

ESTUDO DOS MECANISMOS DETERMINANTES DE GRAUS DE  
AUTOCOMPATIBILIDADE EM Theobroma Cacao

Tese de Grau de Magister Scientiae

Geraldo Adami Carletto



Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA  
Centro Tropical de Ensino e Investigação  
Departamento de Cultivos e Solos Tropicais  
Turrialba, Costa Rica  
Março, 1972

ESTUDOS DOS MECANISMOS DETERMINANTES DE GRAUS  
DE AUTOCOMPATIBILIDADE EM *Theobroma cacao*

Tese

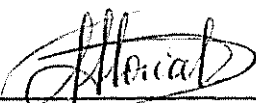

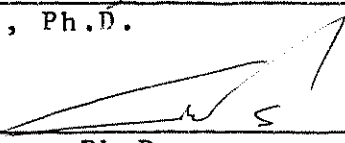
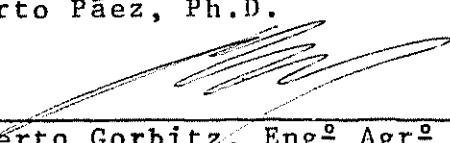
Apresentada ao Conselho da Escola para Graduados  
como Requisito parcial para obter o grau de

*Magister Scientiae*

no

Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas da OEA

APROVADA:

 _____ Jorge Soria, Ph.D.	Conselheiro
 _____ Carl C. Moh, Ph.D.	Comitê
 _____ Gilberto Páez, Ph.D.	Comitê
 _____ Adalberto Gorbitz, Eng <sup>o</sup> Agr <sup>o</sup>	Comitê

Março, 1972

A minha mãe

A meu pai

A meu irmão

AGRADECIMENTO

O autor agradece:

Ao Dr. Jorge Sória V., Conselheiro Principal, pela orientação e estímulo.

Ao Dr. Carl C. Moh, pelos ensinamentos e conselhos proporcionados.

Ao Gilberto Paez e Adalberto Gorbitz, membros do Comitê, pelas sugestões oferecidas.

Ao Eng<sup>o</sup> Juan José Alan pela colaboração prestada.

Ao Dr. José Fargas pela ajuda e facilidades oferecidas.

Ao Dr. Paulo de Tarso Alvim e José Haroldo de Castro Vieira pelo apoio e confiança depositada.

À CEPLAC, por permitir seu afastamento e concessão da bolsa de estudo.

Ao Eng<sup>o</sup> Oscar Esquivel, a Miguel Cerdas, a Edwin Nuñez e Eddy A. Salazar pela cooperação dada.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução do presente trabalho.

## BIOGRAFIA

O autor, de nacionalidade brasileira, nasceu no Estado da Bahia em 3 de agosto de 1941.

Realizou seus estudos secundários no Colégio N. S. da Vitória - Maristas e universitários na Escola Agrônômica de Universidade Federal da Bahia, Estado da Bahia, Brasil.

Em janeiro 1967, iniciou sua vida profissional como agrônomo extensionista na CEPLAC até 1969 quando foi transferido para a Divisão de Genética deste mesmo Orgão.

Ingressou na Escola de Graduados do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas da OEA, em setembro de 1970, finalizando seus estudos em abril de 1972.

## CONTEUDO

	Página
LISTA DE QUADROS E FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Incompatibilidade em Cacaueiro. . . . .	3
2.2 Estudo de Cromossomos . . . . .	5
2.3 Normalidade dos Graos de Polem. . . . .	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Localização da Investigação . . . . .	8
3.2 Descrição do Material . . . . .	8
3.3 Métodos . . . . .	9
3.3.1 Metodologia de Knight e Rogers. . . . .	10
3.3.2 Metodologia de Cope . . . . .	10
3.3.3 Pareamento de Cromossomos . . . . .	12
3.3.4 Normalidade dos grãos de polem. . . . .	13
3.4 Determinação do Tamanho da Amostra. . . . .	13
4. RESULTADOS	
4.1 Determinação de Graus de Autocompatibilidade. . . . .	14
4.1.1 Na base da metodologia de Knight e Rogers. . . . .	14
4.1.2 Na base da metodologia de Cope. . . . .	17
4.1.3 Estudo citológico de pareamento de cromossomos . . . . .	19
4.1.4 Normalidade dos grãos de polem. . . . .	24
5. DISCUSSÃO	
5.1 Graus de Autocompatibilidade. . . . .	28
5.2 Pareamento de Cromossomos . . . . .	30
5.3 Normalidade dos Graos de Polem. . . . .	31
6. CONCLUSÕES	38
7. RESUMO	34
7a. SUMMARY	36
8. LITERATURA CITADA	38
APENDICE	40

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro no.		pagina
1	Resultados de pegamentos: abcissoes (observados), proporção teórica esperada, $X^2$ dos resultados e genótipos	15
2	Resultado do estudo citológico dos clones ICS-1, UF-667 e UF-29 segundo a metodologia de Cope	18
3	Associações de cromossomos em células mães de polem (CMP) em metafase I	22
4	Associações cromossomicas de células mães de polem (CMP) em metafase I de alguns cultivares híbridos	23
5	Números de grãos de polem normais (N), anormais (AN) e percentagem de normais (%N) colorados com Cotton blue	25
6	Número de grãos de polem normais (N), anormais (AN) e percentagem de normais (%N) de alguns cultivares híbridos colorados com Cotton blue	26
 <u>Figura no.</u>		
1	Células mães de polem em metafase	20
2	Células mães de polem em metafase	21

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das atuais plantações de cacau do mundo foram estabelecidas empiricamente e sem preocupação quanto ao que o material poderia oferecer em precocidade, produtividade e resistência à pragas e doenças.

Face a importância econômica que o cultivo representa para as áreas produtoras, as investigações sobre a planta têm evoluído muito na última década em busca de material com melhores características, para substituição das velhas plantações.

A produção desse material melhorado nos diversos Centros de Investigação está baseada em cruzamentos de clones de diferentes origens genéticas onde a maioria dos híbridos produzidos têm pelo menos um pai incompatível.

O fenômeno da existência de incompatibilidades em plantas é muito frequente, porém relativamente pouco estudado em *Theobroma cacao*.

Têm sido demonstrado a ocorrência de cacaueiros autoincompatíveis e autocompatíveis. As reações de incompatibilidade dos primeiros estão condicionadas pela presença de alelos de incompatibilidade com vários graus de dominância nos genótipos das plantas, ao passo que a autocompatibilidade têm seus dois alelos recessivos e sem efeito de infertilidade.

Recentemente Coral (7) sugeriu que entre os clones autocompatíveis existem diferentes graus de autocompatibilidade, possivelmente controlados por mecanismos genéticos. Esta sugestão ainda não foi conferida e o problema se reveste de muita importância do ponto de vista genético e prático.



Do ponto de vista prático, as plantas 100% autocompatíveis deveriam produzir mais frutos do que as que têm autocompatibilidade em menor proporção e as incompatíveis; do ponto de vista genético, permite fornecer informação básica para utilização em programas de melhoramento do cultivo.

É possível também que os graus de infertilidade em algumas autofecundações sejam consequências de anomalias no processo de formação de gametas, problema que também merece ser objeto de estudo, face a importância que têm sobre a produtividade do cacau-eiro.

Diante de tais circunstâncias, se iniciou a presente investigação onde os objetivos são:

1. Testar a proposta de existência de graus de autocompatibilidade em cacau-eiro
2. Determinar se os graus de autocompatibilidade são herda-veis pelos mecanismos de incompatibilidade ou devido a anormalidades nos cromossomas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Incompatibilidade em Cacaueiro

As primeiras observações sôbre a incompatibilidade em cacaueiro estão descritas por Harland (10) em 1925, quando trabalhou em Trinidad.

Coube a Pound (18) em 1931 realizar os primeiros estudos sôbre incompatibilidade em cacaueiro, onde das oito plantas que trabalhou, três não se autofecundavam. Posteriormente verificou (19) em outro experimento que as flôres de árvores incompatíveis tinham também a característica de seu pólem não fecundar outras plantas incompatíveis. Afirmou Pound (20) que o pólem oriundo de plantas autocompatíveis é viável sôbre qualquer estigma, porém quando provém de plantas autoincompatíveis sua viabilidade é restringida aos estigmas de árvores autocompatíveis.

