

# OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS (\*)

## III. Megasporogênese, fertilização e poliembrionia (\*\*)

Oswaldo Bacchi

### INTRODUÇÃO

Apresentamos neste trabalho uma revisão sobre a megasporogênese e a embriologia em *Citrus* e demonstramos, por meios citológicos, a existência de um novo tipo de poliembrionia ainda não descrito para este gênero.

Strassburger (10) foi o primeiro a realizar uma investigação citológica detalhada sobre o gênero *Citrus*; ele não só descreveu o fenômeno da micro e megasporogênese, fertilização e formação do endosperma, como também explicou a origem dos embriões adventícios ("sporophytic polyembryony"), primeiramente descobertos por Leeuwenhoek, em 1719. Trabalhando com *Poncirus trifoliata* e as variedades "Unshiu" (*C. nobilis* Lour.) e "Washington Navel" (*C. sinensis* Osbeck), Osawa (6) chegou às mesmas conclusões de Strassburger com relação à formação dos embriões adventícios, que foram demonstrados como sendo originários de células nucelares circunvizinhas ao saco embrionário.

Frost (4, 5) encontrou, entre 1200 híbridos, 10 casos em que dois "seedlings" híbridos aparentemente idênticos provinham de uma mesma semente; para explicar a origem de tais gêmeos propôs a hipótese da "poliembrionia por clivagem". Casos semelhantes foram encontrados por Traub e Robinson (14); de 782 sementes de um cruzamento entre limão (*C. limon* (Linn.) Burm.) e *Poncirus trifoliata*, 16 produziram dois "seedlings" híbridos, uma produziu três e, uma outra, quatro híbridos; os autores afirmam que híbridos gêmeos foram também encontrados por Swingle, em 1909.

(\*) Tradução do original publicado em "The Botanical Gazette" 105 (2) : 221-225. 1943.

(\*\*) O presente trabalho constitui o terceiro da série referente às investigações sobre *Citrus*, efetuadas, em colaboração, pelo Instituto Agrônomo e a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

A poliembrionia em *Citrus* e gêneros afins (*Poncirus* e *Fortunella*) tem sido também investigada, sob diversos aspectos (9, 12, 13, 15, 16 e 17), e uma revisão do assunto foi apresentada por J. M. Webber (18). Até a presente data, somente dois tipos de poliembrionia eram conhecidos neste grupo de gêneros — nucelar e por clivagem — este último causado pela suposta bipartição do embrião sexual.

**Material e métodos.** O material foi colhido na Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônômico, de árvores representativas de duas espécies: pomelo (grapefruit) Foster (*C. paradisi* Macf.) e laranja azêda (*C. aurantium* L.).

Para o estudo da megasporogênese, foram colhidos ovários de botões em diferentes estados de desenvolvimento e de flores recentemente abertas; para as outras observações foram colhidos, de tempo a tempo, ovários de flores emasculadas nas vésperas da antese e polinizadas artificialmente 4 dias após a castração.

A fixação dos ovários, que eram dissecados para a melhor penetração do líquido fixador, foi feita com "Craf" (7); depois de 24 horas, o material era lavado em álcool a 70%, desidratado pelo método do álcool butílico e incluído em parafina. As secções foram feitas com uma espessura de 10-25 micra e coloridas em hematoxilina de "Heidenhain".

## OBSERVAÇÕES

**Megasporogênese.** A célula-mãe dos megasporos dá origem a uma tétrade linear, da qual os três megasporos micropilares degeneram e o chalazal se desenvolve, dando formação ao megagametófito normal (figs. 1-6). Não existem diferenças entre as duas espécies estudadas, cujos megagametófitos se apresentam com os seguintes caraterísticos: 1) duas sinérgidas bem desenvolvidas e colocadas nas proximidades da micrópila; 2) a oosfera localizada entre as sinérgidas, um pouco mais distante da micrópila; dada a semelhança com as primeiras, as suas inclusões citoplasmáticas constituem o principal ponto de diferenciação entre as mesmas; 3) dois núcleos polares, situados mais ou menos no centro do megagametófito, os quais geralmente permanecem separados até a fertilização, podendo, no entanto, fundir-se um pouco mais cedo; 4) as três antípodas, bem menores do que as sinérgidas, que podem ser mais facilmente observadas em megagametófitos recentemente formados, em vista da sua duração geralmente efêmera.

