

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA AUTO-ESTERILIDADE NO GÊNERO *COFFEA* (1)

CÂNDIDA H. T. MENDES (2)

Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1—INTRODUÇÃO

As observações sobre a auto-esterilidade nas espécies diplóides de café tiveram início nas Índias Holandesas, principalmente em Java, onde alguns lotes contendo grande número de plantas de um mesmo clone de *Coffea canephora* Pierre ex Fröehner (café Robusta) constituíram verdadeiro fracasso quanto à produção. Segundo Ferwerda (4), êste fato, acrescentado de certas observações, tais como o aumento de produção na mesma cultura monoclonal, quando esta era formada por um número pequeno de plantas e quando era intercalada com clones diferentes, a existência de maior frutificação nas fileiras externas dos grandes complexos monoclonais rodeados de outros clones diferentes e o insucesso de autopolinizações artificiais em café Robusta e Libérica, (*Coffea liberica* Hiern), realizadas por diversos pesquisadores, conduziu-o a uma série de experiências para estudar as condições de fecundação nessas espécies. A conclusão foi de que o café Robusta é auto-estéril e que a interesterilidade dos seus clones é relativamente rara. Êste mesmo autor verificou ainda que as espécies *C. liberica* e *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. var. *excelsa* Chevalier (café Excelsa) são também auto-estéreis.

Os estudos citológicos em espécies diplóides de café, realizados por Faber (3) e por Leliveld (5), são bem conhecidos. Segundo Faber (3), tanto a formação do saco embrionário como a do pólen são normais, sendo também normal a germinação do pólen em meios nutritivos. Faber (2) ainda observou nas espécies *C. canephora* (Robusta) e *C. liberica* que o pólen estranho, caindo sobre o estigma de uma flor, caminha muito mais rapidamente do que o pólen da própria flor, realizando a fertilização em cerca de metade do tempo. Com relação a êste assunto, o autor sugere que diferenças ou semelhanças químicas sejam responsáveis por êle, inativando ou excitando o crescimento dos tubos polínicos dentro do estilo, respectivamente nos casos de autopolinização e cruzamento. Leliveld (5), no estudo feito sobre a formação do saco embrionário em diversas espécies e variedades, também concluiu que ela é normal.

(1) Trabalho apresentado na Segunda Semana de Genética, realizada em Piracicaba, de 8 a 12 de janeiro de 1949.

(2) Agradecemos ao Eng. Agr.º Antônio José Teixeira Mendes, chefe da Secção de Citologia, a orientação que nos deu para o presente trabalho.

Uma série de estudos semelhantes começou a ser efetuada pela Secção de Citologia, em 1943, com a finalidade de determinar o grau de auto-esterilidade das espécies diplóides da coleção de cafeeiros do Instituto Agrônomico e as causas principais que a determinam.

Êstes estudos foram iniciados usando-se vários representantes da espécie *C. canephora*. Um grande número de autopolinizações artificiais foi realizado, a fim de se verificar o grau de auto-esterilidade apresentado por êsses cafeeiros. Comprovada a auto-esterilidade dessas plantas, efetuou-se, a seguir, um grande número de cruzamentos entre essas plantas, a fim de se determinarem as combinações compatíveis. Ao mesmo tempo foram feitas observações citológicas relativas à formação do pólen e do saco embrionário e sôbre o comportamento dos tubos polínicos nos casos de autopolinizações artificiais e de polinizações cruzadas. Outras observações ainda foram feitas sôbre as dimensões do pólen, seu poder germinativo e as possibilidades de sua conservação.

Pormenores dessas observações serão dados em trabalhos posteriores, onde serão enumeradas as diversas plantas estudadas, o número de flores utilizadas nas polinizações, o material usado nos estudos citológicos e os dados numéricos obtidos.

Neste trabalho será apresentado apenas um resumo dos estudos feitos sôbre a auto-esterilidade dos representantes da espécie *C. canephora* da coleção de Campinas.

2—PESQUISAS EM *C. CANEPHORA*

2.1—ESTUDOS GENÉTICOS

Apesar do grande número de autopolinizações artificiais realizadas em vinte plantas dessa espécie, não se encontrou nenhuma que produzisse frutos, nem mesmo em percentagem baixa, como relatam Ferwerda (4) e Thomas (7).

