

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 20

Campinas, julho de 1961

N.º 27

MICROSPOROGÊNESE, INCOMPATIBILIDADE E ESTERILIDADE MASCULINA EM *COFFEA CONGENSIS* FROEHNER (1)

CÂNDIDA H. T. M. CONAGIN, *engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo*

RESUMO

O presente trabalho é um estudo da microsporogênese e do pólen de *Coffea congensis*: um estudo semelhante já foi apresentado sobre *Coffea canephora* e *C. Dewevrei*, como parte de um conjunto de pesquisas para esclarecer a auto-incompatibilidade das espécies diplóides de café.

A microsporogênese é normal, cada microsporócito dando quatro micrósporos normais, com $n=11$ cromossomos. Os grãos de pólen são, em média, maiores do que os de *C. Dewevrei* e de *C. canephora* e menores do que os de *C. arabica*.

Diversos cruzamentos e um grande número de autopolinizações foram efetuados, ficando evidente que a espécie *Coffea congensis* é auto-incompatível.

O comportamento dos grãos de pólen quando postos a germinar em meio artificial ou em polinizações controladas, separa os grupos de plantas de Bangelan e de Uganda bem distintamente; o pólen destas plantas não produz tubo polínico, mas sempre expansões disformes, não apresentando nem 1% de germinação normal.

Foram obtidos híbridos intra e inter-específicos com as plantas do grupo Bangelan usando-as como plantas-mães e como plantas fornecedoras de pólen. As plantas do grupo Uganda, entretanto, só produziram tais híbridos quando usadas como plantas-mães.

Constataram-se, portanto, em *C. congensis*, dois fenômenos: a auto-incompatibilidade e a esterilidade masculina.

1 — INTRODUÇÃO

As espécies diplóides do gênero *Coffea* têm sido objeto de estudo no sentido de ser esclarecida a causa da sua auto-esterilidade. Diversas pesquisas básicas têm sido conduzidas, podendo ser citados os trabalhos de von Faber (4, 5), Leliveld (5), Medina (6, 7, 8) e Mendes (1,

(1) Recebido para publicação em 13 de maio de 1961.

2, 8, 9, 10, 11) sôbre desenvolvimento do saco embrionário, microsporangênese, poder germinativo e longevidade do pólen, e meios nutritivos para a sua germinação.

O presente trabalho descreve, em linhas gerais, a microsporangênese de *Coffea congensis* Froehner, e também o comportamento do pólen quando posto a germinar em meio artificial ou em tecido estigmático.

2 -- MATERIAL E MÉTODO

Na coleção de cafeeiros do Instituto Agronômico, em Campinas, as plantas da espécie *Coffea congensis* se separam em dois grupos quanto à sua origem: «*Congensis* de Uganda» e «*Congensis* de Bangelan».

A microsporangênese foi estudada nas plantas n.º 794 (*Congensis* de Bangelan) e n.º 749 (*Congensis* de Uganda). Os botões foram colhidos em Carnoy (três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial) e as anteras foram esmagadas em uma gôta de carmim acético férrico. Os desenhos foram feitos com câmara clara, usando-se no microscópio Zeiss n.º 287 742 a objetiva de imersão 90 X e a ocular 10 X.

Os grãos de pólen de 11 plantas (6 de Uganda e 5 de Bangelan) foram coloridos pelo carmim acético e medidos com uma ocular micrométrica 7 X e uma objetiva 40 X, combinadas no microscópio 287 742, tendo cada divisão o valor de 3,023 μ .

A germinação de pólen em meio artificial foi feita em lâminas de agar a 0,5% com 10% de sacarose. Para as plantas 749 e 760 (Uganda) e 794 (Bangelan) foi calculada a porcentagem de germinação examinando-se quatro lâminas de cada planta e contando 250 grãos em cada lâmina. Das outras plantas foi feita apenas uma observação sôbre o tipo da germinação.