Cheesman (4) trabalhando em Trinidad, classificou as plantas segundo os graus de incompatibilidade em: 1) plantas autocompatíveis - há singamia e produção de frutos quando polinizadas com pólem de outras plantas autocompatíveis; 2) plantas autocompatíveis - podem frutificar quando polinizadas com pólem de plantas autoincompatíveis; 3) plantas autoincompatíveis - frutificam ao serem polinizadas com pólem de outras plantas autoincompatíveis; 4) plantas autoincompatíveis - não frutificam se polinizadas com pólem de plantas autoincompatíveis.

En seus trabalhos, Posnette (17) admite as seguintes hipóteses sôbre a não formação de frutos em plantas incompatíveis:

de incompatibilidade e dois acessórios A/-B/-independentes porém complementários aos gens "S". Funcionalmente os acessórios produziriam um substrato evidenciando a incompatibilidade.

Quando os complementarios estão em forma dominante os alelos atuam em base esporofítica, quando em forma recessiva, tôdas as formas de "S" serão autocompatíveis. No mesmo trabalho (6) propos fórmulas genotípicas de incompatibilidade para a série de cultivares por êle estudado e estabeleceu que os alelos "S" teriam a seguinte ordem de dominância:  $S_a=S_b=S_c>S_d>S_f$ .

Coral (7) em Turrialba fez um estudo comparativo das teorias propostas por Knight e Rogers (13) e Cope (6) e chegou a conclusão de que a incompatibilidade em *Theobroma cacao* estaria mais bem explicada pela teoria dos dois primeiros autores. O mesmo autor (7), tendo em vista os resultados encontrados quando das autofecundações de clones autocompatíveis, propõe a hipótese da existência de clones com diferentes graus de autocompatibilidade. Tal fenômeno poderia ser explicado introduzindo dois pares de gens independentes, X e Z, complementares e modificadores do locus "S" de incompatibilidade.

## 2.2 Estudo de Cromossomos

Em 1948, Carletto (3) trabalhando com *Theobroma leíocarpa* encontrou 20 cromossomos somáticos e os agrupou em cinco classes segundo tamanho e forma. Posteriormente, Muñoz Ortega (14) confirmou este número para cacau e todas as espécies do genero *Theobroma*, trabalhando com pontas de raiz em estado de metafase. O mesmo autor (14) fez preparações permanentes de células mães de palem em

divisão meiotica pelo método de Newton e encontrou resultados parcialmente bons, tendo em vista que não serviram para estudar a morfologia dos cromossomos.

Shimoya (21) em seu trabalho de microsporogenese em cacauero "Catongo" (*Theobroma cacao*), observou que as células mães de polem sofrem divisão heterotípica e homotípica para formação dos grãos de polem. Também observou (21) que a meiose só se verifica em material fixado a noite.

Os estudos citológicos realizados em *Theobroma cacao* por Opeke e Jacob (15) com células geritoras de polem, registra o aparecimento de associações cromossômicas que variavam de dez bivalentes (esperado) até o altamente inesperado com cinco quadrivalentes. Foram registrados também associações intermediárias e alguns monovalentes, reduzindo consideravelmente o grau de fertilidade do cacauero.

Face as irregularidades citológicas encontradas e a segregação complexa, diferente da diploide esperada para o cacauero quando em autofecundação, os autores (15) admitem que o *Theobroma cacao*, seja um tetraploide.

### 2.3 Normalidade dos Grãos de Polem

Vários são os métodos existentes para testar a normalidade do polem quanto a sua fertilidade e sucesso na singamia.

Jacopini (11) trabalhando com fruteira de clima temperado (maçã, pêra, apricô), reporta que o bissulfeto de sódio é um rápido indicador da viabilidade do polem. Em polem fresco encontrou que existe uma correlação positiva entre a coloração que toma o citoplasma do grão de polem e seu poder total de germinação. Assim

os classificou: 1- polens que tomam coloração intensa - alta viabilidade; 2- polens que tomam coloração debil - média viabilidade e 3- polens que não se coloream - inviáveis.

Por outro lado, Ostapenko (16) trabalhando com porem armazenado encontrou que dos três métodos por êle provado, solução de açúcar a 10%, coloração com aceto-carmin e peroxidase, o que melhor resultado apresentou para determinação de viabilidade em plantas frutíferas foi solução de açúcar a 10%.

Varas (24) em seu estudo de conservação de porem de cacau *in vitro* testou as diversas técnicas existentes usando polens em diversos estados. Menciona em seus resultados que existe uma grande variabilidade quanto a prova empregada e a percentagem de polens viáveis.

Além da variação natural existente entre árvores de um mesmo clone e flôres em diferentes posições numa mesma árvore, encontrado também por Vos (25), há também diferenças significativas quanto a percentagem de polens viáveis quando se compara o tratamento com lactofenol-anilina das provas *in vitro* e em vivo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Localização da Investigação

O presente trabalho foi realizado no Centro Tropical de Ensino e Investigação do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas (IICA-CTEI) localizado em Turrialba, Costa Rica, a uma altitude de 600 metros e na Fazenda Experimental de Cacau 'La Lola' do mesmo Instituto, situada na Zona Atlântica de Costa Rica, a 60 metros sôbre o nível do mar.

#### 3.2 Descrição do Material

Todo o material botânico utilizado no trabalho foi descrito por Enriquez e Sória (8) e são constantes da coleção de germoplasma e experimentos do Departamento de Cultivos e Solos do CTEI.

Se usou os clones autocompatíveis ICS-1, UF-667 e UF-29 para determinação dos graus de autocompatibilidade, forma de pareamento de cromossomos na formação dos grãos de pólem e sua normalidade.

Os híbridos entre os clones autocompatíveis anteriormente citados pelos clones autoincompatíveis SCA-6 e IMC-67, serviram para o estudo citológico de pareamento de cromossomos em pólem e normalidade do pólem, uma vez que se buscava comprovar a relação existente entre as reações de compatibilidade e formação de gametas.

ICS-1 Originário de Costa Rica. Tipo genético, híbrido trinitário desconhecido. Os frutos são vermelho intenso quando imaturos, passando a vermelho claro amarelado quando maduros. As sementes são de tamanho médio e de cor rôxa. Autocompatível de fórmula Sff (6). Coral (7) propõe a fórmula genotípica de XxzzSff ou xxZzSff.

- UF-667 Originário de Costa Rica. Tipo genético, híbrido trinitário desconhecido. Os frutos são vermelho claro quando imaturos e vermelho claro amarelado quando maduros. As sementes são rôxas e de tamanho grande. Autocompatível de fórmula  $XXzzSff$  ou  $xxZZSff$  (7).
- UF-29 Originário de Costa Rica. Tipo genético híbrido desconhecido. Os frutos são vêrdes quando imaturos e amarelos quando maduros. É altamente resistente a bulba floral. Autocompatível de fórmula  $Sff^*$ .
- SCA-6 Originário do Equador. Tipo genético, forasteiro amazônico. Quando imaturos, seus frutos são vêrdes e pequenos e quando maduros são amarelos. As sementes são rôxas e de tamanho pequeno. Autoincompatível de fórmula  $AABBS_{b,c}$  (6). Coral propõe a fórmula de  $XXZZS_{2,3}$  (7).
- IMC-67 Originário do Peru. Tipo genético forasteiro amazônico. Frutos imaturos de côr vêrde, sementes rôxas e pequenas e em grande número. Autoincompatível de fórmula  $XXZZS_{4,5}$  (7).

### 3.3 Métodos

Para o estudo dos graus de autocompatibilidade proposto por Coral, se utilizou os métodos de sucesso ou insucesso na singamia de Knight e Rogers (13) e o de fusão ou não fusão de ôvulos proposto por Cope (6).

O estudo de pareamento de cromossomos foi feito segundo a técnica de preparação de aplastado proposta por Johansen (12).

---

\* AREVALO, A., CARLETTO, G. A., OCAMPO, F. Determinación de los genotipos de incompatibilidad o compatibilidad en varios clones de cacao. 1971. Sem publicar.