Entre as 71 combinações efetuadas, 15 foram do tipo considerado recíproco, isto é, combinações nos dois sentidos entre duas plantas diferentes. Do total das 71 combinações, 36 mostraram-se compatíveis e 35 incompatíveis. Das 15 combinações recíprocas, 6 foram recíprocamente férteis, sendo as demais compatíveis apenas num sentido. Provavelmente isto ocorreu em virtude de alguns cruzamentos terem sido feitos com maior número de flores do que outros, ou realizados um maior número de vêzes. Num trabalho semelhante, Ferwerda (4) encontrou 62 combinações compatíveis entre as 72 que efetuou, sendo que, dos 28 cruzamentos recíprocos, 21 foram recíprocamente férteis.

Além das combinações entre plantas, foi realizado um grande número de "backcrosses", numa tentativa de esclarecer o mecanismo genético da auto-esterilidade, o qual talvez possa ser explicado pela existência de "oppo-

sitional factors", como os descobertos para *Nicotiana* por East e seus colaboradores (1).

Com relação à percentagem de fecundação, isto é, percentagem de sementes formadas em relação ao número inicial de óvulos, podem ser considerados baixos os resultados obtidos nas combinações compatíveis da espécie *C. canephora*: dos 41 cruzamentos frutíferos obtidos, apenas 12 tiveram uma percentagem superior a 30%, enquanto, em cruzamentos entre plantas da variedade *bourbon*, da espécie *C. arabica*, se conseguem percentagens superiores a 50%, atingindo mesmo a 86,3%.

As sementes obtidas dessas combinações compatíveis são normais, sendo desprezível a percentagem das que não possuem embrião. Semeadas em caixas de Petri, não têm germinado bem, devido a ataques de fungos e bactérias, o que ocorreu com grande intensidade, principalmente em 1948.

2.2—ESTUDOS CITOLÓGICOS

2.2.1—MICROSPOROGÊNESE

Pelo exame de células-mãe do pólen nos diversos estágios de seu processo meiótico, não se observou nenhuma anomalia durante o pareamento ou durante a separação dos cromossômios. Os grãos de pólen resultam da separação simultânea dos quatro núcleos telofásicos, com onze cromossômios cada um. Uma percentagem muito pequena (6%) apresenta um número um pouco diferente, geralmente dez ou doze. Nas fases de diaquinese e início de anáfase I foram observados cromossômios com um, dois e três quiasmas.

2.2.2—MACROSPOROGÊNESE

Estudou-se a formação do saco embrionário em flores colhidas em diversas idades, desde a véspera da abertura das flores, até quinze dias após, geralmente com intervalos de um dia. Algumas dessas flores foram emasculadas antes da deiscência das anteras e, em seguida, protegidas com um saco de papel; outras foram apenas protegidas. Em qualquer caso, porém, não houve contaminação por pólen estranho. Examinou-se um número variável de óvulos, nunca menos de cinco e, comumente, quinze ou mais, para cada idade.

Depois de formado, o saco embrionário em *C. canephora* se apresenta, como já foi descrito por Faber (2) e Leliveld (5), com duas sinérgidas e uma oosfera na região micropilar, três antípodas na região chalazal e dois núcleos polares no centro.

Comparando-se com *C. arabica* (6), onde o saco embrionário se acha formado quando da abertura das flores, o processo em *C. canephora* pode ser considerado mais lento, só se encontrando sacos embrionários completos no dia seguinte ao da abertura das flores. Ao contrário do que foi observado por Faber (3), a macrosporogênese se completa independentemente de poli-

nização ; também é independente dela a fusão dos núcleos polares e de seus nucléolos, em contraste com o que foi observado por Mendes (6) em *C. arabica*, onde esta fusão não se realiza quando não há fertilização.

2.2.3—ESTUDO DO PÓLEN

O pólen de *C. canephora* apresenta, geralmente, 92 a 96% de grãos normais, percentagens essas quase iguais à de *C. arabica*, que é de cerca de 98%.

Apesar de normais, os grãos de pólen apresentam uma grande variação no seu tamanho, não só considerando-se plantas diferentes, como uma mesma planta. Esta variação é tão grande que, analisando-se estatisticamente os dados obtidos de medições rigorosas, se chegou à conclusão de que êste caraterístico não serve para a identificação da espécie *C. canephora*, como se esperava.