3 -- OBSERVAÇÕES

3.1 -- MICROSPOROGENESE

Os cromossomos profásicos apresentam-se bastante longos e emaranhados no início do processo (figura 1-A); em estados mais avançados da prófase aparecem regiões fortemente heteropnóticas além de

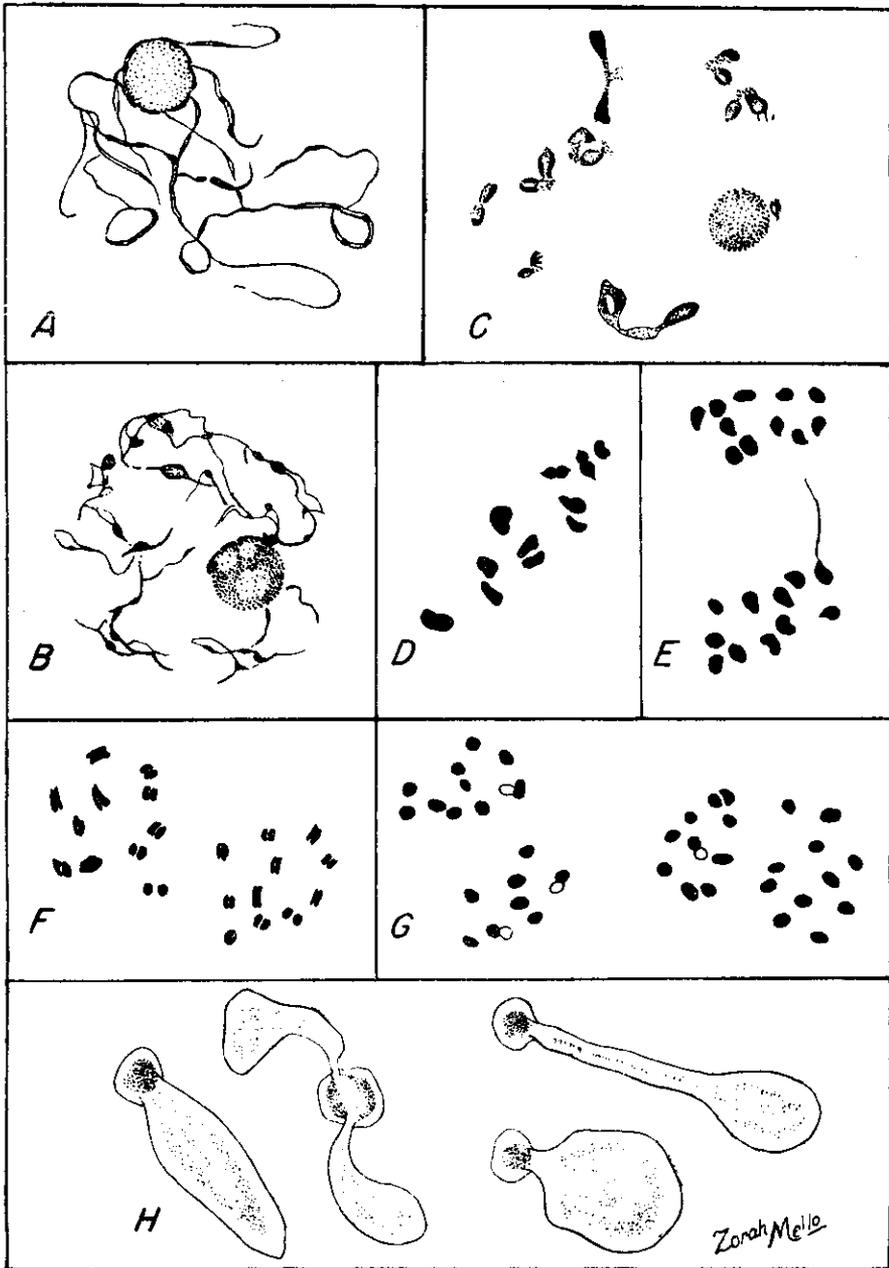


FIGURA 1. — *Coffea congestis* Froehner. A-G — Fases da microsporogênese. A-B — Prófase. C — Diaquinese. D — Metáfase I. E — Anáfase I. F — Metáfase II. G — Telofase II. H — Grão de pólen com germinação anormal.

granulosinhos coloridos que sugerem ser «knobs» (figura 1-B); apenas um nucléolo grande e bem colorido é encontrado em cada núcleo.