A determinação da normalidade dos grãos de pólem foi realizada seguindo a técnica sugerida por Bolles-Lee (1).

### 3.3.1 Metodologia de Knight e Rogers

Para a utilização do método de Knight e Rogers foi feito um cruzamento dialélico com os clones ICS-1, UF-667 e UF-29 onde se obteve todo tipo de informação do compartimento dos cultivares quando em autofecundação e cruzas recíprocas.

As polinizações em número de 15, foram feitas no período de julho-agosto, segundo a técnica e acessórios recomendados por Carletto (2) e registrado o número de abscisões e pegamentos depois de 10 dias conforme a recomendação de Coral (7). Considerou-se na análise estatística de segregação as proporções teóricas obtidas das fórmulas genotípicas propostas por Coral para cada clone. Ademais se provou alternativamente outras proporções teóricas de segregação de um par de gens, com a finalidade de comprovar estas segregações. As proporções utilizadas foram: 1:3, 1:1, 3:1 e 4:0 ou seja 25, 50, 75 e 100% de prendimento ou graus de compatibilidade.

### 3.3.2 Metodologia de Cope

Para estudar se os graus de autocompatibilidade têm relação com o fenômeno de fusão e não fusão de óvulos proposto por Cope (6), foram feitas segundo a técnica geral de polinizar 15 autopolinizações para cada um dos cultivares ICS-1, UF-667 e UF-29. As flôres foram coletadas 75 horas depois de polinizadas e fixadas em Craff I por 48-52hs após a eliminação de todas as partes estranhas ao ovário. Os ovários foram previamente lavados em água destilada e em seguida desidratados em uma solução alcoólica (etanol) de 5,



11, 18 e 50%. A desidratação foi completada utilizando uma mistura de álcool etílico, álcool butírico e água, segundo o procedimento indicado por Johansen (12). Todo o material permaneceu aproximadamente de 2-3 horas em cada solução.

Posteriormente procedeu-se a infiltração e molde em parafina, ambas específicas e com ponto de fusão de 57°C.

As montagens para corte em microtomo foram feitas utilizando pequenos blocos de madeira. Os cortes de 15  $\mu$  de espessura foram montados em lâminas e fixados com adesivo Haupt e 2-3 gotas de formalina em solução aquosa para endurecimento.

As lâminas foram mantidas em estufa com temperatura constante de 43°C por um período de 6-7 dias até alcançar seu completo secamento.

A coloração do material foi obtida usando-se o método de Heidenhain's Iron Hematoxylin (12).

Estas preparações foram observadas com auxílio de um microscópio Zeiss com 1250x (imersão) e registrado o número de óvulos funcionados.

Teoricamente e de acordo a Cope, todos os clones autocompatíveis deveriam ter 100% de fusão, por tanto a proporção teórica seria 4 fusões e nenhuma fusão (4:0). Por outro lado, segundo o reportado por Coral (7), em alguns clones autocompatíveis as segregações de fusão e não fusão davam proporções diferentes, o que obrigou considerar as mesmas proporções alternativas usadas no método de Knight e Rogers (13) ou seja 1:3, 1:1, 3:1 e 4:0.

Para estimar os efeitos puros dos tratamentos na análise de  $\chi^2$  utilizou-se a propriedade de aditividade (22 e 23). Calculou-se em valor de  $\chi^2$  total ou de agrupamento de amostras simples ou seja o somatório de valores individuais de cada  $\chi^2$  calculado. O valor de  $\chi^2$  real foi determinado em base a soma geral das observações dos óvulos fusionados e não fusionados. Por diferença destes dois valores de  $\chi^2$  anteriormente calculados, estimou-se um valor de  $\chi^2$  para verificar a homogeneidade da amostra e confiabilidade dos dados.

### 3.3.3 Pareamento de cromossomos

A fim de averiguar se as variações de autocompatibilidade em cacauero eram devidas ao mecanismo genético de herança ou anormalidade no pareamento de cromossomos quando da formação dos grãos de pólen, foram coletados botões florais em tenra idade, aproximadamente 15-20 dias de vida, dos clones ICS-1, UF-667 e UF-29 na coleção de germoplasma em Turrialba e seus híbridos com clones incompatíveis SCA-6 e IMC-67 nos experimentos em La Lola: ICS-1 x SCA-6; ICS-1 x IMC-67; UF-667 x SCA-6; UF-667 x IMC-67; UF-29 x IMC-67.

A coleta do material processou-se entre as 7 am e 1 pm em dias claros e calorosos. O material era imediatamente posto em fluido Carnoy, a 6:3:1 partes, para fixação durante 30-36 horas em refrigeradora.

As observações foram feitas obedecendo a técnica geral para preparação da apilastado, que consiste em colocar as anteras em uma lâmina com colorante (aceto-carmim) e esmagá-las com auxílio de

uma agulha histológica de ponta curva e chata. Após a eliminação dos tecidos das anteras, protege-se a preparação com uma lamínula para observar as CMP com auxílio de um microscópio com 1250x.

#### 3.3.4 Normalidade dos grãos de pólen

Considerando que a normalidade do pólen é função de um processo normal em sua formação, foi feito um estudo rápido sobre o problema para determinar as percentagens de normalidade e anormalidade.

As flôres abertas no mesmo dia dos clones e híbridos foram coletadas em Turrialba e La Lola respectivamente, em dias claros e calorosos. Tódo o material era posto em frascos ou bolsas de polietileno com papel de filtro umedecido e levadas ao laboratório para observação imediata. Com auxílio de uma agulha histológica, o pólen era removido das cinco anteras para uma lâmina contendo uma gôta de Cotton-blue a 0,01% e observada sua normalidade se coloreava de azul.

#### 3.4 Determinação do Tamanho da Amostra

Face a inexistência de dados anteriores de tamanho ótimo de amostra para o estudo de normalidade de grãos de pólen, determinou-se estatisticamente em base aos dados preliminares obtidos dêste trabalho que o número mínimo de amostra a considerar seria de  $n=20$  observações. Utilizou-se a seguinte fórmula (5):  $d=y-u=6$ , onde:  $d$ = diferença de médias entre as populações;  $y$ = média da população mosestreada e  $u$ = média populacional com uma probabilidade de 0,05%.

## 4. RESULTADOS

4.1 Determinação de Graus de Autocompatibilidade4.1.1 Na base da metodologia de Knight e Rogers

Os resultados de pegamentos e abscissões advindos da metodologia de Knight e Rogers são apresentados no Quadro 1. Nêste quadro se incluem também os genótipos de graus de autocompatibilidade conforme propostas por Coral para os clones e seus híbridos, as proporções de fenótipos esperados e observados e o  $\chi^2$  para os dados observados.

No Quadro 1 do apêndice apresentam-se as análises de  $\chi^2$  para testar ajuste dos resultados a varias segregações possíveis.

## CLONES:

ICS-1 Em autofecundação, após transcorrido os 10 dias recomendados, mostrou 13 pegamentos e 2 falhas. Segundo Coral, este clone tem a fórmula xxzz e deveria segregar na proporção de 4:0, dando 100% de pegamento. O  $\chi^2$  deste resultado ajusta-se a proporção de 4:0, muito embora o resultado não defira também significativamente da proporção de segregação de 3:1.

UF-667 O resultado de autofecundação deu 10 pegamentos e 5 falhas. Segundo o genótipo proposto por Coral este clone deveria segregar na proporção de 3:1. A análise de  $\chi^2$  não mostra diferença significativa para esta proporção, tão pouco mostra diferença significativa com as proporções de 1:1 e 4:0, apesar de se ajustar melhor a proporção de 3:1.

