 .....	37,38	<b>21,36</b>	30,30
68-6 .....	37,38	29,37	32,15
68-8 .....	34,71	26,70	30,20
68-10 .....	45,39	26,70	35,70
68-11 .....	34,71	26,70	30,68
68-12 .....	<b>48,06</b>	26,70	31,91
68-13 .....	37,38	26,70	31,99
68-14 .....	40,05	21,36	30,06
68-15 .....	32,04	24,03	28,17
<b>KOUILLOU</b>			
69-1 .....	30,20	24,16	27,72
69-2 .....	32,04	24,03	28,49
69-3 .....	34,71	26,70	30,89
69-4 .....	32,04	24,03	27,37
69-5 .....	34,71	24,03	29,13
69-8 .....	34,71	26,70	30,65
69-10 .....	32,04	<b>18,69</b>	<b>26,59</b>
69-11 .....	<b>36,24</b>	27,18	32,04
69-13 .....	34,71	24,03	28,78
<b>KOUILLOU</b>			
70-1 .....	34,71	<b>24,03</b>	30,57
70-1 .....	33,22	24,16	28,99
70-5 .....	37,38	24,03	28,03
70-15 .....	<b>42,28</b>	27,18	35,09
Média geral .....	—	—	29,66

ràpidamente, formando tubos longos; o limite da concentração de sacarose para permitir a germinação foi 40 e 45%, mas os tubos formados foram bem mais curtos. Êste mesmo autor também estudou a conservação do pólen em ambientes de umidades várias, e o efeito da alternância do umedecimento e da secagem sôbre os grãos de pólen.

Para início do nosso trabalho foram feitas algumas observações preliminares, experimentando-se as seguintes combinações:

- 1) ágar a 0,5% com:
  - A) sacarose: 5, 10, 15, 20 e 25%
  - B) glicose: 5, 10, 15, 20 e 25%
- 2) ágar a 1% com:
  - A) sacarose: 5, 10 e 15%;
  - B) glicose: 5, 10 e 15%.

Ficou evidenciado que os melhores resultados eram obtidos quando usado um meio de 0,5% de ágar com 10% de sacarose.

Foram então feitos ensaios de germinação com três plantas de *C. dewevrei*, quatro plantas de *C. congensis* e quatro plantas de *C. canephora*, usando-se o mesmo meio para tôdas, isto é, uma solução de ágar a 0,5% e 10% de sacarose. De cada planta testada foram feitas quatro lâminas e em cada uma foram contados 250 grãos; êstes grãos foram provenientes de mistura de duas ou três anteras, de duas flôres no mínimo.

Considerando o pólen do dia da abertura das flôres, os resultados da germinação foram os seguintes:

Em *C. dewevrei* a porcentagem de germinação variou entre 19,28% e 27,63% (12); em *C. congensis* houve plantas (do *congensis* de Banglades) com 50,24%, assim como plantas do *congensis* de Uganda cujo pólen não germinou, produzindo expansões disformes em vez de tubos polínicos (1); em *C. canephora* a melhor lâmina teve 55,2% de grãos germinados (14).

Nas condições em que o pólen foi conservado, isto é, num refrigerador cuja temperatura oscilou entre 3 e 8°C, com umidade controlada por CaCl<sub>2</sub>, o pólen de qualquer dessas espécies perdeu o seu poder germinativo depois de sete dias de conservação. Para o pólen de *C. canephora* também foram experimentados os seguintes meios de conservação: recipientes combinando as temperaturas ambientes 0° e 10°C e umidades relativas de 10% e 30% obtidas com soluções de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14); nestas condições o pólen sofreu oscilações na porcentagem de germinação e uma queda rápida do seu poder germinativo, o qual não durou mais do que sete dias.

### 3 -- PESQUISAS GENÉTICAS

As pesquisas genéticas foram apenas iniciadas; incluíram um extenso trabalho de autopolinizações e de cruzamentos, anotando-se sempre o número de flôres trabalhadas e o número de frutos e de sementes produzidas em cada caso.

O número de plantas em experiência e o número de flôres submetidas à autopolinização constam do quadro 4.

QUADRO 4. — Número de autopolinizações feitas em plantas de três espécies de *Coffea*

Espécie	Plantas	Flôres	Frutos
	n. <sup>o</sup>	n. <sup>o</sup>	n. <sup>o</sup>
<i>C. canephora</i> .....	22	4 310	0
<i>C. deweyrei</i> .....	32	6 323	0
<i>C. congensis</i> .....	14	2 761	0

Como se vê, não foi obtido um fruto sequer de 13 394 flôres autopolinizadas.