Em diaquinese (figura 1-C) contam-se 11 pares de cromossomos, cujos membros se prendem um ao outro por um ou dois quiasmas resultando as configurações em V ou O, conforme o caso; há também um cromossomo com a configuração ∞ sugerindo a existência de 3 quiasmas; o nucléolo se apresenta bem colorido. Em metáfase (figura 1-D) contam-se 11 bivalentes no centro da célula. A separação anafásica também é normal, dando dois núcleos telofásicos com 11 cromossomos (figura 1-E).

A metáfase da segunda divisão é muito rápida, sendo logo seguida da divisão dos cromossomos (figura 1-F) e da sua separação em anáfase II; o resultado final é a separação dos quatro núcleos telofásicos (figura 1-G).

Em alguns casos, entretanto, a separação em anáfase I não foi normal, dando 10 e 12 cromossomos, e em consequência, em telófase II foram encontrados núcleos com 10-10-12-12 cromossomos. Estas divisões anormais são, contudo, em muito baixa porcentagem (6,1%), como pode ser visto no quadro 1.

QUADRO 1. — *Coffea congestis*. Contagem de microsporócitos nos estados de anáfase I e anáfase II, para a observação das porcentagens de divisões normais e anormais

Casos em que foi possível a contagem dos cromossomos	Células em divisão normal	Células em divisão anormal	Total
	n.º	n.º	n.º
Anáfase I	121	0	121
Telófase I	51	9	60
Anáfase II	7	1	8
Telófase II	8	2	10
Total	187	12	199
Porcentagem	93,9	6,1	100,0

De acôrdo com o que ficou exposto, a meiose de *Coffea congestis* estudada em plantas dos dois grupos, de Bangelan e de Uganda, é bastante normal e muito semelhante à meiose de *C. canephora* (10) e de *C. Dewevrei* (6) .

3.2 — PÓLEN

O pólen de *C. congensis* é esférico e mede, em média, 32,04 μ , tendo variado entre 21,6 e 45,30 μ os seus diâmetros extremos; é, portanto, maior que o pólen de *C. Dewevrei* (29,44 μ) e de *C. canephora* (29,66 μ), mas menor do que o de *C. arabica* (36,79 μ). Embora essas medidas não sirvam para caracterizar as espécies, servem para dar uma idéia do tamanho relativo dos seus grãos de pólen (2).

Os grãos de pólen do *Congensis* de Uganda e do *Congensis* de Bangelan não diferem nas dimensões; comportam-se, entretanto, diferentemente quanto à sua germinação.

Nas plantas de Uganda foi observado que o pólen ou não germinava, ou germinava anormalmente: em vez dos grãos emitirem tubos polínicos, formavam-se expansões disformes do citoplasma (figura 1-H). De 15 plantas, apenas duas eram normais neste sentido.

As plantas do Bangelan tiveram, tôdas, um outro comportamento, apresentando: 1) grãos que emitiam tubos polínicos perfeitamente normais e longos; 2) grãos que apresentavam uma expansão na extremidade do tubo; 3) grãos com o citoplasma expandido em formas diversas como no *Congensis* de Uganda. Êstes últimos eram encontrados em porcentagem muito baixa. Os três aspectos descritos eram apresentados simultâneamente pela mesma planta.

Os dados das três plantas, nas quais foi feito um cálculo de porcentagem da germinação, estão reunidos no quadro 2.