Quadro 1. Resultados de pegamentos: abcissões (observaões), proporção teória esperada,  $\chi^2$  dos resultados e genótipos

	ICS-1 xxzz	UF-667 Xxzz ou xxZz	UF-29 Xxzz ou xxZz
ICS-1 xxzz			
Genótipo	xxzz	Xxzz e xxzz	Xxzz e xxzz
Prop. teórica	4:0	1:1	1:1
Prop. observada	13:2	3:12	11:4
$\chi^2$	0,266	4,266**	3,266
UF-667 Xxzz ou xxZz			
Genótipo	Xxzz e xxzz ou xxZz e xxzz	XXzz, Xxzz e xxzz ou xxZZ, xxZz e xxzz	XXzz, Xxzz e xxzz ou xxZZ, xxZz e xxzz
Prop. teórica	1:1	3:1	3:1
Prop. observada	13:2	10:5	11:4
$\chi^2$	8,066**	0,555	0,022
UF-29 Xxzz ou xxZz			
Genótipo	Xxzz e xxzz ou xxZz e xxzz	XXzz, Xxzz e xxzz ou xxZZ, xxZz e xxzz	XXzz, Xxzz e xxzz ou xxZZ, xxZz e xxzz
Prop. teórica	1:1	3:1	3:1
Prop. observada	7:8	8:7	10:5
$\chi^2$	0,066	3,755	0,555

$\chi^2$  tabelado 1 gl 0,05% = 3,84

\*\* Significativo ao nível de 0,05%.

UF-29 A autofecundação do clone UF-29 deu 10 pegamentos e 5 falhas. O teste de  $\chi^2$  não mostrou diferença significativa em relação a proporção teórica esperada de 3:1, o  $\chi^2$  se ajustou também às proporções de 1:1 e 4:0.

HIBRIDOS:

ICS-1 x UF-667

O valor de  $\chi^2$  dos resultados obtidos de três pegamentos e 12 falhas não se ajusta a expectativa da proporção 1:1, segundo a proposta de Coral. O  $\chi^2$  mostra que o cultivar está segregando dentro da proporção teórica de 1:3 ou seja 25% de compatibilidade em cruzamento.

ICS-1 x UF-29

O teste de  $\chi^2$  dos resultados obtidos deste cruzamento indica que não existe diferença significativa entre a proporção esperada de 1:1 e os resultados obtidos. Tão pouco diferem significativamente das proporções de 3:1 e 4:0, apesar de que o segregação se ajusta melhor a proporção de 3:1.

UF-667 x ICS-1

A análise através de teste de  $\chi^2$  dos resultados obtidos de 13 pegamentos e 2 falhas mostram diferenças altamente significativas indicando que não se está cumprindo a segregação teórica esperada de 1:1. Por outro lado não se observa também diferença significativa entre as proporções alternativas de 3:1 e 4:0, embora os indivíduos se ajustem melhor a proporção de 4:0.

UF-667 x UF-29

O teste de  $\chi^2$  dos resultados obtidos de 11 pegamentos e 4 falhas se ajustam a segregação segundo a proposta de Coral de

de 3:1. Mesmo assim, o  $\chi^2$  destes resultados também se ajustam as segregações de 1:1 e 4:0.

UF-29 x ICS-1

Os resultados do teste de  $\chi^2$  deste cruzamento com sete pegamentos e 8 falhas revelam que a segregação dos indivíduos se ajusta melhor a proporção teórica esperada de 1:1. Não há também diferença significativa com a proporção de 1:3.

UF-29 x UF-667

O teste de  $\chi^2$  não detectou diferença significativa entre a proporção teórica esperada de 1:1 e dos resultados obtidos de oito pegamentos e 7 falhas. Também os resultados não mostraram diferenças significativas com as proporções de 3:1 e 4:0.

#### 4.1.2 Na base da metodologia de Cope

No Quadro 2 são apresentados os resultados das observações de fusão do núcleo polar com um dos núcleos do pólem, dos clones UF-667, UF-29 e ICS-1.

Os dados obtidos com os estudos citológicos constantes da metodologia de Cope (6) e analisados através do teste de  $\chi^2$  (Quadro 4, apêndice) revelam que nas autofecundações dos três clones, todos os indivíduos estão segregando na proporção de 25% de óvulos não fusionados, não segregando segundo a proporção esperada de acordo a Cope, com indivíduos apresentando 100% de fusão, ou seja na proporção 4:0.

Em todos os casos estudados, o valor de  $\chi^2$  encontrado para estimar a homogeneidade da amostra não alcançou diferença significativa, demonstrando que existe uniformidade nos dados.

Quadro 2. Resultado do estudo citológico dos clones ICS-1, UF-667, e UF-29 segundo a metodologia de Cope

Ovários estudados	F*	Ó v u l o s		%F
		NF	T	
ICS-1				
1	19	12	31	61,29
2	26	11	37	70,27
3	26	7	33	78,78
4	26	8	34	76,47
5	28	11	39	71,79
6	32	8	40	80,00
7	26	9	35	74,28
8	18	9	27	66,66
UF-667				
1	29	7	36	80,55
2	21	10	31	67,74
3	24	8	32	75,00
4	22	8	30	73,33
5	24	9	33	72,72
6	23	9	32	71,87
7	24	7	31	77,41
8	25	9	34	73,52
9	30	6	36	83,33
UF-29				
1	40	6	46	86,95
2	36	8	44	81,81
3	39	9	48	81,25
4	32	8	40	80,00
5	39	11	50	78,00
6	41	9	50	82,00
7	39	12	51	76,47
8	32	9	41	78,04

\* F = Fusão; NF = não fusão; T = total



#### 4.1.3 Estudo citológico de pareamento de cromossomos

As observações das associações cromossômicas não puderam ser feitas nas sub-fases de profase uma vez que as células mães de polem se coloreavam demasiadamente, dificultando a identificação dos cromossomos. Tentativamente se usou Carnoy em outras proporções que não as usadas por Opeke e Jacob (15) e substituição do ácido acético por ácido propiônico no processo de fixação. Provou-se também uma mistura de ácido propiônico com cloruro férrico e os resultados não foram satisfatórios como fixador. A melhor fixação foi obtida com Carnoy 6:3:1 partes em refrigeradora por 36 horas.

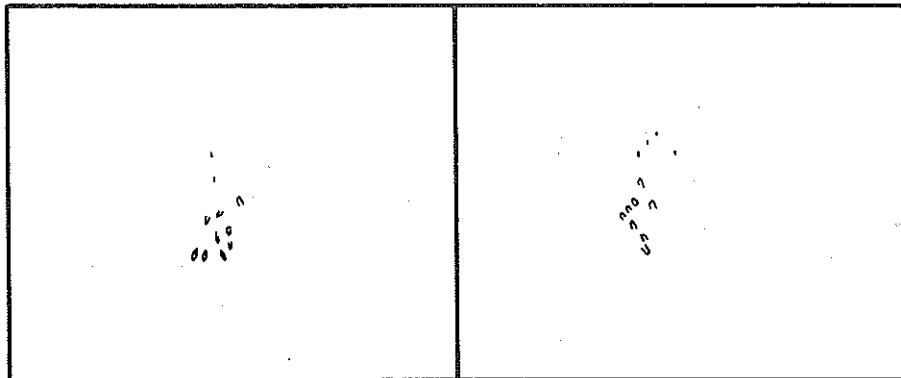
Face as dificuldades encontradas na fixação e o pequeno tamanho dos cromossomos, as observações foram tomadas em metafase I onde as figuras eram mais nítidas. Usou-se uma câmara clara para desenhar os cromossomos e contar seu pareamento.

Nos Quadros 3 e 4 são apresentados os resultados das associações cromossômicas dos clones autocompatíveis ICS-1, UF-667, UF-29 e híbridos desses clones com os cultivares autoincompatíveis SCA-6 e IMC-67.

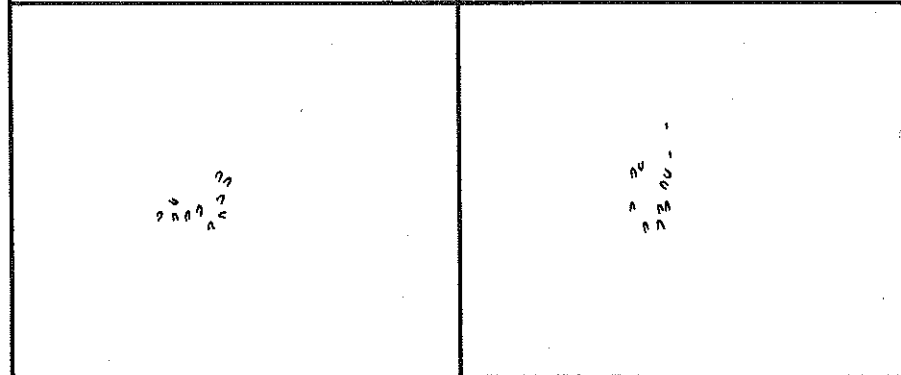
Nas Figuras 1 e 2, são apresentados desenhos de câmara clara mostrando exemplos das associações observadas dos cromossomos nos clones e híbridos estudados.