O plano de cruzamentos também abrangeu as mesmas três espécies, tendo sido feito, durante o período 1944-1950, o trabalho resumido no quadro 5.

QUADRO 5. — Cruzamentos realizados entre clones das espécies de *Coffea*, no período 1944-1950

Ano	Espécie	Natureza do trabalho
1944 .....	<i>C. deweyrei</i>	12 cruzamentos
1945 .....	<i>C. deweyrei</i>	21 cruzamentos
	<i>C. canephora</i>	7 cruzamentos
	<i>C. congensis</i>	7 cruzamentos
1946 .....	<i>C. Canephora</i>	21 cruzamentos
1947 .....	<i>C. Canephora</i>	29 cruzamentos, sendo 11 simples 18 duplos 46 «back-crosses»
1948 .....	<i>C. Canephora</i>	10 cruzamentos 15 «back-crosses»
1949 .....	<i>C. Canephora</i>	9 cruzamentos 7 «back-crosses»
1950 .....	<i>C. Canephora</i>	6 cruzamentos 10 «back-crosses»

#### 4 — AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *COFFEA CANEPHORA*

##### 4.1 — POLINIZAÇÃO E FERTILIZAÇÃO

As observações feitas com o pólen de *C. canephora* resumem-se no seguinte: o pólen é normal e germina perfeitamente quando o meio nutritivo lhe é apropriado, embora as porcentagens de germinação tenham oscilado um pouco. O exame de pistilos polinizados com o próprio pólen revelou que os grãos não germinam, ou produzem tubos polínicos tão curtos que não ultrapassam as papilas; quando recebem pólen compatível, de outra planta, a germinação se faz por meio de tubos longos, normais, que caminham pelo estilo e penetram no óvulo; realiza-se então a fertilização, responsável pelo posterior desenvolvimento da semente. Há claramente, portanto, uma incompatibilidade esporofítica em *C. canephora*.

Para o estudo da fertilização e início do desenvolvimento do embrião e do endosperma, foram então colhidos, durante 25 dias, ovários de flôres que: a) haviam sido emasculadas e protegidas; b) haviam sido autopolinizadas; c) haviam sido polinizadas com pólen considerado compatível. Como se verá adiante, êste pólen na realidade também era incompatível; havia sido erradamente classificado como compatível.

Desta forma, após a fixação em Crafi, inclusão em parafina e coloração pela Hematoxilina, os cortes seriados foram examinados num total de 623 óvulos. O resultado foi sensivelmente igual para as três séries de óvulos, encontrando-se sacos embrionários normais, sem sinais de fertilização ou de desenvolvimento de endosperma, até mesmo nos 167 óvulos do material relativo à polinização compatível. O fato de não terem sido encontrados sinais de fertilização nos ovários das flôres que receberam pólen considerado compatível, foi um tanto surpreendente. O cruzamento que forneceu êste material foi P.64enx.3 x P.64enx.6, do qual possuímos os dados do quadro 6.

A porcentagem de 1,3% de pegamento é muito baixa; é muito mais baixa que as médias de pegamento dos anos 1937 a 1947 (quadro 7):

1,3% de pegamento dão a seguinte esperança matemática:  
em 100 óvulos,

1,3 devem ser fertilizados

98,7 devem ser não fertilizados.

Supondo que a descida do tubo polínico pelo estilo é vagarosa, po-

QUADRO 6. — Sementes obtidas de um cruzamento suposto compatível, em *C. Canephora*

Cruzamento	Híbrido	Flôres	Frutos	Sementes
		n. <sup>o</sup>	n. <sup>o</sup>	n. <sup>o</sup>
P.64en3 x P.64ex6 ....	H. 619	30	0	0
P.64en3 x P.64ex6 ....	H.1 557	76	22	8
P.64en3 x P.64ex6 ....	H.1 559	66	0	0
P.64en3 x P.64ex6 ....	H.1 791	134	1	2
P.64en3 x P.64ex6 ....	H.1 809	161	0	0
Total .....	—	367	23	10
Porcentagem .....	—	—	—	1,3%

dendo levar até sete dias para penetrar no saco embrionário, podemos excluir do cálculo os óvulos colhidos nos primeiros sete dias, ficando, portanto, um total de 126 óvulos examinados. Temos então o seguinte cálculo:

$1 - 0,987^{126} =$  probabilidade de ser encontrado pelo menos um caso de fertilização.

