

LITERATURA CITADA

1. EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1979. Morphological comparison of second stage juveniles of six populations of *Meloidogyne hapla* by SEM. Journal of Nematology (EE UU) 11(1):5-16
2. EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* males by scanning electron microscopy. Journal of Nematology (EE.UU.) 12(1):23-32.
3. EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* female head structures, perineal patterns, and stylets. Journal of Nematology (EE UU.) 12(40):300-313
4. FRANKLIN, M.I. 1962. Preparation of posterior cuticular patterns of *Meloidogyne* spp. for identification. Nematologica (Holanda) 7:336-337
5. LOPEZ, R.; SALAZAR, L. 1987. Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica. III. Microscopia electrónica de rastreo de *Meloidogyne salasi* y *Tylenchorhynchus annulatus*. Turrialba (C.R.) 37(1):77-83
6. LORDELLO, L.G.E. 1972. Nematode pests of coffee. In Economic Nematology. Ed. by J.M. Webster. New York, Academic Press. P. 268-284.
7. LORDELLO, L.G.E.; ZAMITH, A.P.L. 1960. *Meloidogyne coffeicola* sp.n., a pest of coffee trees in the State of Paraná, Brazil. Revista Brasileira de Biologia (Bra.) 20(4):375-379
8. TAYLOR, D.P.; NETSCHER, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica (Holanda) 20:268-269
9. THORNE, G. 1961. Principles of Nematology. New York, Mc Graw. 553 p.
10. TOIDA, Y.; YAEGASHI, T. 1984. Description of *Meloidogyne suginamiensis* (Nematoda: Meloidogynidae) from mulberry in Japan. Japanese Journal of Nematology (Japón) 14:49-57

Estudo da Microsporogênese e Formação de Sementes de uma Planta Monossômica de Café (*Coffea arabica* L.)¹

E.R. Forni-Martins*, N.D. da Cruz*

Abstract

The hybrid offspring of two normal *Coffea arabica* plants ($2n = 44$ chromosome), type *angustifolia*, one of which was irradiated, was studied. The chromosome number was determined, and microporogenesis, pollen grain viability and fruit formation were examined. The plant was aneuploid (monosomic) with $2n = 43$. Many meiotic irregularities were observed, such as the absence of pairing in segments of some bivalents in some prophase stages; occurrence of monovalents and quadrivalents in prophase I and prometaphase I, and bridges and laggards in anaphase I. In spite of the meiotic irregularities, pollen grain analysis showed a viability of 80%, and the study of fruit formation indicated a high percentage of ovule fertilization. The value of the observation of quadrivalents as for the probable allopolyploid origin of the species is discussed. The occurrence of quadrivalents could be explained by the irradiation of the plant changing the pairing regulation system, or by the absence of one chromosome having one or more genes that inhibit the formation of polyvalents in normal conditions.

Resumo

Foi determinado o número cromossômico e analisada a microsporogênese, a viabilidade de grãos de pólen e formação de frutos de uma planta híbrida de *Coffea arabica*, proveniente de duas plantas normais ($2n = 44$ cromossomos), tipo *angustifolia*, tendo sido a planta mãe submetida a irradiação. A planta estudada é aneuplóide, monossômica, com $2n = 43$ cromossomos. Diversas irregularidades meióticas foram constatadas, como ausência de pareamento em segmentos de alguns bivalentes em certos estádios da prófase I, ocorrência de monovalentes e de tetravalentes em prófase I e pró-metáfase I, além de pontes e de cromossomos retardatários em anáfase I. Apesar das irregularidades, a análise de grãos de pólen mostrou 80% de viabilidade e o estudo da formação de frutos indicou boa porcentagem de fertilização de óvulos. A observação de tetravalentes permitiu discutir hipóteses sobre a origem da espécie através de auto ou de alopoliploidia. Argumentos referentes a essas hipóteses, citados em literatura, são discutidos. A ocorrência de tetravalentes pode ser assim explicada: 1) a irradiação incidente na planta mãe poderia ter alterado o sistema regulador do pareamento; 2) o cromossomo ausente na planta monossômica seria portador de um ou de vários genes que inibem a formação de multivalentes em condições normais.

¹ Recebido para publicação em março 1988
O primeiro autor recebe Bolsa de Pesquisa do CNPq

* Seção de Citologia, Instituto Agrônomo, IAC, C.P. 28, CEP 13020, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é representado por aproximadamente 100 espécies (2). Estas são todas diplóides ($2n = 22$ cromossomos), com exceção da espécie *Coffea arabica* que é tetraplóide ($2n = 44$), sendo também a mais importante economicamente (1). A condição tetraplóide dessa espécie propicia o emprego de plantas aneuplóides em programas de melhoramento genético, pois a falta ou o excesso de cromossomos não acarreta desequilíbrio gênico tão insustentável quanto em indivíduos diplóides (3).