Em regra geral, a primeira divisão meiótica ocorre quando o óvulo ainda não se encontra completamente desenvolvido (fig. 1); a formação

do megagametófito é completada no dia da abertura das flores (fig. 6) ou um pouco antes. No mesmo ovário são encontrados, comumente, megasporocitos e megagametófitos em diferentes estados de desenvolvimento.

**Fertilização.** Strassburger (10) e Osawa (6) afirmaram que a fertilização ocorre geralmente 4 semanas após a polinização. Observamos, entretanto, no pomelo Foster, que o período entre a polinização e a fertilização é, em média, de quatro dias. Êste fato vem em apóio às conclusões de Coit (3), de que "o tempo exigido para a completa fertilização após a polinização varia com as variedades: de trinta horas na laranja "Satsuma" para quatro semanas no *Poncirus trifoliata*".

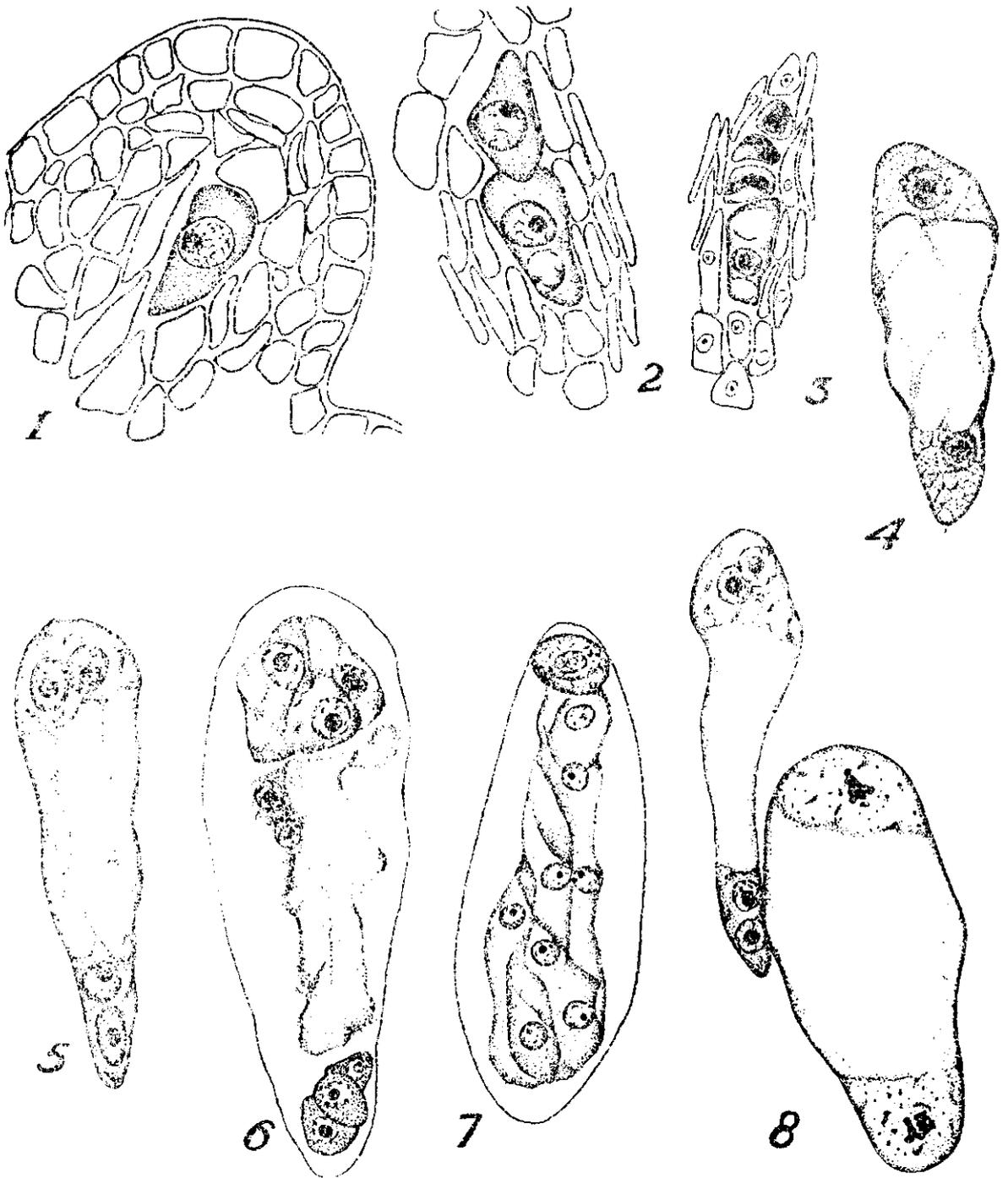
O tubo polínico entra no megagametófito através da micrópila, desorganizando, comumente, uma das sinérgidas; algumas vezes, ambas desaparecem nessa ocasião, e em raros casos, as duas permanecem intactas.