$$\begin{aligned} \log.0,987^{126} &= 126 \times \log. 0,987 \\ &= 126 \times (1,99432) \\ &= 126 (-0,00568) \\ &= -0,71568 = 1,28432 \\ \text{antilog.}1,28432 &= 0,1924 \end{aligned}$$

$$1-0,1924 = 0,807 \text{ ou } 80,8\%.$$

Portanto, se, apesar de haver 80,8% de probabilidade de ser observado um caso de fertilização, não foi observado nenhum, a conclusão a que se chega é que, na realidade, trata-se de um cruzamento incompatível e os frutos e sementes encontradas se originaram provavelmente de contaminação de pólen. Por conseguinte, o cruzamento P64enx.3 x P64enx.6 é incompatível.

Esta conclusão é até certo ponto feliz, pois que havíamos feito um esquema dentro do qual os fatores S da esterilidade explicam perfeitamente os resultados gerais das polinizações entre plantas compatíveis e incompatíveis; o fato de o cruzamento em questão ser fértil, trazia dificuldades para o esquema; a incompatibilidade dessas plantas recoloca o esquema em funcionamento, como será explicado adiante.

Em virtude do fato de ser incompatível o cruzamento P64enx3 x

P64enx6 (antes considerado compatível), o processo de fertilização e do desenvolvimento do endosperma não pôde ser estudado.

#### 4.2 — FRUTIFICAÇÃO E QUEDA DOS FRUTINHOS

A frutificação na espécie *C. canephora* é sempre muito baixa, quer se trate de polinizações controladas ou livres.

O quadro 7 mostra que em polinizações controladas, a porcentagem de frutificação variou de 1,0 a 66,7% e a de sementes (sobre o número inicial de óvulos) variou de 1 a 58,3%.

A baixa produtividade desta espécie está relacionada com a queda dos frutinhas novos, cujo desenvolvimento chega até um certo ponto e depois paralisa, seguindo-se a sua seca e queda.

Em 15 plantas da coleção e em 17 híbridos intra-específicos foram marcados diversos ramos, deixando-os expostos à livre polinização; periodicamente foram feitas contagens de frutinhas, obtendo-se, por diferença, o número dos que foram se desprendendo. Pelo quadro 8 pode ser visto que 15 dias depois da abertura das flôres quase metade dos ovários havia caído; a queda continuou ainda acentuada até os 63 dias, quando atingiu 83 a 98% do número inicial de ovários. A frutificação foi, no final, 2,3% nas plantas da coleção e 6,0% nas plantas híbridas.

Em 1950 foram marcadas, da mesma forma, 20 plantas da coleção e 15 híbridos intra-específicos, com um total de 12 633 flôres nas primeiras e 4 299 flôres nas últimas; a porcentagem de frutificação obtida foi, respectivamente, 7,9% e 4,8%. Os resultados das polinizações livres nesse ano foram um pouco superiores aos de 1949, mas essa diferença é perfeitamente admissível, em vista da variabilidade normal das condições de clima e ambiente de um ano para outro.

#### 4.3 — VITALIDADE DAS SEMENTES

É freqüentemente muito baixa a porcentagem de germinação de sementes de *C. canephora* semeadas diretamente na terra; se semeadas em câmara úmida (sobre papel umedecido, em caixas de Petri) obtém-se uma porcentagem melhor, mas ainda bastante baixa. Esse resultado poderia ser determinado pela ocorrência de sementes sem embrião; no entanto, examinando 1 057 sementes colhidas de 44 plantas, foram encontradas apenas 33 sem embrião, ou sejam 3,1%.

Tendo, em outra ocasião, semeado 1 621 sementes provenientes de 57 plantas, foi constatado que de 23 plantas nenhuma germinou (709

QUADRO 7. — *Coffea canephora*. Porcentagem de frutos e sementes obtidos em cruzamentos compatíveis