QUADRO 2. — *Coffea congensis*. Germinação de grãos de pólen, semeados em meio artificial, no mesmo dia da abertura das flores

Planta	Grãos de pólen			Total n. ^o
	germinação		não germinados	
	normal	anormal		
	%	%	%	
794 (Bang.)	55,67	11,91	32,42	1 015
760 (Ug.)	12,26	70,08	17,66	1 036
749 (Ug.)	0,19	52,52	47,29	1 124

Na planta 794 a porcentagem de grãos de pólen que germinam normalmente (55,67) é mais baixa que em *Coffea arabica* (1), onde se encontra 82,19 a 87,02%; é, entretanto, igual à de *C. canephora*, 55% (9), e mais elevada que em *C. Dewevrei*, onde ela varia de 19,28 a 27,63% (8).

Nas plantas de Uganda a porcentagem de germinação normal é muito baixa, sendo mesmo insignificante na planta 749.

Examinando o comportamento dêsse pólen em autopolinizações e polinizações compatíveis pela técnica de coloração de pistilos, foi possível verificar o seguinte:

Pólen de germinação anormal:

a) quando usado em autopolinizações, produziu as mesmas expansões sôbre os estígmata; muito raramente foram formados tubos polínicos, mas êstes eram tão curtos que não alcançavam o estilo;

b) quando usado em polinização compatível, formavam-se tubos normais, mas de crescimento muito lento e não alcançavam o estilo nem mesmo 30 horas após a polinização.

Pólen de germinação normal:

a) nas autopolinizações o tubo polínico formado se desenvolveu muito devagar, não se encontrando nem um tubo polínico dentro do estilo em material examinado 20 horas após a polinização;

b) nas polinizações compatíveis foram encontrados tubos polínicos dentro do estilo 4 a 6 horas após a polinização e em material colhido 22 horas após havia tubos polínicos na base do estilo.

3.3 — ESTERILIDADE E INCOMPATIBILIDADE

Diversos cruzamentos inter e intra-específicos foram feitos combinando a espécie *Coffea congensis* com as espécies *C. arabica*, *C. Dewevrei* e *C. canephora*:

a) *Congensis* de Bangelan — As plantas dêste grupo provaram ser férteis quando eram empregadas como plantas-mães e como fornecedoras de pólen;

b) *Congensis* de Uganda — Só foram férteis os cruzamentos em que as plantas eram utilizadas como plantas-mães; quando eram utilizadas como fornecedoras de pólen, nunca foi obtido um híbrido sequer.

Os quadros 3 e 4 resumem êstes dados.

Os resultados das hibridações estão em acôrdo com as observações

QUADRO 3. — *Coffea congensis*. Cruzamentos intra e inter-específicos de plantas de Bangelan

Espécies		Identificação das plantas		Híbridos
♀	♂	♀	♂	n.º
<i>Arabica</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	R. P. 13	x 576	0
<i>Canephora</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	37	x 239	8
<i>Laurentii</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	65	x 239	16
<i>Laurentii</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	238	x 239	15
<i>Excelsa</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	63	x 239	0
<i>Excelsa</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	63	x 576	4
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	749	x 794	17
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	749	x 832	?
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	796	x 794	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	796	x 832	4
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Arabica</i>	576	x R. P. 13	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Canephora</i>	576	x 208	1
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Canephora</i>	576	x 570	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Canephora</i>	576	x P64ex2	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Canephora</i>	576	x 748	4
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Kouillou</i>	750	x Pl. 43	15
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Liberica</i>	239	x R. P. 254	9
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	794	x 749	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	794	x 796	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	832	x 749	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	832	x 796	1

QUADRO 4. — *Coffea congensis*. Cruzamentos intra e inter-específicos de plantas de Uganda

Espécies		Identificação das plantas		Híbridos
♀	♂	♀	♂	n.º
<i>Canephora</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	37	x 622	0
<i>Canephora</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	574	x 622	0
<i>Canephora</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	748	x 622	0
<i>Bukobensis</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	451	x 749	0
<i>Excelsa</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	64	x 622	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	794	x 749	0
<i>Cong. Bang.</i>	x <i>Cong. Ug.</i>	794	x 796	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. arabica</i>	622	x R. P. 13	1
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	622	x 37	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	622	x 574	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	622	x P64ex1	2
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	623	x 37	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	623	x 570	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. canephora</i>	623	x 570	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Bukobensis</i>	749	x 451	12
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>C. Liberica</i>	622	x R. P. 254	0
<i>Cong. Ug.</i>	x <i>Cong. Bang.</i>	749	x 794	17

