

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 18

Novembro de 1959

N.º 19

AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *COFFEA DEWEVREI* DE WILD. ET TH. DUR. (*)

DIXIER M. MEDINA e C. H. T. MENDES CONAGIN, engenheiros-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo

RESUMO

Diversas pesquisas foram realizadas com a finalidade de esclarecer as causas da improdutividade de *Coffea Dewevrei*, da qual possuímos em coleção as seguintes variedades: *Abeokuta*, *Dybowski*, *Excelsa* e *Dewevrei*.

Um grande número de auto-polinizações e cruzamentos foi realizado dentro e entre variedades. Com esse trabalho ficou comprovado que as auto-polinizações são absolutamente improdutivas e que só são produtivas as combinações entre certos clones

Das observações citológicas realizadas sobre a formação e desenvolvimento do saco embrionário e sobre o pólen concluiu-se não existir qualquer anormalidade capaz de impedir a fertilização.

Chegou-se à conclusão de que também nesta espécie diplóide existe o fenômeno da incompatibilidade genética, cujo mecanismo ainda não foi estudado.

São apresentados alguns dados sobre a porcentagem de lojas vazias que ocorrem nos frutos desta espécie.

1 — INTRODUÇÃO

O problema da incompatibilidade faz parte de um programa de estudos das espécies diplóides de *Coffea*. No que se refere à espécie *C. canephora* Pierre ex Froehner, os estudos realizados acham-se publicados numa série de trabalhos (5, 6, 7) através dos quais ficou esclarecido que tanto a microsporigênese como o desenvolvimento do saco embrionário é normal; a esterilidade nesta espécie é devida à incompatibilidade genética, estando a produção de frutos na dependência de combinações compatíveis.

No presente trabalho são relatadas as pesquisas efetuadas em outra espécie diplóide, *C. Dewevrei* De Wild. et Th. Dur., realizadas para esclarecer também a incompatibilidade das suas plantas.

(*) Recebido para publicação em 3 de fevereiro de 1959.

A microsporogênese nesta espécie já está estudada (4): o processo é normal, com produção de pólen funcional com $n=11$ cromossomos.

Os resultados apresentados se referem ao trabalho realizado até 1953 e servem de orientação a futuros estudos sobre o mecanismo genético da incompatibilidade nesta espécie.

2 — DESENVOLVIMENTO DO SACO EMBRIONARIO

Para o estudo do desenvolvimento do saco embrionário na espécie *Coffea Deweyi* os ovários foram colhidos em "Craf" e incluídos pelo processo comum do álcool butílico. Na maior parte do material, porém, os óvulos foram retirados do interior do ovário, sob a lupa, e então somente eles foram incluídos, o que facilitou sobremaneira o trabalho, reduzindo muitíssimo o material a ser cortado e examinado. Os ovários e também os óvulos pequenos foram cortados à espessura de 12 micros; em óvulos mais desenvolvidos, as seções foram de 16 micros. Para a coloração usou-se o processo da hematoxilina.

Os estados de desenvolvimento do saco embrionário foram analisados em óvários de três tipos de flôres:

- a) flôres castradas e que não receberam pólen de espécie alguma;
- b) flôres polinizadas com pólen compatível;
- c) flôres livremente polinizadas.

Nos dois primeiros o material foi estudado a partir de 15 dias após a abertura das flôres e a intervalos de, no mínimo, 15 dias entre uma colheita e outra. No terceiro item foi estudado apenas o material com 24 e 26 dias de idade.

a) **Flôres castradas e não polinizadas.** — Dos trinta e dois óvulos examinados provenientes de flôres colhidas 15 dias após a abertura, a maior parte se apresentou em diferentes estágios de degenerescência; na colheita seguinte, isto é, aos 30 dias após a abertura, o número relativo de sacos embrionários em degenerescência adiantada e completamente degenerados aumentou, sendo que aos 60 dias quase todos os óvulos examinados apresentaram o saco embrionário degenerado. Aos 107 dias a degenerescência já havia atingido o próprio tegumento, progredindo da parte interna para a externa (quadro 1).

Pode-se dizer que no material estudado, mesmo não tendo havido fertilização de nenhum dos óvulos, o frutinho pode permanecer preso à planta até 107 dias após a abertura das flôres.