Dentre os aneuplóides, os monossômicos têm sido utilizados na transferência de cromossomos inteiros ou de segmentos cromossômicos de uma variedade para outra, ou de uma espécie para outra (7). Dessa maneira, a análise do comportamento meiótico, assim como a tentativa de identificação do cromossomo que confere a condição monossômica à planta, constituem-se em informações importantes em programas de melhoramento genético.

Plantas monossômicas apresentam diferenças de características fenotípicas em relação às encontradas em plantas com números cromossômicos normais. Estas diferenças estão associadas ao tamanho do cromossomo ausente ou à quantidade de heterocromatina presente no homólogo.

Assim, objetivou-se confirmar um suposto caso de aneuploidia, determinando o número cromossômico, o comportamento desses cromossomos na microsporogênese, a viabilidade de grãos de pólen e a formação de frutos em uma planta com características morfológicas diferentes das tipicamente encontradas em um cafeeiro normal.

MATERIAL E MÉTODOS

A planta estudada (H 5287) pertence à coleção de espécies mantida no Instituto Agronômico (Centro Experimental de Campinas), sendo proveniente do cruzamento de duas plantas normais ($2n = 44$ cromossomos) tipo *angustifolia*. Uma das plantas-mãe originou-se de sementes submetidas a irradiação de 5000R, utilizando-se um aparelho betatron existente na Universidade de São Paulo. A planta H 5287 apresenta um fenótipo diferenciado tanto das plantas dissômicas normais como do próprio tipo *angustifolia* que lhe deu origem, sugerindo ser um aneuplóide.

Botões florais foram coletados e fixados em Carnoy 3:1 (álcool: ácido acético). As lâminas para análise de células mães de pólen em divisão meiótica foram preparadas pela técnica do carmim acético (9), mediante esmagamento de anteras e, a seguir, obser-

vadas em microscópio fotônico. Foram analisadas cerca de 50 células em microsporogênese, sendo feitos desenhos esquemáticos e tiradas algumas fotomicrografias.

Também foram preparadas lâminas para estudos da viabilidade de grãos de pólen, empregando-se a técnica do carmim acético (9), ligeiramente modificada. A determinação da viabilidade foi feita em dois anos agrícolas diferentes, amostrando-se cerca de 5 000 grãos de pólen.

A análise da formação de sementes foi feita mediante cortes transversais em frutos verdes na mesma fase de desenvolvimento, anotando-se o número de lojas com embrião em cada um deles.

RESULTADOS

Constatou-se realmente que a planta em estudo é aneuplóide do tipo monossômica, tendo $2n = 43$ cromossomos.