Pelos resultados apresentados nos Quadros 3 e 4 se pode observar que o pareamento dos cromossomos dos cultivares ICS-1, UF-667 e UF-29 e seus híbridos com clones incompatíveis é desuniforme e irregular.

ICS - 1



UF - 667



UF-29

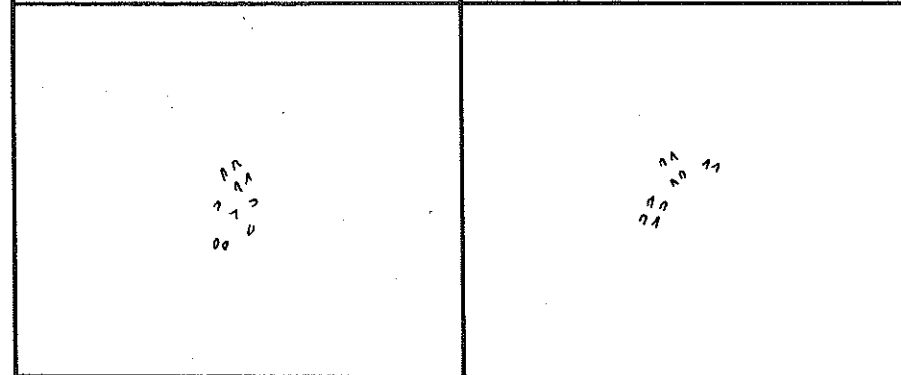
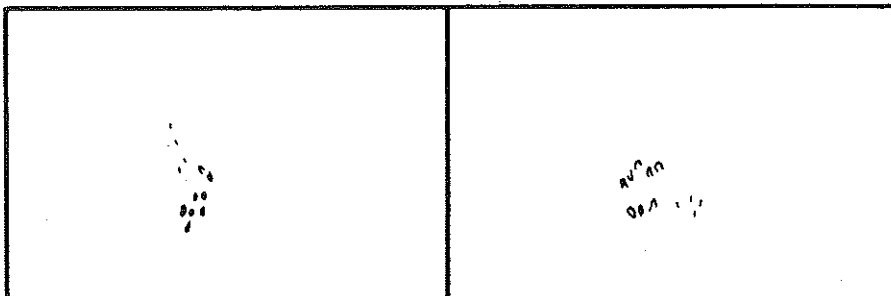
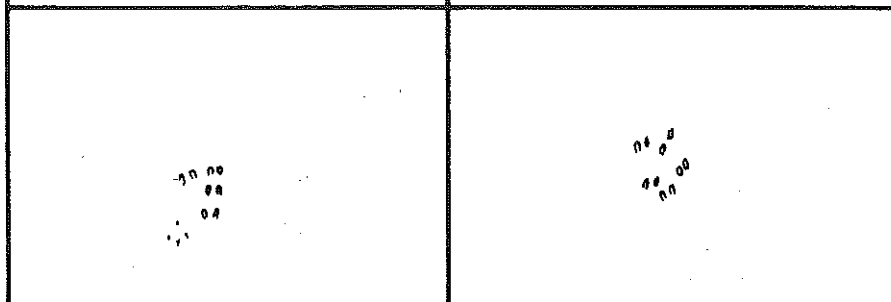


Fig. 1- Células mães de pólen em metafase I.

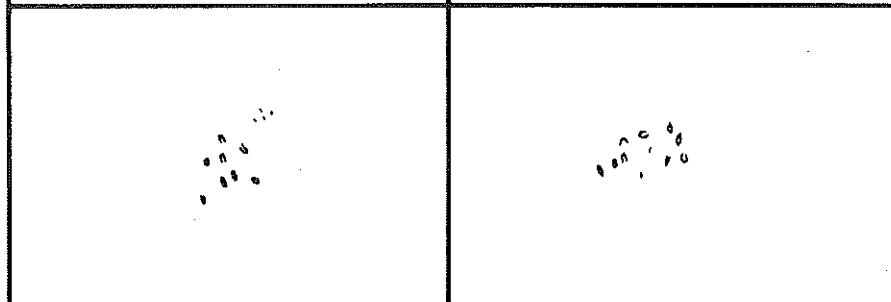
ICS 1 x SCA 6



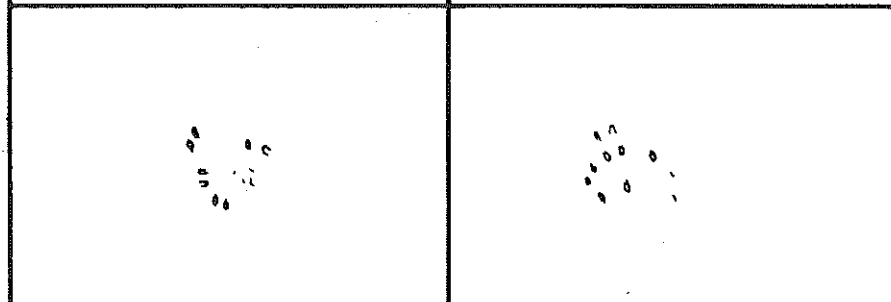
ICS 1 x IMC 67



UF 667 x SCA 6



UF 667 x IMC 67



UF 29 x IMC 67

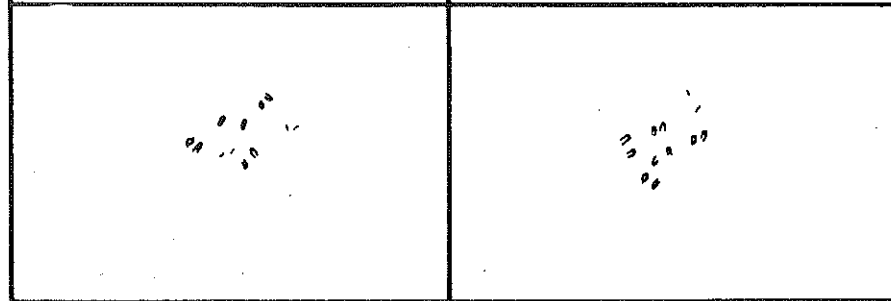


Fig. 2— Células mães de pólen em metafase I.

Quadro 3. Associações de cromossomos em células mães de polem (CMP) em metafase I

Associações CMP	C l o n e								
	ICS-1			UF-667			UF-29		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	0	10	0	0	10	0	2	9	0
2	4	8	0	0	10	0	0	10	0
3	4	5	2	0	10	0	0	7	2
4	2	9	0	0	10	0	4	8	0
5	1	8	1	4	5	2	0	10	0
6	2	9	0	0	10	0	0	10	0
7	4	8	0	0	10	0	0	10	0
8	3	7	1	1	8	1	0	10	0
9	9	4	1	1	8	1	0	10	0
10	1	8	1	0	10	0	2	9	0
11	1	8	1	0	10	0	2	9	0
12	0	10	0	0	10	0	0	10	0
13	2	9	0	0	10	0	0	10	0
14	0	10	0	0	10	0	0	10	0

I = monovalente; II = bivalente; III = trivalente.

Quadro 4. Associações cromossômicas de células mães de polem (CMP), em Metafase I de alguns cultivares híbridos

Associações CMP	ICS-1xIMC-67			ICS-1xSCA-6			UF-667xSCA-6			UF-667xIMC-67			UF-29xIMC-67		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	4	8	0	0	10	0	2	9	0	2	9	0	8	6	0
2	1	8	1	4	8	0	2	9	0	1	8	1	2	9	0
3	2	9	0	0	10	0	4	8	0	4	8	0	0	7	2
4	2	9	0	1	8	1	0	10	0	2	6	2	4	8	0
5	0	10	0	4	8	0	2	9	0	4	8	0	2	9	0
6	0	10	0	3	7	1	0	10	0	2	9	0	2	9	0
7	6	7	0	8	3	2	1	8	1	0	10	0	5	6	1
8	4	8	0	0	10	0	6	7	0	5	6	1	7	5	1
9	7	5	1	3	7	1	0	10	0	2	9	0	5	6	1
10	6	7	0	1	5	3	4	8	0	4	8	0	4	8	0
11	0	10	0	0	10	0	2	9	0	0	10	0	2	9	0
12	0	10	0	4	8	0	3	7	1	4	8	0	4	8	0
13	1	8	1	1	8	1	8	3	2	4	8	0	2	9	0
14	2	9	0	8	3	2	0	10	0	0	10	0	5	6	1

I = monovalente  
 II = bivalente  
 III = trivalente

O clone ICS-1 apresenta baixa frequência de aparecimento de bivalentes, mostrando um maior número de associações monovalentes e trivalentes.