Para se ter uma idéia do seu poder germinativo e da sua longevidade, foram feitas experiências de germinação em lâminas, com meios artificiais. Dos meios experimentados, o que deu melhores resultados foi o constituído por uma solução de ágar a 0,5% e 10,0% de açúcar de cana. A percentagem de germinação obtida foi sempre baixa, tendo a melhor lâmina, com pólen colhido no mesmo dia da abertura das flores, dado apenas 55,2% de grãos germinados. Em *C. arabica*, nas mesmas condições de melhor meio artificial, encontraram-se 83% de germinação, sendo desconhecidas as causas dessa diferença. Apesar dessa baixa percentagem, os tubos polínicos formados são longos e normais, e em quantidade suficiente para realizar uma boa fertilização, desde que, tendo sido feitas sempre polinizações artificiais, a quantidade de grãos levados a cada estigma foi grande.

Foram realizadas algumas experiências de conservação do pólen colhido no mesmo dia da abertura das flores, combinando as temperaturas ambiente, 0°C e 10°C, com as umidades relativas de 10% e 30%, obtidas com soluções de ácido sulfúrico. Observou-se que o pólen de *C. canephora* sofre oscilações muito grandes e uma queda muito rápida no seu poder germinativo. Êste poder se conserva cerca de quarenta e cinco dias, quando o pólen é guardado a 0°C de temperatura e 10% de umidade relativa. Considerando muito baixa uma percentagem de germinação de 10%, pode-se dizer que êste pólen, mesmo nessas condições de ambiente de conservação, que foram as melhores experimentadas, não dura mais que seis dias.

2.2.4—PENETRAÇÃO DO TUBO POLÍNICO

Examinou-se, ao microscópio, o crescimento dos tubos polínicos somente através do estilo, nos casos de autopolinizações e cruzamentos compatíveis. O exame do estilo de flores autopolinizadas foi feito a intervalos de 7, 12, 24 e 47 horas após a polinização, examinando-se cada vez um mínimo de cinco estilos. O exame dos estilos que receberam pólen estranho, compatível, foi feito 15, 20, 40, 45 e 65 horas depois de polinizados, examinando-se também, para cada caso, um mínimo de cinco estilos.

Nas autopolinizações notou-se que a quantidade de grãos germinados é muito pequena e que os tubos polínicos formados, apesar de normais, são muito curtos, nunca excedendo ao comprimento das papilas estigmáticas.

Nos cruzamentos que foram compatíveis, a quantidade de grãos germinados é muito elevada e os tubos polínicos são encontrados em grande número dentro do estilo. Entretanto, relativamente a *C. arabica*, onde iguais observações foram realizadas, o crescimento dos tubos polínicos, dentro do estilo de *C. canephora*, é mais lento, gastando mais de vinte e quatro horas para alcançar o ovário.

3—DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As pesquisas sobre a auto-esterilidade da espécie *C. canephora*, realizadas no Instituto Agronômico de Campinas, têm demonstrado que todos os exemplares dessa espécie até agora examinados são auto-estéreis, apresentando percentagem de fecundação nula quando autopolinizados artificialmente.

As combinações compatíveis encontradas equivalem a 50% das combinações realizadas, enquanto Ferwerda (4) encontrou 86% em seus trabalhos realizados em Java. Comparando os dados de combinações recíprocas, encontramos apenas 66% compatíveis reciprocamente, enquanto esse mesmo autor encontrou 75%. Pode-se dizer, então, que a interesterilidade dos exemplares de *C. canephora* aqui estudados é mais comum do que em Java, podendo, talvez, isto ser explicado pela maior homogeneidade genética desse material.

Examinando a formação do pólen e do saco embrionário, verificou-se que ambos os processos são normais, e que os sacos embrionários só se acham completos no dia seguinte ao da deiscência das anteras.

A germinação do pólen em meio nutritivo conveniente é relativamente baixa (cerca de 55%), sendo perfeitamente normais os tubos polínicos dos grãos de pólen germinados.

Apesar dessa percentagem baixa de germinação, o pólen usado nas polinizações artificiais foi em quantidade suficiente para promover uma boa fertilização. Daí se deduz que a pequena percentagem de fecundação encontrada, nos cruzamentos compatíveis, e a alta percentagem de cruzamentos incompatíveis não devem ser devidas a anomalias na germinação dos grãos de pólen.

Comparando-se, ao microscópio, a germinação do pólen em estilos, em casos de autopolinizações e cruzamentos compatíveis, observa-se que, enquanto um pólen estranho, compatível, produz tubos polínicos que descem ao longo do estilo, os tubos polínicos formados pelo próprio pólen não atingem mais do que o comprimento das papilas estigmáticas. Deve ser esta, portanto, a explicação da auto-esterilidade verificada nesta espécie.