As sinérgidas ou antípodas, que ainda persistam no megagametófito após a fertilização, degeneram mais ou menos rapidamente, enquanto que a célula-ovo inicia um período de repouso relativamente longo, de mais ou menos 50 dias. Osawa (6) observou, em *Poncirus trifoliata*, um repouso de 3 a 4 semanas.

O núcleo primário do endosperma, formado pela fusão dos núcleos polares com um dos núcleos reprodutivos do tubo polínico, sofre uma série de divisões sucessivas, logo após a sua formação; os núcleos resultantes dessas divisões permanecem esparsos pelo citoplasma, sem formação de paredes celulares. Origina-se, assim, um endosperma nuclear (figs. 7 e 11).

Nos ovários mais idosos (com 67 dias após a polinização), por nós examinados, foram observados mais de 1500 núcleos, que ainda permaneciam livres no citoplasma; não chegamos, portanto, a examinar os posteriores estados de desenvolvimento do endosperma, onde se devem realizar as formações de paredes celulares e as subseqüentes divisões celulares, já constatadas por Osawa (6) e Strassburger (10).

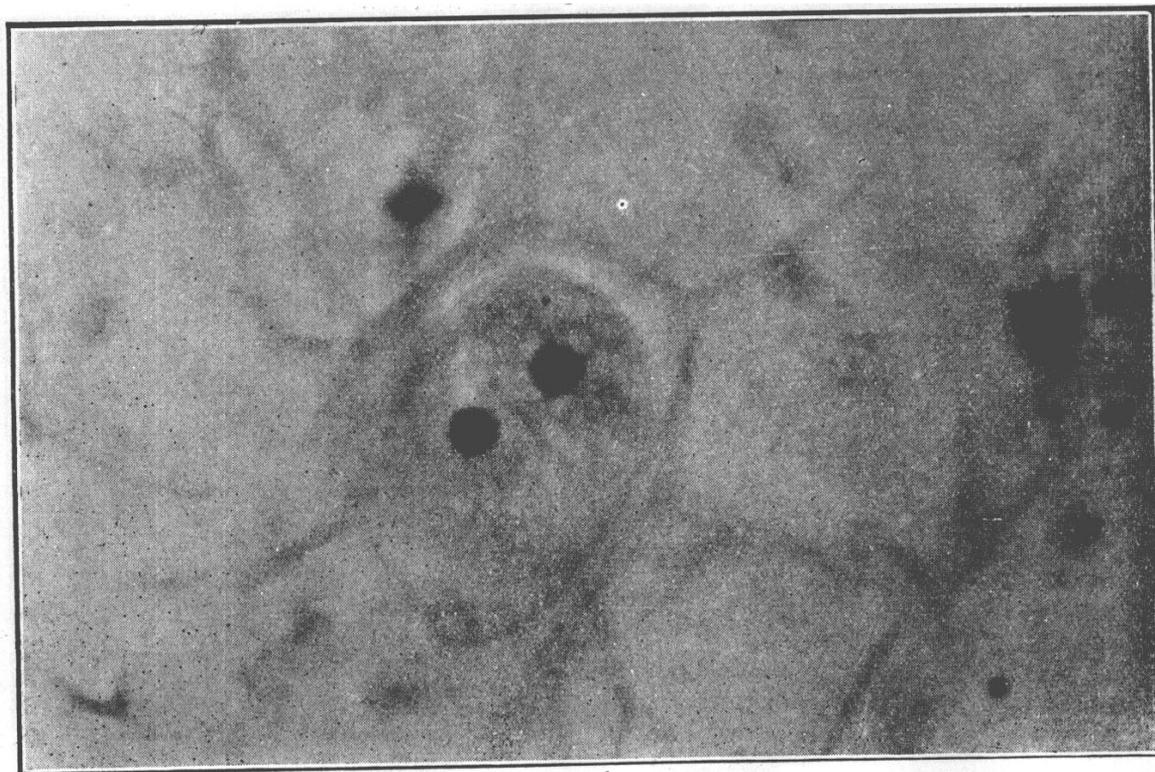
**Poliembrionia.** Quando as primeiras divisões do zigote ocorrem para formar o embrião sexual, diversas células nucelares (fig. 10), circunvizinhas ao saco embrionário e geralmente próximas à micrópila, já iniciaram, através de uma série de divisões, a formação dos embriões adventícios (figs. 10-12). Ainda não completamente desenvolvidos, êstes embriões já se acham localizados na cavidade do saco embrionário. Tal processo, já detalhadamente descrito por Strassburger (10), Osawa (6) e outros, foi observado em ambas as variedades estudadas.