QUADRO 1. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre o desenvolvimento do saco embrionário em flôres castradas e não polinizadas (*)

Dias decorridos após a abertura das flôres	Óvulos examinados	Sacos embrionários não degenerados	Sacos embrionários em degenerescência ou degenerados
n.º	n.º	n.º	n.º
15.....	32	5	27
30.....	33	2	31
45.....	27	-----	27
60.....	24	-----	24
107.....	14	-----	14

(*) Os dados se referem à planta 63, da coleção de Campinas.

b) **Flôres polinizadas com pólen compatível.** — Aos 15 dias após a abertura das flôres, uma parte dos óvulos estava fertilizada, no saco embrionário notava-se a célula-óvo próxima à micrópila e o nucleo primário do endosperma; às vêzes, em lugar dêste, o endosperma se apresentava em desenvolvimento com 5 a 20 núcleos. Foram encontrados sacos embrionários não fertilizados e em degenerescência, bem como dois casos em que não houve formação do saco embrionário (quadro 2).

À medida que o tempo decorre vamos encontrando estados cada vez mais adiantados de desenvolvimento: o endosperma se transforma em celular, cerca de 100 dias após a abertura; da mesma forma, a célula óvo se divide transformando-se em pró-embrião, sendo que aos 142 dias encontramos pró-embriões mais desenvolvidos, multicelulares, com um corpo e um suspensor.

QUADRO 2. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre o desenvolvimento do saco embrionário em flôres polinizadas com pólen compatível (*)

Dias decorridos após a abertura das flôres	Óvulos examinados	S.E. não fertilizado	S.E. em degenerescência, degenerado, ou óvulo em degenerescência	S.E. fertilizado em diversos estados subsequentes de desenvolvimento
n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
15.....	27	7	4	16
30.....	22	-----	5	17
45.....	14	-----	2	12
60.....	11	-----	4	7
107.....	29	-----	6	23
142.....	11	-----	-----	11

(*) Os dados se referem a cruzamentos recíprocos entre as plantas 63 e 975, da coleção de Campinas.

Em tôdas as idades foram encontrados sacos embrionários em degenerescência sendo que aos 142 dias os possíveis óvulos degenerados não foram examinados.

c) **Flôres livremente polinizadas.** — Neste tipo de flôres só material de 24 e 26 dias após a abertura foi estudado. Foi observado que na maior parte dos óvulos os núcleos polares estavam fundidos, sendo que em muitos dêles havia vestígio de tubo polínico. Em um único caso o saco embrionário apresentava o núcleo primário do endosperma. Comparado com o material de 15 dias de cruzamento compatível, os ovários de flôres livremente polinizadas se achavam em atraso (quadro 3).

QUADRO 3. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre o desenvolvimento do saco embrionário em flôres livremente polinizadas (*)

Dias decorridos após a abertura das flôres	Óvulos examinados	ESTADOS DE DESENVOLVIMENTO		
		Núcleos polares fundidos		Sacos embrionários denegerados
		Sem vestígios de tubo polínico	Com vestígios de tubo polínico	
n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
24 -----	8	4	2	2
26 -----	15	6	5	4

(*) Os dados se referem à planta 63, da coleção de Campinas.

3 — ESTUDOS SÔBRE O PÓLEN

Morfologia. — O pólen de *C. Dewevrei* pode ser considerado esférico e apresenta uma exina bem distinta, cujo contôrno mostra três poros.

Medições. — Para avaliar o seu tamanho foram feitas lâminas coloridas por carmin acético e medidos 100 grãos de cada planta. Foram utilizadas 17 plantas para êsse estudo. O diâmetro dos grãos variou entre 19,32 e 35,14 micros, a média sendo 29,44 micros, praticamente igual à de *Coffea canephora*, que é 29,66 micros, mas bastante menor do que a de *C. arabica*, que é 36,79 micros (3).