microscópicas sobre comportamento do grão de pólen: o pólen das plantas de Bangelan, com cerca de 55% de germinação normal em meio artificial, produziu híbridos inter-específicos com *C. canephora* vars. *typica*, *Laurentii* e *Kouillou*, com *C. liberica* e com *C. Dewevrei* var. *Excelsa* e intra-específicos com o *C. congensis* de Uganda. O pólen das plantas de Uganda, entretanto, não produziu nenhum híbrido, em nenhuma das combinações feitas, fôssem elas inter ou intra-específicas.

4 -- CONCLUSÕES

A auto-incompatibilidade já conhecida em *Coffea canephora* e *C. Dewevrei* foi também constatada em *C. congensis*. As plantas desta espécie, com que trabalhamos, pertencem a dois grupos quanto à sua origem: «de Bangelan» e «de Uganda». O comportamento das do primeiro grupo em nada difere do que já se conhecia naquelas espécies. As plantas do segundo grupo apresentam, porém, nitidamente, um comportamento diferente: são auto-incompatíveis e também estéreis em cruzamento quando fornecedoras de pólen.

É a primeira vez que se encontra, em *Coffea*, o fenômeno da esterilidade masculina.

MICROSPOROGENESIS, INCOMPATIBILITY, AND MALE STERILITY IN *COFFEA CONGENSIS*

SUMMARY

Crossing and selfing tests, as well as studies on microsporogenesis and pollen behavior under natural and artificial conditions were carried out with the diploid species, *Coffea congensis* ($2n=22$).

Microsporogenesis was found to be normal and eleven pairs of chromosomes could be counted at metaphase. Separation in anaphase was regular, two nuclei being formed with eleven chromosomes each; at the end of anaphase II the four microspores also had eleven chromosomes. Abnormal divisions, giving rise to 10- and 11-chromosome nuclei, appeared in only 6.1% of the p.m.c.

Pollen grains (32.04 micra in diameter) were found to be larger than in *Coffea Dewevrei* and *C. canephora*, but smaller than in *C. arabica*.

The representatives of *Coffea congensis* studied belonged to two groups: (1) the Bangelan group that produced viable male and female gametes. Plants of this group, however, were self-incompatible. (2) The Uganda group, composed of plants the pollen of which did not germinate under any conditions, thus mak-

ing the plants of this group male sterile. This phenomenon was not yet known to occur in *Coffea*.

LITERATURA CITADA

1. CONAGIN, C. H. T. MENDES. Germinação de pólen de café em diversos meios nutritivos. [Não publicado].
2. ——— & MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*, Pierre ex Froehner. [Em preparo].
3. FABER, F. C. Een en ander over de Biologie der Koffiebloem. Taysmania 21:556-577. 1910.
4. ——— Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. Ann. Jard. Bot. Buitenzorg (Java) 25. Deuxième Série, 10: 59-160. 1912.
5. LELIVELD, J. A. Fruchtzetting Bij Koffie. Archief v.d. Koffiecultuur in Ned. Indien angehauten Kaffeearten. Der Züchter 8:92-102. 1936.
6. MEDINA, D. M. Observações citológicas em *Coffea*. XIX — Microsporogênese em *Coffea Dewevrei*. Bragantia 12:[153]-162. 1952.
7. ——— 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.
8. MEDINA, D. M. & CONAGIN, C. H. T. M. Auto incompatibilidade em *Coffea Dewevrei* de Wild. et Th. Dur. Bragantia 18:[283]-293. 1959.
9. MENDES, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. Bragantia 9:[35]-41. 1949.
10. ——— Observações citológicas em *Coffea*. XVI. Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia 10:[97]-104. 1950.
11. ——— Observações citológicas em *Coffea*. XVII. O saco embrionário em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia 10:[105]-111. 1950.