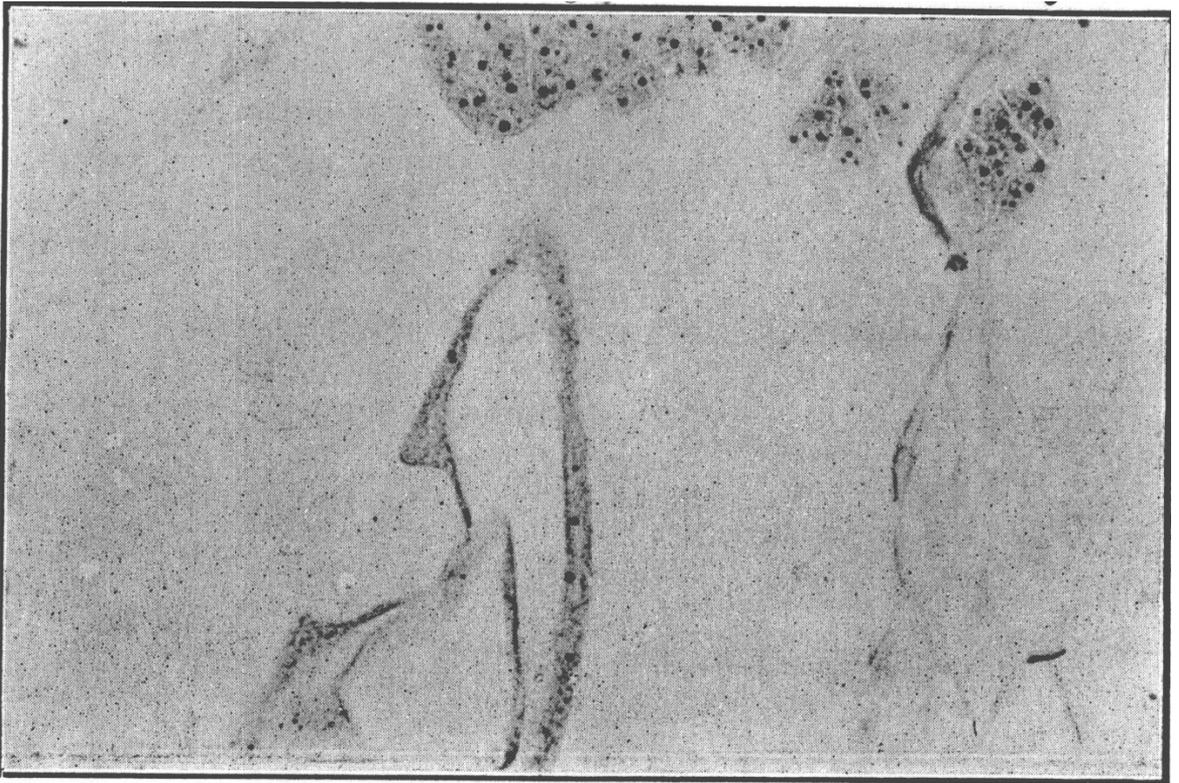
**Figs. 1-8** — Fig. 1, pomelo Foster : megasporocito em prófase ; ovário de botão pequeno. Fig. 2, pomelo Foster : dois megasporos ; ovário de botão pequeno. Fig. 3, laranja azêda : quatro megasporos, três dos quais em degenerescência ; ovário de botão grande. Fig. 4, pomelo Foster : megagametófito com dois núcleos ; ovário de botão grande. Fig. 5, pomelo Foster : megagametófito tetra-nucleado ; ovário de botão grande. Fig. 6, pomelo Foster : megagametófito