O mecanismo genético que controla o crescimento dos tubos polínicos ainda não foi estabelecido. Entretanto, pesquisas estão em prosseguimento, no sentido de verificar se se trata de um mecanismo controlado por fatores genéticos, como se encontra no gênero *Nicotiana*.

4—RESUMO

Após fazer a revisão de alguns dos principais trabalhos sôbre a auto-esterilidade no gênero *Coffea* efetuados em Java, foram relatados, de modo resumido, os resultados das pesquisas genéticas e citológicas que estão sendo feitas com os exemplares da espécie *C. canephora* no Instituto Agronômico de Campinas. Êstes estudos têm por finalidade conhecer o grau e as causas da auto-esterilidade dessas plantas.

As autopolinizações realizadas indicaram que êsses cafeeiros são, realmente, auto-estéreis. Dos cruzamentos feitos, cêrca de 50% se mostraram compatíveis.

Tanto a formação do saco embrionário como a do pólen são normais.

Em meio artificial conveniente, o pólen apresenta cêrca de 55% de germinação, o que foi considerado suficiente para promover a fertilização nos cruzamentos feitos.

Foram realizadas observações sôbre o crescimento do tubo polínico em estilos de flores polinizadas com pólen estranho, compatível, e polinizadas com o próprio pólen. Nos cruzamentos compatíveis, o crescimento do tubo polínico é normal. No segundo caso notou-se que, após a germinação, o tubo polínico tem o crescimento paralisado, não ultrapassando a região das papilas estigmáticas. Esta pode ser considerada a explicação da auto-esterilidade nos exemplares de *C. canephora* estudados.

O mecanismo genético que controla o crescimento dos tubos polínicos ainda não pôde ser estabelecido. Entretanto, pesquisas estão em prosseguimento no sentido de se verificar se se trata de um mecanismo genético semelhante ao encontrado no gênero *Nicotiana*.

SUMMARY

This paper presents a review of pertinent literature related to studies of self-sterility in the genus *Coffea* and reports the results of cytological and genetic studies carried out on the species *C. canephora* at the Instituto Agronômico, Campinas, Brasil.

The objctive of the study was to determine the degree and causes of self-sterility in the species *C. canephora*.

In tests involving a large number of self-pollinations in flowers of this species, all were self-sterile and formed no seed.

In tests of cross-pollinations involving *C. canephora* approximately 50 percent were effective in the formation of seed.

Cytological studies showed that the formation of the embryo-sac and pollen grains in *C. canephora* can be considered normal. Likewise a study of the pollen of this species on artificial media under controlled conditions, showed 55 percent germination and this was considered sufficient to bring about fertilization.

In contrast, the cytological investigations of self-pollinated flowers showed that the number of pollen grains that germinated was very small and of those that did germinate, the formed pollen-tube was short and did not extend beyond the stigmatic papillae.

Observations on compatible cross-pollinations on *C. canephora* showed that a large number of pollen grains germinated and that usually there were several pollen-tubes within the style. However, the rate of growth of pollen-tubes in *C. canephora* was found to be much slower than in *C. arabica*.

The present investigation has shown that in flowers of *C. canephora* there is a very high degree of self-sterility and this has been related to poor germination of the pollen grains and subsequent limitation in the development of pollen tubes.

LITERATURA CITADA

1. East, E. M. and A. J. Mangelsdorf. A new interpretation of the heredity behavior of self-sterile plants. *Proc. Nat. Ac. Sc.* **11** : 166-171. 1925.
2. Faber, F. C. von. Een en ander over de Biologie der Koffiebloem. *Teysmania* **21** : 556-577. 1910.
3. Faber, F. C. von. Morphologische-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg, Java.* 2.^o sér. **10** : 57-160. 1912.
4. Ferwerda, F. P. Die Befruchtungsverhältnisse bei den in Niederländisch-Indien angebauten Kaffeearten. *Der Züchter* **8** : 92-102. 1936.
5. Leliveld, J. A. Fruchtsetzung Bij Koffie. *Archiv v.d. Koffiecultuur in Ned. Indie* **12** : 127. 1938.
6. Mendes, A. J. T. Cytological Observations in *Coffea* VI. — Embryo and endosperm development in *C. arabica* L. *Amer. Journ. Bot.* **28** : 784-789. 1941.
7. Thomas, A. S. Types of Robusta Coffee and their Selection in Uganda. *The Trop. Agric. Journ. Ceylon* **89** : 93. 1937.