Ano	Híbrido — Plantas cruzadas	Frutos	Sementes
		%	%
1937	H. 447 — 35 x 208 .....	50,0	35,7
	H. 449 — 37 x 208 .....	66,7	33,3
	H. 479 — 67-10 x 68-13 .....	51,8	43,2
	H. 481 — 68-13 x 69-10 .....	11,5	5,8
	H. 482 — 69-8 x 68-13 .....	35,6	30,8
	H. 484 — 69-10 x 70-3 .....	11,1	11,1
	H. 485 — 70-2 x 70-12 .....	1,0	0,5
1938	H. 551 — 35 x P64enx1 .....	16,7	9,5
	H. 554 — 35 x P64enx1 .....	53,0	35,4
	H. 555 — 35 x 208 .....	7,3	3,6
	H. 556 — 35 x P64enx2 .....	63,2	45,4
	H. 558 — 37 x 35 .....	—	—
	H. 608 — P64enx1 x 35 .....	17,5	35,0
	H. 613 — P64enx2 x 35 .....	36,2	31,3
	H. 621 — P64enx6 x 35 .....	20,5	18,2
	H. 622 — P64enx6 x P64enx1 .....	22,5	17,3
	H. 623 — P64enx7 x P64enx6 .....	15,0	12,5
1939	H. 649 — 35 x 208 .....	2,3	4,6
	H. 699 — P64enx3 x 208 .....	43,5	32,7
1940	H. 754 — 37 x 574 .....	17,8	16,7
	H. 834 — P64enx1 x P64enx6 .....	9,5	8,3
1941	H. 904 — P64enx6 x P64enx2 .....	9,5	8,8
	H. 928 — P64enx1 x 37 .....	29,4	21,3
	H. 934 — P64enx2 x 37 .....	22,4	13,9
1943	H. 1 073 — 451 x 748 .....	39,2	25,0
1945	H. 1 403 — 70-11 x 748 .....	24,4	7,3
	H. 1 417 — 451 x 786 .....	66,6	58,3
	H. 1 424 — 748 x 786 .....	39,8	32,5
	H. 1 455 — 786 x 451 .....	16,7	10,8
1946	H. 1 545 — 754 x 748 .....	16,1	11,3
	H. 1 546 — 754 x 801 .....	7,5	7,5
	H. 1 547 — 754 x 876 .....	10,5	6,6
	H. 1 556 — P64enx3 x 37 .....	4,8	4,8
	H. 1 557 — P64enx3 x P64enx6 .....	—	25,0
	H. 1 558 — P64enx6 x 37 .....	12,8	8,5
1947	H. 1 711 — 35 x P64enx3 .....	58,3	50,0
	H. 1 743 — 37 x P64enx3 .....	13,0	6,5
	H. 1 744 — 37 x P64enx6 .....	5,3	3,1
	H. 1 788 — P64enx3 x 37 .....	3,6	2,7
	H. 1 790 — P64enx3 x P64enx2 .....	29,4	17,6
	H. 1 791 — P64enx3 x P64enx6 .....	0,7	0,7
	H. 1 807 — P64enx6 x 37 .....	7,3	9,7

QUADRO 8. — *Coffea canephora*. Número de flôres, número e porcentagem de ovários caídos e número e porcentagens de frutos em 30 plantas

Material	Flôres marca- das		Ovários desprendidos naturalmente após crescentes intervalos da abertura das flôres												Colheita			
	n.º	%	15 dias		23 dias		48 dias		63 dias		88 dias		108 dias		Frutos		Sementes	
			n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%
5 plantas ...	2 708	42,0	2 463	90,6	2 662	98,4	2 662	98,4	2 662	98,4	2 666	98,5	2 672	98,7	34	1,3	37	0,7
8 plantas ...	3 206	—	2 233	69,6	3 020	92,8	3 072	95,8	3 080	96,1	3 091	96,4	73	2,3	69	1,1		
17 híbridos (1) .....	3 324	47,2	2 386	71,8	2 768	83,3	2 914	87,6	2 950	88,8	201	6,0	286	4,3				

(1) Híbridos intra-específicos.

sementes); fazendo a dissecação destas, foi verificado que apenas 12 (1,7%) não tinham embrião. Examinando também 291 sementes não germinadas das demais plantas, 16 foram encontradas sem embrião (5,5%). Considerando, entretanto, o total das sementes semeadas (1621), o total das sementes encontradas sem embrião (28) corresponde a 1,7%; as sementes não germinadas, num total de 1300, correspondem a 80%. Logo, a falta de germinação não tem como causa a ausência de embrião.

A fim de verificar se as sementes que não germinam são estéreis ou se germinariam sob outras condições, foi feita uma experiência em que elas eram tratadas por uma solução aquosa a 1% de cloreto de trifeniltetrazolium, que tem a propriedade de colorir os embriões quando são férteis: sementes das variedades P64 e *Bukobensis* foram repartidas em três lotes; um lote de cada variedade foi tratado pelo Tetrazolium. A germinação em canteiro foi menor do que em caixas de Petri; nestas, porém, a porcentagem de germinação coincidiu perfeitamente com a de sementes férteis, acusada pelo teste do Tetrazolium. Daí podermos deduzir que as sementes que em geral não germinam em caixas de Petri são estéreis.