completo ; ovário no dia da abertura da flor. Fig. 7, pomelo Foster : célula-ovo no período de repouso e endosperma com 8 núcleos ; ovário com 15 dias após a polinização. Fig. 8, pomelo Foster : desenho à câmara clara da fig. 9, incluindo observações feitas em secções adjacentes. Figs. 1-6, 8, x 1000 ; fig. 7, x 500.



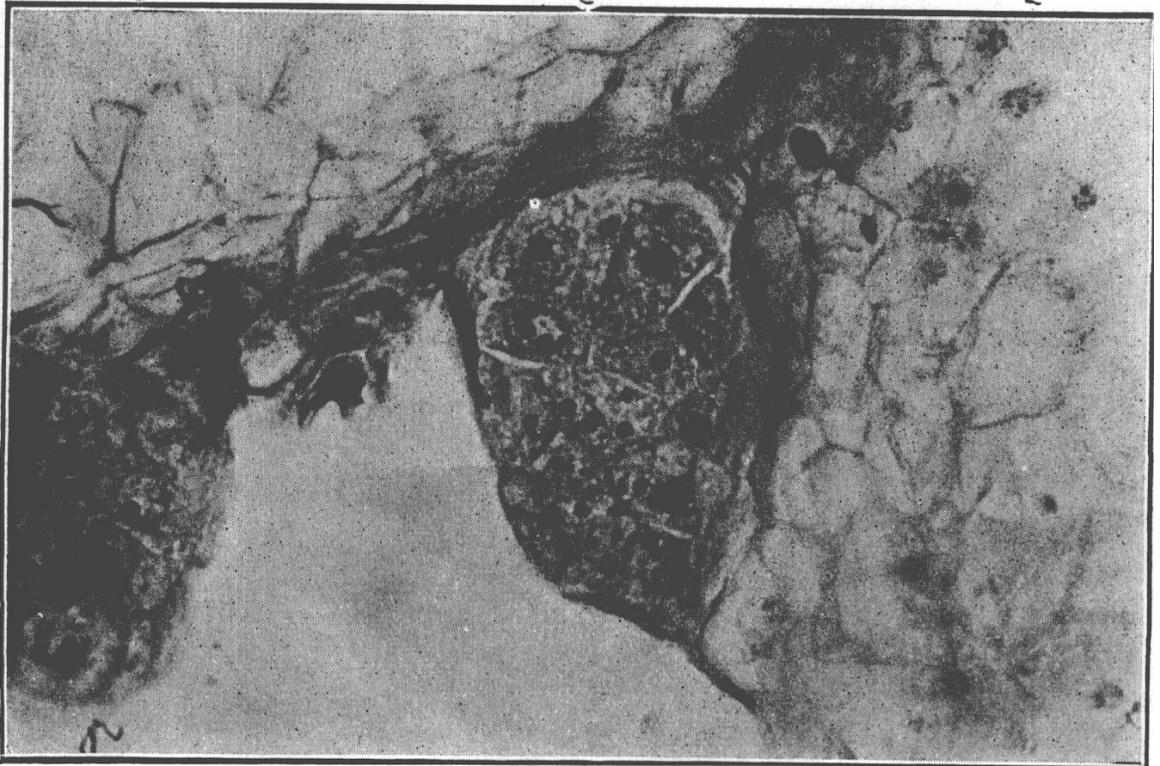
**Fig. 9** — Pomelo Foster: desenvolvimento de dois megagametófitos no mesmo óvulo; ovário no dia da abertura da flor (x 700).