Os clones UF-667 e UF-29 são mais uniformes quanto ao aparecimento de associações bivalentes, mostrando que existe mais homogeneidade no processo de formação dos grãos de pólen, apesar da ocorrência de algumas associações monovalentes e trivalentes.

Nos cultivares híbridos se pode observar uma baixa frequência de associações bivalentes e uma alta frequência de associações mono e trivalentes.

#### 4.1.4 Normalidade dos grãos de pólen

A finalidade principal do estudo era relacionar a frequência de grãos de pólen normais e anormais com os graus de autocompatibilidade e com a frequência de anormalidade de pareamento dos cromossomos tanto nos clones como em seus híbridos.

Eram considerados normais os grãos de pólen que se coloravam intensamente com Cotton blue e estavam dentro de forma típica. Os grãos de pólen que não tomavam coloração se considerava anormais ou abortivos e tinham geralmente forma irregular e tamanho menor que o normal.

Os grãos de pólen foram contados dentro de uma área de 13,50 mm<sup>2</sup>, determinada previamente utilizando um disco micrométrico.

Nos Quadros 5 e 6 estão apresentados os resultados das observações dos grãos de pólen nos clones e híbridos.

As observações dos grãos de pólen dos clones ICS-1, UF-667 e UF-29 deram percentagens médias de normalidade bastantes altas

Quadro 5. Número de grãos de polem normais (N), anormais (AN) e percentagem de normais (%N) colorados com Cotton blue nos clones

No. de observ.	ICS-1		UF-667		UF-29	
	N	AN	N	AN	N	AN
1	43	7	43	0	41	1
2	49	6	34	0	28	0
3	27	8	32	2	43	2
4	56	4	38	0	32	4
5	34	2	28	1	29	4
6	54	3	66	0	46	1
7	47	3	47	0	32	0
8	44	1	37	0	37	1
9	45	7	30	2	38	2
10	72	6	34	0	29	0
11	56	7	34	1	28	3
12	44	8	39	1	42	2
13	92	8	33	0	35	3
14	86	4	42	0	38	0
15	44	2	37	1	32	0
16	56	5	70	2	56	0
17	77	1	46	0	28	0
18	28	6	67	1	44	3
19	31	4	39	0	49	1
20	87	8	43	0	39	0
$\Sigma$ 20	1072	100	839	12	746	27
%N	91,47		98,57		96,50	

Quadro 6. Número de grãos de polem normais (N), anormais (AN) e percentagem de normais (%N) de alguns cultivares híbridos coloreados com Cotton blue

No. de observ.	UF-667x SCA-6		UF-667x IMC-67		ICS-1x IMC-67		ICS-1x SCA-6		UF-29, IMC-67	
	N	AN	N	AN	N	AN	N	AN	N	AN
1	89	2	53	0	33	0	32	0	36	1
2	62	4	63	3	45	0	38	2	83	0
3	45	2	88	0	38	0	39	1	42	0
4	43	1	40	1	49	0	51	0	60	1
5	78	1	44	3	63	1	41	0	39	0
6	94	1	44	2	64	0	32	1	46	0
7	72	1	101	18	49	0	37	4	118	0
8	38	2	81	1	67	0	43	4	51	0
9	41	0	142	3	42	1	32	6	46	0
10	56	1	27	42	34	0	34	6	67	9
11	36	0	44	3	31	5	33	1	63	0
12	74	1	89	0	40	0	43	2	56	0
13	62	0	74	0	39	0	30	1	75	0
14	46	1	27	1	48	0	32	0	60	2
15	36	4	94	7	66	0	37	2	74	8
16	93	4	64	5	38	4	42	1	83	4
17	36	2	99	3	64	0	39	2	60	0
18	37	4	78	1	32	1	56	0	44	3
19	43	1	49	0	41	0	51	1	43	2
20	62	0	101	6	58	3	44	2	58	0
	1143	32	1402	99	941	15	786	36	1204	33
%N	97,27		93,40		98,48		95,62		97,33	



que vão de 91,47% a 98,57%; nos cultivares híbridos, as percentagens foram também altas de 93,40% a 98,48%.

Em tódo o material estudado não se logrou conseguir relação entre as percentagens de associações cromossomicas anormais com as percentagens de anormalidade dos grãos de palem.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Graus de Autocompatibilidade

Os ajustes das provas de  $\chi^2$  as segregações teóricas de pegamento e não pegamento nas autofecundações e cruzamentos dos clones ICS-1 e UF-29, aparentemente indicam que a proposta de Coral (7) tem sua comprovação.

No entretanto surge uma dúvida da existência dos graus de autocompatibilidade sugerida, quando se observa que os valores encontrados para o teste de  $\chi^2$  se ajustam também a outras segregações que não a correspondente a do genótipo proposto. No caso do clone UF-667 que teóricamente deveria dar 75% de autocompatibilidade em autofecundação e 50% em cruzamento com o clone ICS-1, não se observou ajuste a esta expectativa. Pelo fato dos resultados encontrados ajustarem-se a outras proporções, indicam que os genótipos propostos para explicar graus de autocompatibilidade não são corretos.

As observações mencionadas anteriormente conduzem a rechaçar a hipótese da existência de graus de autocompatibilidade e de um possível controle genético, admitindo que os graus de autocompatibilidade observado nos clones sejam controlados por fatores fisiológicos ou morfológicos dos órgãos florais.

Por outro lado é possível que o tamanho da amostra pode estar influenciando nos resultados, uma vez que os valores encontrados para o teste de  $\chi^2$  tomam várias tendências.

Coral (7) trabalhou também com uma amostra pequena, tendo em vista a falta de informação anterior sobre o problema. É

conveniente fazer um estudo sobre o tamanho de amostra que se deve considerar para trabalhos desta natureza, afim de se poder obter resultados mais claros e que permitam tirar conclusões mais acertadas.

Os resultados deste trabalho confirmam a teoria de Knight e Rogers (13) e que a assignação do genótipo de autocompatibilidade Sf.f. para tódos os clones é correto.

Foi usado também o método de Cope (6) com o fim de buscar outra explicação dos possíveis graus de autocompatibilidade em base a mais uma informação proporcionada por Coral (7). Segundo este autor, estava ocorrendo uma grande variação de proporções de fusão e não fusão dos núcleos polares de óvulos com o núcleo generativo do polem dos clones ICS-1 e UF-667, quando analisou as incompatibilidades por este método (6). De acôrdo a Cope, os clones autocompatíveis deveriam dar 100% de fusão. Os resultados das proporções de fusão para os três clones utilizados mostram que nenhum deles apresentam 100% de fusão. Os três clones estão segregando ajustados a proporção de 3:1, ou seja 25% de óvulos não fusionados cujo resultado tão pouco ajuda a explicar qualquer diferença em graus de autocompatibilidade. Encontrou-se também igual valôr de óvulos não fusionados para o clone UF-29.

Os números de fusão e não fusão de óvulos encontrados neste trabalho para os clones autocompatíveis ICS-1 e UF-667 confirmam o reportado por Coral, de que a explicação de 100% de fusão para considerar autocompatível proposta por Cope (6) não se está cumprindo.

## 5.2 Pareamento de Cromossomos

Se considerou que outra possível causa de variação de graus e de autocompatibilidade ou fertilidade do pólem poderia estar relacionada com anormalidades no pareamento de cromossomos na formação de gametas. Os resultados deste trabalho indicam que não ha relação alguma entre estes dois fenômenos. O clone ICS-1 apesar de ter menos associações bivalentes do que as associações monovalentes e trivalentes, foi o que deu maior percentagem de autocompatibilidade em polinizações. As associações bivalentes prevaleceram nos clones UF-667 e UF-29 ainda que os graus de autocompatibilidade apresentados sejam mais baixos.