É notável, entretanto, que a ocorrência de sementes estéreis varia de planta para planta. Analisando a origem das sementes, pudemos verificar que: a) daquelas que apresentaram 100% de germinação, três plantas eram polinizadas artificialmente com pólen compatível e uma planta era livremente polinizada; b) das demais plantas artificialmente polinizadas com pólen compatível, quase tôdas apresentaram uma porcentagem de germinação elevada, o mesmo acontecendo com mais uma planta livremente polinizada; c) plantas híbridas polinizadas por outras deram sementes de germinação ligeiramente inferior às anteriores; d) plantas híbridas polinizadas por um dos clones de que se originaram («back-crosses»), deram em geral uma germinação muito baixa, sendo delas a quase totalidade das sementes que não germinaram. A análise levada a efeito permite agrupar os dados da seguinte forma:

TRATAMENTOS	Porcentagem de germinação
Plantas livremente polinizadas .....	77,9
Plantas polinizadas com pólen compatível .....	53,0
Híbridos polinizados por outros híbridos .....	46,5
«Back-crosses» .....	8,0

Essa diferença de viabilidade das sementes deve estar relacionada, assim, com o fenômeno da auto-incompatibilidade da espécie *C. canephora*.

#### 4.4 — AUTO-INCOMPATIBILIDADE

O fato de serem produtivas as plantas de *C. canephora* quando livremente polinizadas no campo, vem, juntamente com as observações relatadas, demonstrar que se trata de um caso de auto-incompatibilidade genética.

Para a análise genética da auto-incompatibilidade na espécie foi admitida a hipótese dos fatores S, como para *Nicotiana* (3). Esses fatores controlam o crescimento do tubo polínico dentro do estilo: quando o pólen (haplóide) possui o fator S igual a um dos fatores do estilo (diplóide), o tubo polínico formado não penetra até o ovário; quando o fator S do pólen é diferente dos dois fatores S do estilo, o tubo polínico caminha normalmente, penetrando no ovário e realizando a fertilização. No primeiro caso há incompatibilidade, no segundo há compatibilidade.

O conhecimento das combinações compatíveis já existentes é interessante ao continuador das pesquisas neste sentido, razão pela qual entendemos nosso dever deixar a relação seguinte:

<i>Pl.</i> ♀	<i>Pl.</i> ♂	<i>Pl.</i> ♀	<i>Pl.</i> ♂	<i>Pl.</i> ♀	<i>Pl.</i> ♂
35	x 208	68-13	x 69-10	786	x 451
35	x P.64enx.1	69-10	x 70-3	—	
35	x P.64enx.3	70-2	x 70-12	P64enx1	x 35
37	x 35	70-11	x 748	P64enx1	x 208
37	x 208	451	x 748	P64enx1	x P.64enx.6
37	x 574	451	x 786	P64enx3	x 37
37	x P.64enx.3	748	x 786	P64enx3	x 208
37	x P.64enx.6	754	x 748	P64enx3	x P.64enx.2
67-10	x 68-13	754	x 801	P64enx6	x 35
69-8	x 68-13	754	x 876	P64enx6	x 37

Das plantas que fazem parte desta relação, apenas seis têm sido combinadas de diversas maneiras: 35, 37, P64enx.1, P64enx.2, P.64enx.3 e P.64enx.6. Das demais não há dados suficientes para esclarecer uma análise genética.

Após numerosas combinações analisadas, chegamos à conclusão de

que as seis plantas mencionadas pertencem a três grupos distintos, quanto aos fatores S:

$S_1S_2$  — planta 35

$S_1S_3$  — plantas 37, P.64enx.1 e P.64enx.2

$S_2S_3$  — plantas P.64enx.3 e P.64enx.6.

Dentro de cada grupo, as plantas são interincompatíveis; as de cada grupo são compatíveis com as dos outros dois grupos.

As plantas P.64enx.1, enx.2, enx.3 e enx.6 provêm, originalmente, da multiplicação vegetativa de duas plantas únicas, tendo se perdido as anotações que permitiam dizer quais enxertos eram de uma e quais eram de outra planta. A incompatibilidade entre enx.1 e enx.2, e entre enx.3 e enx.6, e a compatibilidade entre enx.1 e enx.2, de um lado, e enx.3 e enx.6, de outro, mostram que as duas primeiras são originárias de uma planta e as duas últimas de outra.