Longevidade. — Três plantas da espécie *C. Dewevrei* foram utilizadas nas observações sôbre a longevidade do pólen. As flôres, protegidas antes da abertura, foram nesse dia colhidas e trazidas ao laboratório. Uma parte do pólen coletado foi semeada no mesmo dia, outra foi guardada em caixas de Petri contendo CaCl_2 , dentro de um refrigerador cuja temperatura se manteve entre 3 e 5°C. Com êsse pólen guardado foram feitas se-

meações de 7 em 7 dias, até um máximo de 49 dias. Em cada dia de semeadura foram feitas quatro lâminas, contendo cada uma delas um mistura de pólen de 2 ou 3 anteras de duas flôres no mínimo; foram contados 250 grãos em cada lâmina, em campos distribuídos ao acaso, perfazendo um total de 1 000 grãos, no mínimo, para cada planta, em cada ensaio. O meio nutritivo foi sempre o mesmo, isto é, uma solução de ágar a 0,5% com 10% de sacarose.

O pólen de *C. Dewevrei* germina normalmente, emitindo tubos polínicos normais e longos; a porcentagem de germinação no mesmo dia da abertura das flôres foi baixa (quadro 4), mas pela grande quantidade de pólen que cada flor produz, ela é mais do que suficiente para garantir a frutificação da planta. Embora haja vestígios de germinação em pólen conservado durante 42 e 49 dias, pode-se dizer que, nas condições das experiências feitas o pólen de *C. Dewevrei* tem pequena longevidade, pois, depois de sete dias de conservação foi insignificante a sua germinação.

QUADRO 4. — *Coffea Dewevrei*. Germinação de pólen de diferentes idades, em meio artificial

Idade a partir da abertura das flôres	Planta 63		Planta 768		Planta 31	
	grãos contados	germinação	grãos contados	germinação	grãos contados	germinação
dias	n.º	%	n.º	%	n.º	%
0	1017	27,63	1011	19,28	1032	23,64
7	1104	3,62	1133	2,29	1083	4,77
14	1066	0,18	1134	4,48	985	8,02
21	967	3,72	1260	1,41	1126	2,44
28	1455	2,06	1230	3,82	1175	5,10
35	1103	0,90	1024	0,97	1086	3,59
42	1173	0,85	1208	0,66		
49	1104	0,27	1049	0,38		

Penetração do tubo polínico em pistilos. — Estas observações foram feitas tanto em auto-polinizações e cruzamentos incompatíveis, como em cruzamentos compatíveis.

No dia da abertura, as flôres previamente emasculadas e protegidas foram polinizadas, algumas com pólen incompatível e outras com o compatível; os pistilos foram colhidos a certos intervalos de tempo, fixados e coloridos para exame ao microscópio.

Para as lâminas permanentes foi usado o fixador "Craf" e o corante hematoxilina. O pistilo de café é muito longo e se encurva um pouco dentro do fixador; por essa razão não foi possível conseguir cortes longitudinais

contínuos, nos quais fôsse possível acompanhar o tecido condutor ao longo de todo o seu comprimento. Mesmo assim, ótimas lâminas foram obtidas.

Nas preparações temporárias o pistilo era colhido no fixador, depois era seccionado longitudinalmente ao meio e colorido pelo corante próprio.

Foram usadas como fixadores soluções alcoólicas de ácido acético e formalina comercial; e, como corantes, carmin acético,orceina acética, magenta, fucsina ácida e "light green" (1, 2), tendo sido experimentadas diversas combinações de fixador e corante.

As observações foram as seguintes:

- a) nas polinizações incompatíveis e nas autopolinizações havia muitos grãos de pólen sobre o estigma, alguns germinando, mas cujo tubo polínico não ultrapassava as papilas; mesmo em material colhido 24 horas depois de polinizado não foi encontrado nenhum tubo polínico dentro do estilo;
- b) nas polinizações compatíveis os grãos de pólen estavam germinados, com tubos longos, muitos dos quais se achavam à base do estilo.

4 — POLINIZAÇÕES

O trabalho de autopolinizações e cruzamentos em *Coffea Dewevrei*, visando ao conhecimento de clones interférteis, foi realizado tanto entre as suas diversas variedades como dentro delas. É nas variedades *Excelsa* e *Dewevrei* que se concentra o maior número de informações; das variedades *Abeokutae* e *Dybowskii* poucos dados existem.

No que se refere às autopolinizações, elas foram realizadas em nove plantas da variedade *Excelsa*, oito da variedade *Abeokutae*, quatro da variedade *Dybowskii* e seis da variedade *Dewevrei*. Tôdas provaram ser auto-estéreis.