Quando se estudou o comportamento do pareamento de cromossomos nos cultivares híbridos com um pai incompatível, se observou também uma grande frequência de associações monovalentes e trivalentes em prejuizo das associações bivalentes teóricamente esperadas, apesar do grau de normalidade do pólem ser alto.

Os resultados gerais de pareamento de cromossomos indicam que as associações observadas em metafase na realidade não mostravam o grau de homologia real.

Opeke e Jacob (15) reportaram a existência de associações monovalentes, bivalentes e tetravalentes no cultivar incompatível Na-32, sugerindo a hipótese de que o cacaueteiro fosse um tetraploide e as irregularidades no pareamento de cromossomos seria uma possível causa para explicação do fenômeno de incompatibilidade.

Consideramos como preliminares os resultados do presente estudo de pareamento, uma vez que não foi possível a observação das

associações cromossômicas nas sub-fases (paquíteno e diacnêsis) profásica e sim em metafase I. Isto se deve a que os cromossomos de cacau são muito pequenos e temos encontrado dificuldades na preparação de material para observação.

Segundo os trabalhos de Opeke e Jacob (15) e Shimoya (21), a fixação do material se processava com Carnoy. Seguimos a técnica mencionada e observamos que quando coloreavamos as células mães de palem, além dos cromossomos outras substâncias especialmente mucilagos, tomavam cor. Usamos Carnoy em várias proporções, uma combinação de ácido acético com cloruro férrico e em todas as oportunidades os resultados não foram satisfatórios. Encontramos que o Carnoy na proporção de 6:3:1 em refrigeradora por 36 horas dava uma boa fixação, posto que a coloração do material era a melhor para observação em metafase I.

É aparente a necessidade de se determinar melhores métodos de fixação e coloração para estudar as associações meióticas em cromossomas de cacau.

### 5.3 Normalidade dos Graos de Palem

Em todos os casos estudados se encontrou porcentagens muito altas, superiores a 92% de grãos de palem normais, indicando que não há variação em relação ao caráter entre os cultivares.

Teóricamente poderia-se esperar uma relação entre a frequência de normalidades e anormalidades de pareamento e os graus de fertilidade dos grãos de palem. Os resultados novamente indicam que não há relação entre os dois fenômenos para cada cultivar autocompatível

e para os híbridos com un pai incompatível.

Os valôres encontrados de polens normais podem ser usados para determinar graus de fertilidade em plantas de cacau e não poderia explicar problemas de incompatibilidade.

## 6. CONCLUSÕES

1. Não se encontrou comprovação genética para a proposta de Coral da existência de graus de autocompatibilidade em *T. cacao*.
2. O pareamento anormal de cromossomos não tem relação com os graus de autocompatibilidade e normalidade dos grãos de pólem.
3. A normalidade dos grãos de pólem não explica o fenômeno de graus de autocompatibilidade em cacaueiro.
4. Que o fenômeno de autocompatibilidade é melhor explicado pelo método de Knight e Rogers e não se ajusta ao método proposto por Cope.

## 7. RESUMO

A presente investigação têm como finalidade comprovar a proposta de Coral da existência de graus de autocompatibilidade em cacaueiro, e ao mesmo tempo determinar se o fenômeno está regulado pelos mecanismos genéticos de herança ou devidos a anormalidades cromossomais.

Para estudar os graus de autocompatibilidade, tomou-se como base os métodos de Knight e Rogers de pegamento e abscissões de flôres e o de Cope de fusão e não fusão de óvulos. Ademais disto, foi feito um estudo citológico de pareamento de cromossomos na formação do pólen e sua normalidade para saber seu comportamento em relação a proposição.

Os resultados de pegamentos e abscissões foram conseguidos através de um cruzamento dialélico entre os clones ICS-1, UF-667 e UF-29. A análise estatística através do teste de  $\chi^2$  revelou que as segregações em autofecundações se ajustam a proposta de Coral, porém quando se observou os resultados dos cruzamentos recíprocos não se encontrou em alguns casos, ajuste a expectativa teórica. Além disto, os resultados da maioria das combinações ajustaram-se também a outras segregações. Observou-se ainda que o tamanho da amostra foi pequena e pode estar influenciando nos resultados. De acordo as tendências observadas para os valores de  $\chi^2$ , não se encontrou evidência para a proposta de Coral de graus de autocompatibilidade. Todos os clones estudados são autocompatíveis e esta condição é melhor explicada pelo método de Knight e Rogers e não pelo de Cope.



Quando se analisou os dados de fusão e não fusão de óvulos para testar o funcionamento da teoria de Cope, encontrou-se que os três clones não se ajustavam a expectativa teórica de 100% de fusão e sim, ajustavam-se a proporção de 3:1 ou seja 25% de óvulos não fusionados, resultado que também não oferecem condições para explicar graus de autocompatibilidade.

O estudo sobre pareamento de cromossomos na formação dos grãos de pólen foi feito em metafase I e os dados revelam que existe desuniformidade de pareamento tanto nos clones autocompatíveis como em seus híbridos com um pai incompatível.

Não se encontrou relação entre o pareamento anormal de cromossomos com os graus de autocompatibilidade e normalidade dos grãos de pólen.

## 7a. SUMMARY

The present study was carried out in order to prove Coral's proposal of the existence of degrees of selfcompatibility in cocoa, and at the same time to determine whether this phenomenon is regulated by the genetic mechanism of heredity or due to chromosomal abnormalities.

In order to study the degrees of selfcompatibility, the studies of Knight and Rogers on the setting and abscission of the flowers and that of Cope on ~~the pairing~~<sup>fusion</sup> and non-~~pairing~~<sup>fusion</sup> of the ovules, were used as the base. In addition, a cytological study was carried out on the chromosome pairing in the formation of pollen and its normality in order to know its behavior in relation with the proposal.

The results of the settings and abscissions were obtained through a diallelic cross between clones ICS-1, UF-667 and UF-29. The statistical analysis through the  $\text{Chi}^2$  test showed that the segregations in selfing adjusted to Coral's proposal, ~~since~~<sup>however</sup>, when the results of the reciprocal crossings were observed, no adjustment to the theoretical expectation was found, ~~in some cases~~. Besides this, the results of the majority of the combinations also adjusted to the other segregations. It was also observed that the size of the sample was small and could be influencing the results. According to the tendencies observed for the  $\text{Chi}^2$  values, no evidence was found for Coral's proposal on the degrees of selfcompatibility. All the clones studied were selfcompatible and this condition was better explained by Knight and Roger's method than by Cope's.

When the data on ~~the pairing~~<sup>fusion</sup> and non-~~pairing~~<sup>fusion</sup> of the ovules was analyzed in order to prove Cope's theory, it was found out that all three clones did not adjust to the theoretical expectation of 100% ~~pairing~~<sup>fusion</sup> and that they did adjust to the 3:1 proportion, that is, 25% of the ovules did not pair, thus not offering conditions to explain the degrees of selfcompatibility.

The study on chromosomal pairing in the formation of pollen grains was made in metaphase I and that data reveals that there exists no uniformity in the pairing not only in the selfcompatible clones but also in their hybrids with an incompatible parent.

No relation was found between the abnormal pairing of chromosomes with the degrees of selfcompatibility and the normality of pollen grains.