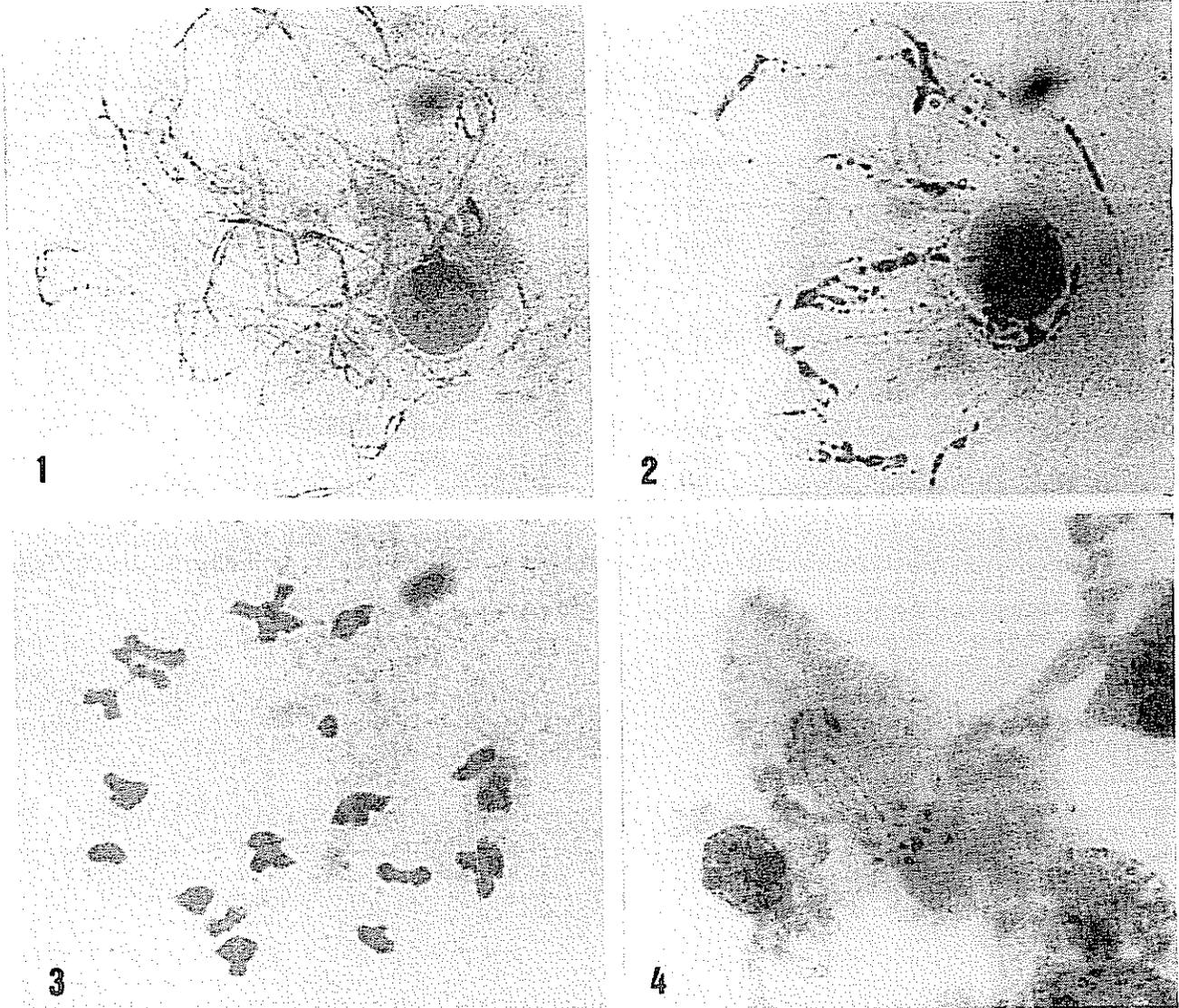
As principais observações no comportamento meiótico foram: 1) ocorrência de monovalentes, na maioria dos casos com formação de $21_{II} + 1_I$, nas fases de diacinese e pró-metáfase I; 2) ausência de pareamento em segmentos de alguns bivalentes, na fase de paquíteno (Fig. 1); 3) formação de alguns tetravalentes, na fase de paquíteno, diacinese e pró-metáfase I. As Figs. 2 e 3 mostram, respectivamente, tetravalentes nas fases de paquíteno e metáfase I. 4) ocorrência de pontes e de cromossomos retardatários em anáfase I (Fig. 4).

A análise da viabilidade de grãos de pólen evidenciou resultados semelhantes nos dois anos agrícolas analisados, encontrando-se apenas 20% de grãos vazios.

O estudo de frutos mostrou boa porcentagem de fertilização de óvulos. Dentre 200 frutos examinados, 111 eram do tipo "chato", apresentando desenvolvimento normal de duas lojas, com formação de uma semente em cada uma delas. O Quadro I mostra os tipos de frutos analisados e seus respectivos conteúdos nas lojas.

DISCUSSÃO

Conforme suspeitava-se pela análise do fenótipo da planta H 5287, confirmou-se a condição monossômica da mesma. A ocorrência de monovalentes, tetravalentes, pontes e de cromossomos retardatários durante a microsporogênese sugere uma segregação cromossômica desigual para os micrósporos resultantes,



Figs 1-4 Aspectos da microsporogênese no híbrido H 5287 de *Coffea arabica* 1 – Paquíteno com regiões de bivalentes não pareadas, x 1432; 2 – Diplótenu com formação de tetravalentes, x 1833; 3 – Pró-metáfase I mostrando tetravalentes, bivalentes e monovalente, x 2291; 4 – Anáfase I com cromossomos retardatários e pontes de cromatina, x 916

consequência de possível troca de pequenos segmentos (inversões ou translocações), porém a análise da viabilidade de grãos de pólen mostrou índices que podem ser considerados relativamente normais (80%) Essa aparente normalidade pode ser explicada pelo fato de a falta de um cromossomo em plantas poliplóides como é o caso de *C. arabica* ser menos drástica que em indivíduos diplóides embora diferentes graus de irregularidades possam ser associadas à falta específica de um determinado tipo de cromossomo no genoma normal (3)