**Fig. 10** — Pomelo Foster: célula nucelar após a primeira divisão para a formação de um embrião adventício; ovário com 67 dias após a polinização (x 1400).



**Fig. 11** — Pomelo Foster: embriões nucelares e núcleos do endosperma; ovário com 67 dias após a polinização (x 350).



**Fig. 12** — Pomelo Foster: detalhe de um embrião nucelar em desenvolvimento; ovário com 67 dias após a polinização (x 700).

Num grande número de óvulos examinados, foram encontrados quatro casos de dois gametófitos desenvolverem-se no mesmo óvulo; a fertilização de suas células-ovo poderia, portanto, ter dado origem ao desenvolvimento de dois embriões sexuais na mesma semente. Diferentes estados de desenvolvimento, de tais gametófitos extras, estão representados nas figuras 8 e 9.

A ocorrência de dois gametófitos, no mesmo óvulo, já foi descrita em diversos outros gêneros: *Hiptage* (11), *Medicago* (8), *Poa* (1) e *Saxifraga* (2). Em *Citrus*, com exceção dos gêmeos híbridos idênticos de Frost (4, 5), não se sabe se os outros grupos de híbridos derivados de uma única semente, como os obtidos por Traub e Robinson (14) e por Swingle, em 1909, são geneticamente idênticos.

Para estabelecer uma hipótese, com relação à origem de gêmeos híbridos, é primeiramente necessário determinar se eles são geneticamente idênticos; se não forem, a ocorrência de dois gametófitos no mesmo óvulo constitui a melhor explicação. Dada a grande improbabilidade da ocorrência de mais de dois gametófitos no mesmo óvulo, o aparecimento de mais de dois "seedlings" híbridos, em uma mesma semente, pode ser atribuído tanto à clivagem, sòzinha, como à combinação deste fenômeno com a existência de dois gametófitos no mesmo óvulo.

## SUMÁRIO

É apresentada uma revisão geral da megasporogênese, fertilização, formação do endosperma e poliembrião em *Citrus*, tendo sido confirmada, pelas observações nas espécies *C. paradisi* Macf. e *C. aurantium* L., a maioria das conclusões feitas por Strassburger (10) e Osawa (6).

É descrita uma nova forma de poliembrião causada pela existência, em alguns casos, de dois gametófitos num mesmo óvulo; explica-se, deste modo, a origem de dois híbridos não idênticos em uma mesma semente.