## 8. LITERATURA CITADA

1. BOLLES-LEE. The microtometist's vade-mecum; a handbook of the methods of animal and plant microscopic techniques. 11th. ed., Philadelphia, Blakiston, 1950. 753 p.
2. CARLETTO, G. M. A polinização controlada na flôr do cacaeiro. Bahia, Brasil. Instituto de Cacau. Boletim Técnico no. 6. 1946. pp. 5-30.
3. \_\_\_\_\_. Morfologia dos cromossomos de *Theobroma leiocarpa*. Brasil Museu Nacional. Boletim (Nova Série). Botânica no. 9, 1848. 5 p.
4. CHEESMAN, E. E. The botanical programme of 1937. In Imperial College of Tropical Agriculture. Annual Report on Cacao Research 7:1-2. 1938.
5. COCHRAN, W. G. Sampling techniques. 2nd. ed. New York, Wiley, 1963. 413 p.
6. COPE, F. W. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 17:157-182. 1962.
7. CORAL, F. J. Estudo comparativo das teorias sôbre o controle genético das incompatibilidades do cacaeiro (*Theobroma cacao*). Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 1970. 51 p.
8. ENRIQUEZ, G. e SORIA, J. Catálogo de cultivares de cacao. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas. 1967.
9. GORREZ, D. D. The flower biology and pollinating and crossing habits of cacao. Philippine Agriculturist 46(4):288-302. 1962.
10. HARLAND, S. C. Some botanical problems of cacao. Tropical Agriculturist (Ceylon) 64(5):289-291. 1925.
11. JACOPINI, P. Sodium biselenite as a rapid indicator of pollen viability. (Em italiano). Revista Ortoflorofrutticola Italiana 37:433-437. 1954. (Original não consultado, tomado de Horticultural Abstracts 25(2):200. 1955).
12. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. London, McGraw-Hill, 1940. 123 p.
13. KNIGHT, R. e ROGERS, H. H. Incompatibility in *Theobroma cacao*. Heredity 9(1):69-77. 1955.

14. MUÑOZ ORTEGA, J. M. Estudios cromossômicos en el género *Theobroma* L. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1948. 43 p.
15. OPEKE, L. K. e JACOB, V. J. Cytological irregularities in *Theobroma cacao* L. In Conferência Internacional de Pesquisa em Cacau, 2º, Salvador e Itabuna, Brasil, Novembro 19-26, 1967. Memórias. Itabuna, CEPLAC, 1969. pp. 114-115.
16. OSTAPENCO, V. I. An evaluation of different methods of determination in pollen viability (Em russo) Bjul. nanc. tehn. Informe. 1956. (Original não consultado, tomado de Horticultural Abstracts 28(3):354. 1958).
17. POSNETTE, A. F. Incompatibility and pollination in cacao. Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad. Annual Report on Cacao Research 7:19-20. 1938.
18. POUND, J. F. Studies of fruitfulness in cacao. II. Evidence for partial sterility. In Imperial College of Tropical Agriculture. Annual Report on Cacao Research 1:21-28. 1932.
19. \_\_\_\_\_. Certain barren types of cacao. In Imperial College of Tropical Agriculture. Annual Report on Cacao Research 4:11-15. 1935.
20. \_\_\_\_\_. Studies of fruitfulness in cacao. V. Conditional self compatibility and its implications. In Imperial College of Tropical Agriculture. Annual Report on Cacao Research 4: 17-19. 1935.
21. SHIMOYA, C. Microsporogenese em cacau "Catongo" (*Theobroma cacao* L.). *Experientiae* (Brasil) 5(1):1-16. 1965.
22. STEEL, R. G. D. e TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics. New York, McGraw-Hill, 1960. 481 p.
23. STRICKBERGER, M. W. Genetics. New York, MacMillan, 1968. 868 p.
24. VARAS, J. Factores que afetam la germinacion del polen del cacao *in vitro*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1961. 65 p.
25. VOS, C. C. Germination of cacao pollen. *Chronica Naturae* 104(4):99-101. 1948.

4

APENDICE

Quadro No. 1

1. Método de Knight e Rogers

1.1 Autofecundações dos clones autocompatíveis

Valôres de  $\chi^2$  calculados em base ao número de flôres polinizadas e fecundadas (F) e não fecundadas (NF)

Segregação				1:3	1:1	3:1	4:0
Clone	F	NF	T	$\chi^2$			
ICS-1	13	2	15	30,422*	8,066*	1,088	0,266
UF-667	10	5	15	13,888*	1,666	0,555	1,666
UF-29	10	5	15	13,888*	1,666	0,555	1,666

1.2 Polinizações cruzadas de clones autocompatíveis

Valôres de  $\chi^2$  calculados em base ao número de flôres polinizadas e fecundadas (F) e não fecundadas (NF)

Segregação				1:3	1:1	3:1	4:0
Híbridos	F	NF	T	$\chi^2$			
ICS-1xUF-667	3	12	15	0,021	4,266	21,354*	8,816*
ICS-1xUF-29	11	4	15	18,688*	3,266	0,022	1,066
UF-667xICS-1	13	2	15	30,422*	8,066	1,088	0,266
UF-667xUF-29	11	4	15	18,688*	3,266	0,022	1,066
UF-29xICS-1	7	8	15	3,755	0,066	6,422*	4,266*
UF-29xUF-667	8	7	15	6,422*	0,066	3,755	3,266

$\chi^2$  1 gl 0,05 = 3,84

\* significativo ao nível de 0,05%

Quadro 2

2. Método de Cope

2.1 Qui-quadrado geral

Valôres de  $\chi^2$  calculados em base ao número total de óvulos fusionados (F) e não fusionados (NF)

Segregação				
Cones	1:3	1:1	3:1	4:1
ICS-1	336,695*	57,521*	0,695	20,380*
UF-667	397,343*	75,257*	0,003	18,064*
UF-29	608,724*	138,043*	0,073	14,010*

$\chi^2$  1 gl 0,05 = 3,84

\* significativo ao nível de 0,05 %

Quadro 3

2.2 Qui-quadrado individual

Valôres de  $\chi^2$  calculados em base ao número de óvulos fusionados (F) e não fusionados (NF).

Segregação No. de ovários	1:3	1:1	3:1	4:0
----- $\chi^2$ -----				
Clone ICS-1				
1	21,774*	1,580	3,107	4,645*
2	40,441*	6,081*	0,441	3,270
3	50,919*	10,939*	0,252	1,484
4	48,039*	9,529*	0,039	1,882
5	45,547*	7,410*	0,213	3,102
6	64,533*	14,400*	0,533	1,600
7	45,342*	8,257*	0,009	2,314
8	25,000*	3,000	1,000	3,000
8	341,595	61,196	5,594	21,297
Clone UF-667				
1	59,259*	13,444*	0,542	1,361
2	30,204*	3,903*	0,870	3,225
3	42,667*	8,000*	0,000	2,000
4	37,378*	6,533*	0,044	2,133
5	40,090*	6,818*	0,090	2,454
6	37,500*	6,125*	0,166	2,531
7	45,430*	9,322*	0,096	1,580
8	42,705*	7,529*	0,039	2,382
9	65,333*	16,000*	1,333	1,000
9	400,566	77,674	3,180	18,666
Clone UF-29				
1	94,173*	25,130*	3,507	0,782
2	75,757*	17,818*	1,090	1,454
3	81,000*	18,750*	1,000	1,687
4	64,533*	14,400*	0,533	1,600
5	74,906*	15,680*	0,240	2,420
6	86,840*	20,480*	1,306	1,620
7	72,058*	14,294*	0,058	2,823
8	61,536*	12,902*	0,203	1,957
8	610,603	139,454	7,937	14,343

$\chi^2$  1 gl 0,05% = 3,84

\* significativo ao nível de 0,05 %



Quadro 4

2.3 Autofecundação dos clones autocompatíveis

Valôres de  $X^2$  calculados em base ao somatório dos valôres de  $X^2$  individual,  $X^2$  geral e  $X^2$  por diferença dos dois primeiros

Segregação		1:3	1:1	3:1	4:0
Fonte de variação	GL	$X^2$			
CLONE ICS-1					
Fusionado x não fu.	1	333,695*	57,521*	0,695	20,380
Homogeneidade	7	7,900*	3,675*	4,889	0,917
Total	8	341,595	61,191	5,594	21,297
CLONE UF-667					
Fusionado x não fu.	1	339,343*	75,257*	0,003	18,064*
Homogeneidade	8	3,223	2,414	3,177	0,602
Total	9	400,566	77,674	3,180	18,666
CLONE UF-29					
Fusionado x não fu.	1	608,724*	138,043*	0,073	14,010
Homogeneidade	7	1,879	1,414	7,864	0,351
Total	8	610,603	139,454	7,937	14,361

$X^2$  1 gl 0,05% - 3,84

$X^2$  7 gl 0,05% - 14,07

$X^2$  8 gl 0,05% - 15,51

\* significativo ao nível de 0,05%