Quanto às polinizações cruzadas, os resultados acham-se reunidos no quadro 5.

5 — OCORRÊNCIA DE LOJAS VAZIAS

Como complemento interessante para melhor conhecimento da espécie *C. Dewevrei*, estudou-se também a ocorrência de lojas vazias; esta foi determinada pela observação em 16 plantas das variedades *Excelsa*, *Abeokutae*, *Dybowskii* e *Dewevrei*; de cada planta foram coletadas ao acaso quatro amostras de 100 frutos provenientes de livre polinização. As observações eram condensadas em ficha especial, conforme o modelo apresentado a seguir.

Os resultados do exame das plantas, feito como nos referimos atrás, são os do quadro 6, no qual apresentamos apenas os dados necessários para o cálculo das porcentagens de lojas vazias.

QUADRO 6. — *Coffea Dewevrei*. Ocorrência de lojas vazias em plantas de diversas variedades da coleção de Campinas (*)

VARIEDADE	N.º da planta	LOJAS DESENVOLVIDAS		
		Total	com perisperma	
		n.º	n.º	%
Excelsa -----	63	730	96	13,2
	765	760	57	7,5
	999	533	15	2,7
	1001	699	51	7,3
Abeokuta -----	772	546	23	4,2
	976	636	8	1,3
	1003	617	23	3,7
	1008	745	36	4,8
Dybowski -----	776	668	119	17,8
	1014	594	38	6,4
	1018	137	36	5,7
	1019	611	21	3,4
Dewevrei -----	755	862	29	3,4
	762	712	59	8,3
	781	582	41	7,0
	1021	715	24	3,4

(*) Para cada planta foram examinadas quatro amostras de 100 frutos.

Existindo a auto-incompatibilidade nessa espécie, era de se esperar uma alta proporção de frutos sem sementes bem como grande porcentagem de lojas vazias, uma vez que as plantas na coleção se acham plantadas sem qualquer seleção de clones.

A freqüência de lojas vazias, entretanto, é baixa; somente em duas das 16 plantas examinadas encontrou-se porcentagem superior a 10.

Observações da mesma natureza, feitas em progênies normais da variedade "Mundo Novo", deram os resultados que se vêem no quadro 7. Se bem que êsses dados não tenham sido obtidos com a finalidade de serem analisados estatisticamente, pode-se dizer que as porcentagens de lojas vazias encontradas na espécie *C. Dewevrei* foram ligeiramente superiores às que se observam normalmente em *C. arabica* var. "Mundo Novo".

6 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O material examinado para o estudo do saco embrionário não permitiu que se observasse o início de seu desenvolvimento e nem o momento exato em que se dá a fertilização. Entretanto, pelo que se observa em idades

QUADRO 7. — *Coffea arabica* var. Mundo Novo. Ocorrência de lojas vazias em plantas de diversas progênes existentes na Estação Experimental de Monte Alegre (*)

PROGÊNES	Frutos	LOJAS DESENVOLVIDAS		
		Total	com perisperma	
	n.º	n.º	n.º	%
CP374-19-15	100	188	1	0,53
CP374-19-17	100	187	2	1,06
CP374-19-20	100	184	6	3,25
CP381-18-4	50	91	2	2,19
CP381-18-12	100	194	8	4,12
CP381-18-16	50	90	3	3,33
CP381-18-18	150	285	17	5,96
CP381-18-20	100	201	6	2,98
CP389-15-1	50	90	1	1,00
CP389-15-7	200	399	8	2,00
CP389-15-8	50	95	3	3,15
CP389-15-9	200	394	6	1,52
CP389-15-10	200	382	9	2,36
CP389-15-11	50	94	2	2,12
CP389-15-12	100	203	9	4,43
CP389-15-14	150	281	15	5,34
CP389-19-1	50	99	1	1,00
CP389-19-6	50	94	1	1,06
CP389-19-7	50	96	1	1,04
CP389-19-8	50	93	3	3,22
CP389-19-10	50	101	0	0,00
CP389-19-11	50	96	1	1,00
CP389-19-14	50	94	4	4,24
CP389-19-15	50	94	2	2,12
CP389-19-20	50	91	2	2,19
CP390-3-5	100	188	1	0,53
CP390-3-7	50	99	10	10,00
CP390-3-9	100	179	6	3,35
CP390-3-16	50	100	11	11,00
CP390-4-1	100	192	12	6,24
CP390-4-8	100	196	13	6,63
CP390-4-12	50	99	2	2,00
CP390-4-17	50	92	3	3,26
CP390-4-19	50	88	0	0,00