A existência dos três grupos acima permite supor que a incompatibilidade seja controlada geneticamente e, pelo menos para este pequeno grupo de plantas, funciona perfeitamente um esquema de «*oppositional factors*». Dentro deste esquema todos os resultados de polinizações feitas se enquadram perfeitamente.

Fica, entretanto, faltando nesta análise genética, o estudo dos «*back-crosses*», o qual poderá, quando vier a ser feito, reafirmar a constituição genética dessas plantas com relação aos fatores S por nós estabelecida.

## CYTO-GENETICAL INVESTIGATIONS ON THREE SPECIES OF *COFFEA*

Self incompatibility in *Coffea canephora*

### SUMMARY

Results from eight years of research on *Coffea canephora*, *C. congensis* and *C. dewevrei* are reported. Some observations have already been published.

These three species are self-sterile, no fruit being formed after selfing. Nevertheless, embryo-sac development and microsporogenesis are normal and no other factor prevents pollination.

The pollen grains vary greatly in size. Those of *Coffea congensis* from Uganda germinate abnormally, producing cytoplasmic expansions instead of pollen tubes. Kept under laboratory conditions, the pollen of the three species lost viability within seven days.

Through intra-specific crosses several compatible clones have been established.

The observations made indicate that in *Coffea canephora*, *C. congensis*, and

*C. dewevrei* there is genetic self-incompatibility; in *C. congensis* there is in addition male sterility. In *Coffea canephora*, a species that was studied in more detail, it has been possible to determine the «S» factors for incompatibility controlling the relations between pollen tube and stigma. Some plants of this species could already be classified in three classes:  $S_1S_2$ ,  $S_1S_3$  and  $S_2S_3$ .

### LITERATURA CITADA

1. CONAGIN, CÂNDIDA H. T. M. Microsporogênese, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congensis* Froehner. *Bragantia* 20: [669]-677. 1961.
2. DEVREUX, M., POCHEP, P., VALLEYS, G. & GILLES, A. Recherches sur l'autosterilité du Caféier Robusta (*Coffea canephora* Pierre). Bruxelles, I. N. E. A. C. *Série scientifique* n.º 78, 44 p. 1959.
3. EAST, E. M. & MANGELSDORF, A. J. A new interpretation of the hereditary behavior of the self-sterile plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 11:166-171. 1925.
4. FABER, F. C. [von]. Ben en ander over de Biologie der Koffiebloem. *Taysmania* 21:566-577. 1910.
5. ——— Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg (Java)* 25. (Deuxième série) 10:59-160. 1912.
6. FERWERDA, F. P. Die Befruchtungsverhältnisse bei den Niederländische-Indie angebauten Kaffeearten. *Der Züchter* (8(4):92-102. 1936.
7. GRANER, E. A. Megasporogenesis in *Coffea arabica* L. *Arq. Inst. Biol. Veg.* Rio de Janeiro 3:69. 1936.
8. ——— Embriogênese em *Coffea*. I. Desenvolvimento do óvulo em *C. arabica* L. *Anais da Primeira Reunião Sul-Americana de Botânica* 3:193-201. 1938.
9. LELIVELD, J. A. Fruchtzetting Bij Koffie. *Arch. Koffice. Ned. Ind.* 12:127. 1938.
10. MEDINA, D. M. Observações citológicas em *Coffea*. XIX — Microsporogênese em *Coffea dewevrei*. *Bragantia* 12:[153]-162. 1952.
11. ——— Macrosporogênese, formação e desenvolvimento do saco embrionário, do endosperma e do embrião em *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. *Bragantia* 19:[767]-784. 1960.
12. ——— & CONAGIN, CÂNDIDA H. T. M. Auto-incompatibilidade em *Coffea dewevrei* de Wild. et Th. Dur. *Bragantia* 18:[283]-293. 1959.
13. MENDES, A. J. T. Observações citológicas em *Coffea*. VI — Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 2: [115]-125. 1942.
14. MENDES, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. *Bragantia* 9:[25]-41. 1949.
15. ——— Observações citológicas em *Coffea*. XVI — Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10:[97]-104. 1950.
16. ——— Observações citológicas em *Coffea*. XVII — O saco embrionário em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10:[105]-111. 1950.
17. RANDOLPH, L. S. A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *St. Techn.* 10:95-96. 1935.
18. WODEHOUSE, R. P. Pollen grains. New York, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., VII-X: 1-574. 1935.