A monossomia da planta H 5287 também parece afetar pouco a megasporogênese e a megagameto-

gênese, a se deduzir pela análise de frutos em desenvolvimento (Quadro 1), porém estudos feitos por Cruz (3) em plantas normais e em outras plantas monossômicas de café, distribuídas em oito diferentes classes fenotípicas, mostraram que, de acordo com o cromossomo ausente no genoma, os resultados foram bastante variáveis. Assim, a porcentagem de frutos tipo "chato", com desenvolvimento normal de dois endospermas variou de 15.0 a 73.0% e, para o caso do desenvolvimento de um endosperma e de um perisperma a variação foi de 1.0 até 15.0%. de acordo com os diferentes aneuplóides analisados Para os frutos tipo "moca", com desenvolvimento de apenas um endosperma, os valores variaram de 19 até 68%

Quadro 1. Tipos de frutos encontrados numa planta monossômica de *Coffea arabica* (H 5287).

Tipo de fruto	Conteúdo nas lojas	Frutos analisados	
		Número	%
"moca"	1 endosperma	52	26.0
	1 perisperma	2	1.0
"chato"	2 endospermas	111	55.5
	1 endosperma + 1 perisperma	24	12.0
"de 3"	2 perispermas	10	5.0
	3 endospermas	1	0.5

Ainda se comparados os resultados de Cruz (3) para sete plantas de café de fenótipo e comportamento meiótico normais com os do presente estudo, confirma-se que a monossomia parece ter afetado pouco o processo reprodutivo da planta H 5287, pois foram obtidos valores intermediários ou, ao menos, próximos aos limites de variação das mesmas (Quadro 1). Assim, no trabalho de Cruz (3), a variação na porcentagem de frutos tipo "chato" com dois endospermas foi de 57.0 a 87.0% e para aqueles com um endosperma e um perisperma foi de 2.0 a 13.0%. Para os frutos tipo "moca", com um endosperma, a variação citada para as plantas normais foi de 8.0 a 26.0%.

No presente trabalho, apenas em 18% dos frutos foram observados perisperma (Quadro 1: 1% em frutos "moca" e 17% em frutos "chato") num estágio em que tais estruturas deveriam estar em regressão. Segundo Mendes (10), esse chamado perisperma surge da divisão ativa das células externas do integumento logo no início da formação do embrião e, à medida que o número de células do endosperma aumenta, as células do perisperma são então comprimidas, dando espaço ao novo tecido.

Sybenga (14) apresenta uma revisão sobre possíveis causas de falhas na formação de endosperma em espécies de café, dentre as quais irregularidades mitóticas, com sugestão de correlação entre o defeito e o número de cromossomos do endosperma (Leliveld, 1938 apud 14). Nesses casos de formação de sementes vazias, o integumento é induzido a desenvolver-se o suficiente até formar uma película prateada forte que evita que o endosperma colapse sob a pressão do grão vazio (Ferwerda, 1948 apud 14). Pela descrição, essa película parece corresponder ao chamado perisperma de Mendes (10), donde pode-se inferir uma correlação entre o número de frutos com perisperma e com endosperma mal-formados.

A observação mais interessante na planta H 5287 foi a ocorrência de tetravalente em células em diferen-

tes estágios da microsporogênese, já que dentre os trabalhos realizados no Brasil sobre citogenética de *C. arabica*, apenas bivalentes foram observados (1). Embora Jackson (5) mencione que o pareamento cromossômico não reflita, necessariamente, a homologia entre genomas, a observação de multivalentes tem sido frequentemente associada à origem poliplóide através de autopoliploidia.

Entretanto, a espécie *C. arabica* é tida como aloploplóide, com base em diferentes resultados, como na herança dissômica de híbridos (1), no comportamento meiótico (6) e nos estudos de pigmentos flavonóides (8). Além disso, apesar de já ter sido citada a ocorrência de multivalentes em algumas cultivares, Grassias e Kamacher (4) não chegaram a associá-la a uma provável origem autopoliplóide, sugerindo que a espécie seria aloploplóide, formada por espécie que manteriam alta homologia cromossômica.

A discussão de hipóteses para explicar a origem poliplóide de *C. arabica* torna-se mais complicada ao se considerar que, mesmo em autopoliplóides, se os cromossomos forem pequenos, a formação de tetravalentes pode ser dificultada (13). Além disso, em muitos poliplóides, como o trigo (11, 12), há evidências de genes controlando o pareamento cromossômico, os quais inibiriam a formação de multivalentes não só em auto como em aloploplóides.