(*) Parte dos dados existentes na Seção de Citologia, ainda não publicados.

mais avançadas, pode-se deduzir que êle se forma normalmente, se completa e é fertilizado, pelo seguinte:

- a) em flôres castradas e não polinizadas (quadro 1), tanto nos sacos embrionários em degenerescência como nos que se apresentavam em bom estado, pôde-se verificar que êles haviam completado o seu desenvolvimento;
- b) em flôres provenientes de cruzamento compatível (pl. 63 x 975), os óvulos com 15 dias de idade mostraram sacos embrionários fertilizados e em diferentes estados de desenvolvimento (quadro 2), embora uma parte dos mesmos (11 em 27) não estivesse fertilizada.

Por outro lado, já se sabe que a microsporogênese é normal e que há formação de pólen com $n=11$ cromossomos.

Das observações sobre o pólen verificou-se que em meio artificial sua germinação é baixa e que o mesmo tem pequena longevidade nas condições em que foi conservado. Sobre os pistilos o seu comportamento foi o seguinte: quando em autopolinizações ou polinizações incompatíveis não germinou; entretanto germinou muito bem quando se realizaram polinizações, que depois provaram ser férteis.

Pode-se, então, chegar à conclusão de que a esterilidade na espécie *C. Dewevrei* não é causada por anormalidades citológicas, mas sim, deve se tratar de incompatibilidade genética, que se manifesta na ocasião da germinação do pólen sobre o estigma, à semelhança do que ocorre na espécie *C. canephora* (5).

O mecanismo genético da auto-incompatibilidade ainda precisa ser determinado; para tanto, maior número de clones compatíveis deve ser estabelecido, diversas gerações de híbridos e de "back-crosses" devem ser estudadas. Para facilitar a continuação deste estudo, apresentamos um quadro com as combinações já realizadas, que servirão de ponto de partida para o programa futuro.

Como complemento ao conhecimento de *Coffea Dewevrei* também foram apresentados dados sobre a ocorrência de lojas vazias, que é baixa mas um pouco superior à encontrada em *C. arabica* var. "Mundo Novo".

SELF-INCOMPATIBILITY IN *COFFEA DEWEVREI*

SUMMARY

Pollination studies in *Coffea Dewevrei* De Wild. et Th. Dur. showed that this species is self-sterile. Several varieties of the group are now under investigation to explain such sterility. Only crosses between certain plants are fertile.

Cytological investigation on the pollen and embryo sac development indicated that there is no abnormality that could prevent fertilization. Pollen behaves differently when it is placed on the stigmas of compatible and incompatible plants. Only in the first case does germination occur.

All these facts led to the conclusion that self-sterility in *Coffea Dewevrei* is also of genetic origin, perhaps expressed in the same way as in *C. canephora* Pierre ex Fröhner. The exact mechanism of this incompatibility is not known yet.

The occurrence of empty locules have been recorded in case of several plants of the varieties *Abeokutae*, *Dybowskii*, *Excelsa*, and *Dewevrei*. These results are presented in this paper.

LITERATURA CITADA

1. BUCHHOLZ, G. The dissection, staining and mounting of styles in the study of pollen tubes distribution. St. Techn. 6(1):13-24. 1931.
2. CHANDLER, C. A method for staining pollen tubes within the pistil. St. Techn. 6(1): 25-26. 1931.
3. CONAGIN, C. H. T. M. Medições de pólen das espécies de *Coffea* [em preparo].
4. MEDINA, DIXIER M. Observações citológicas em *Coffea*. XIX-Microsporogênese em *Coffea Dewevrei*. *Bragantia* 12:[153]-162. 1952.
5. MENDES, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. *Bragantia* 9:[35]-41. 1949.
6. ————— Observações citológicas em *Coffea*. XVI - Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10:[97]-104. 1950.
7. ————— Observações citológicas em *Coffea*. XVII-O saco embrionário em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10:[105]-111. 1950.