Três formas de poliembrião são, portanto, conhecidas em *Citrus*: a) a poliembrião nucelar, dando origem a um número variável de "seedlings" "maternais" idênticos e derivados do nucelo; 2) a poliembrião por clivagem (4, 5), originada pela suposta bipartição do embrião sexual; e 3) a poliembrião causada pela ocorrência de mais de um gametófito normal no mesmo óvulo.

O endosperma em *Citrus* pertence ao tipo nuclear.

## S U M M A R Y

1. A general review is presented of megasporogenesis, fertilization, endosperm formation and polyembryony in *Citrus*, most of the findings of Strassburger (10) and Osawa (6) having been confirmed through investigation of *C. paradisi* Macf. and *C. aurantium* L.

2. A new form of polyembryony is presented, caused by the existence in some instances of two gametophytes in the same ovule. The origin of two non-identical hybrids from the same seed is thus explained.

3. Three forms of polyembryony are therefore known in *Citrus*. (a) nucellar embryony, giving rise to a variable number of identical, "maternal" seedlings derived from the nucellus; (b) cleavage polyembryony (4, 5) originating through fission of the generative embryo; and (c) polyembryony caused by the occurrence of more than one normal gametophyte in the same ovule. The endosperm in *Citrus* is free.

## L I T E R A T U R A C I T A D A

1. **Akerberg, Erik.** Apomictic and sexual seed formation in *Poa pratensis*. *Hereditas* 25 : 359-370. 1939.
2. **Chapman, Marjorie.** The ovule and embryo sac of *Saxifraga virginiana*. *Amer. Jour. Bot.* 20 : 151-158. 1933.
3. **Coit, J. Eliot.** Citriculture. Univ. Calif. Coll. Agr. and Agr. Exp. Sta. Ann. Rept. 105-106. 1913-14.
4. **Frost, H. B.** Polyembryony, heterozygosis and chimeras in *Citrus*. *Hilgardia* 1 : 365-402. 1926.
5. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of *Citrus*. *Current Sci.*, Special Number on Genetics 24-27. 1938.
6. **Osawa, I.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo* 4 : 83-116. 1912.
7. **Randolf, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Technology* 10 : 85-86. 1935.
8. **Reeves, R. C.** Development of the ovule and embryosac of alfafa. *Amer. Jour. Bot.* 17 : 239-246. 1930.
9. **Sokol'skaja, B. P.** On polyembryony in seeds of *Citrus*. *Soviet Subtropics* n. 4 (44) : 66-67. 1938. *Cit. Pla. Breed Abstrac.* 9 : 444. 1939.
10. **Strassburger, E.** Ueber Polyembryonie. *Jenaische Ztschr. fur Naturw.* 12 : 647-667. 1878.
11. **Subra Rao, A. M.** A note on the development of the female gametophyte of some *Malpighiaceæ* and polyembryony in *Hiptage madagascariensis*. *Curr. Sci. (Bangalore)* 6 : 280-282. 1937.
12. **Torres, J. P.** Polyembryony in *Citrus* and study of hybrid seedlings. *Philip. Jour. Agr.* 7 : 37-58. 1936.
13. **Traub, Hamilton P.** Artificial control of nucellar embryony in *Citrus*. *Science* 83 : 165-166. 1936.
14. **Traub, Hamilton P. and T. Ralph Robinson.** Improvement of subtropical fruit crops: *Citrus*. *Yearbook U. S. Dept. Agr.* 794. 1937.
15. **Webber, H. J.** Complications in *Citrus* hybridization caused by polyembryony. *Science* 11 : 308. 1900.
16. **Webber, H. J.** The influence of pollination on the set of fruit in *Citrus*. *Cal. Citrog.* XVI : 304. 1930.
17. **Webber, H. J.** The economic importance of apogamy in *Citrus* and *Mangifera*. *Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.* 28 : 57-61. 1931.
18. **Webber, J. M.** Polyembryony. *Bot. Review* 6 : 575-598. 1940.