A hipótese de inibição de pareamento cromossômico por genes específicos poderia ser também aplicada a *C. arabica*, tanto supondo origem autotetraplóide como aloploplóide, com possível envolvimento de espécies portadores de elevada homeologia cromossômica. Assim, extrapolando o exemplo do trigo para a planta monossômica de *C. arabica* aqui estudada, poder-se-ia supor que a falta de um cromossomo em relação ao complemento cromossômico normal tivesse possibilitado a formação de tetravalentes, mediante algum processo de desinibição genética.

Embora outros diferentes monossômicos de café, fenotipicamente distintos, já tenham sido anteriormente estudados por Cruz (3), a não constatação de irregularidades no pareamento cromossômico dos mesmos parece confirmar que a planta H 5287 difere também em relação ao cromossomo ausente no genoma. Este, especificamente, poderia estar envolvido no controle genético de pareamento cromossômico.

Ainda não se pode ignorar a influência de fontes mutagênicas, como a irradiação, sobre o comportamento de plantas a ela submetida. Assim, devido ao fato de a planta mãe da planta monossômica H 5287,

aqui estudada, ter sido irradiada, não se pode descartar uma possível influência desse evento sobre os resultados obtidos, a começar pelo caráter monossômico até a formação não característica de tetravalentes em *C. arabica*

CONCLUSÕES

A planta H 5287 de *Coffea arabica*, pertencente à coleção de espécies mantida no Centro Experimental de Campinas do Instituto Agrônomo, é aneuplóide, monossômica, com $2n = 43$ cromossomos.

Foram observadas diversas irregularidades meióticas na planta, como ausência de pareamento em seg-

mentos de alguns bivalentes em prófase I, ocorrência de monovalentes e de tetravalentes em prófase I e em pró-metáfase I, além de pontes e de cromossomos retardatários em anáfase I

A viabilidade de grãos de pólen foi igual a 80% e o estudo da formação de frutos mostrou boa taxa de fertilização de óvulos

A observação de tetravalentes, de ocorrência rara em *C. arabica*, pode ser explicada por alterações no controle genético do pareamento cromossômico, talvez devido à irradiação a que foi submetido um dos pais ou pela condição monossômica da planta em estudo

LITERATURA CITADA

- 1 CARVALHO, A.; FERWERDA, F.P.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; MEDINA, D.M.; MENDES, A.J.T.; MONACO, L.C. 1969 Coffee. In Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Ed. by Ferwerda, F.P.; Wit, F. Wageningen, H. Veerman & Zonen N.V. p. 189-241.
- 2 CHARRIER, A. 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascara-coffee*) Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffee*) Paris, ORSTOM 223 p. (Mémoires ORSTOM no 87)
- 3 CRUZ, N.D. 1972 Aneuplóides de café Aspectos morfológicos e citológicos na análise de duas progênies de café "Mundo Novo" (*Coffea arabica* L.) Tese de Doutorado Piracicaba, USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 106 p.
- 4 GRASSIAS, M.; KAMMACHER, P. 1975 Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. Café, Cacao, Thé 19(3):177-189
- 5 JACKSON, R.C. 1982 Polyploidy and diploidy, new perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. American Journal of Botany 69(9):1 512-1 523.
- 6 KAMMACHER, P.; CAPOI, J. Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *Coffea canephora* Café, Cacao, Thé 16(4):289-294.
- 7 KHUSH, G.S. 1973 Cytogenetics of aneuploids. New York, Academic Press 301 p.
- 8 LOPES, C.R.; CUNHA, R.A.; BLOTT, P. 1984. Estudo taxonômico do café (*Coffea arabica* L.) com emprego de métodos numéricos. Turrialba 34(4): 421-430
- 9 MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. 1964 Técnica citológica. Campinas, Instituto Agrônomo 107 p. (Publicação no 2610).
- 10 MENDES, A.J.T. 1941 Cytological observations in coffee. VI Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. American Journal of Botany 28(9):784-789.
- 11 RILEY, R.; CHAPMAN, V. 1958 Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature 182:713-715.
- 12 RILEY, R.; CHAPMAN, V.; KIMBER, G. 1960. Position of the gene determining the diploid-like meiotic behaviour of wheat. Nature 186:259-260
- 13 SRIVASTAV, P.K.; RAINA, S.N. 1982. Cytogenetics of *Clitoria* L. Induced autotetraploidy in *C. ternatea* Cytologia 47:99-107
- 14 SYBENGA, J. 1960. Genética y citología del café. Turrialba 10(3):83-137.
- 15 WHITE, M.J.D. 1973. And evolution. 3.ed. Cambridge. University Press 961 p