

II. GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

EVIDÊNCIA ISOENZÍMICA SOBRE A ORIGEM INTERESPECÍFICA DO CAFÉ PIATÃ ⁽¹⁾

HERCULANO PENNA MEDINA FILHO ^(2,4), ALCIDES CARVALHO ⁽³⁾,
ROSA MARIA LIZANA BALLVE ⁽²⁾, RITA BORDIGNON ⁽²⁾,
MARIA BERNADETE SILVAROLLA ⁽²⁾,
MARINEZ MURARO ALVES DE LIMA ⁽²⁾ e LUIZ CARLOS FAZUOLI ^(2,4)

RESUMO

Encontrou-se, anos atrás, em uma lavoura de *Coffea arabica* ($2n = 44$), uma forma de café bastante distinta das demais. Inicialmente, julgou-se tratar de um cafeeiro autotetraplóide de *C. liberica* ($2n = 22$) ou de *C. dewevrei* ($2n = 22$). Estudos morfológicos e citológicos de tal cafeeiro, denominado Piatã (prefixo C387 da Seção de Genética do IAC), assim como de seus descendentes, indicaram tratar-se, provavelmente, de um híbrido natural derivado da união de um gameta normal de *C. arabica* e de um não reduzido de *C. dewevrei*. No presente trabalho, os estudos dos padrões eletroforéticos das enzimas PGI, PGM e ADH do endosperma de sementes confirmaram a origem interespecífica do café Piatã. A combinação de alelos dessas enzimas é distinta e específica para *C. dewevrei* e *C. arabica* e tais alelos segregam nas sementes do cafeeiro Piatã. O estudo das isoenzimas das sementes mostram também que, ao contrário do que se pensava, o café Piatã não é auto-incompatível, sendo freqüente a autofecundação. Análises semelhantes, além de úteis na identificação de outros híbridos naturais entre espécies de *Coffea*, serão de grande valia nos trabalhos básicos de genética, evolução e melhoramento do cafeeiro, nos quais importa conhecer a origem, constituição genética e biologia da reprodução das plantas.

Termos de indexação: *Coffea*, *C. dewevrei*, *C. arabica*, isoenzimas, híbrido interespecífico.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 26 de dezembro de 1994 e aceito em 11 de abril de 1995.

⁽²⁾ Seção de Genética, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

⁽³⁾ *In memoriam*.

⁽⁴⁾ Com bolsa de pesquisa do CNPq.

ABSTRACT

ISOENZYMIC EVIDENCE ON THE INTERSPECIFIC ORIGIN OF THE PIATÃ COFFEE

Years ago it was found in a field of *Coffea arabica* ($2n = 44$) a coffee tree different from any other known so far. Initially it was thought to be an autotetraploid either of *C. liberica* ($2n = 22$) or of *C. dewevrei* ($2n = 22$). Morphological and cytological studies of this tree and its progeny, designated by the prefix C387 of the Department of Genetics, IAC and named Piatã, indicated that it was probably a natural hybrid originated from the fusion of a normal gamete ($n = 22$) of *C. arabica* and an unreduced gamete ($2n = 22$) of *C. dewevrei*. In the present study the isoenzyme banding patterns for the enzymes PGI, PGM and ADH of the seeds endosperm of Piatã confirmed its interspecific origin. The alleles of combination of *C. dewevrei* and *C. arabica* for the aforementioned isoenzymes is peculiar and distinct for these species, and such alleles segregate in the seeds of the Piatã. Isoenzymatic studies on seeds showed also that Piatã coffee is self-compatible, and not self-incompatible as it was believed. Indeed, autogamy is quite frequent in the Piatã coffee. Similar analyses may be useful for the identification of other natural hybrids among *Coffea* species. This could be of great value for genetic and evolution studies, and breeding of coffee, where the knowledge of the origin, genotype constitution and reproductive biology of the plants is important.

Index terms: *Coffea*, *C. arabica*, *C. dewevrei*, isoenzymes, interspecific hybrid.

1. INTRODUÇÃO

Encontrou-se, anos atrás, em uma lavoura de *Coffea arabica*, uma planta de café que se distinguia das demais por apresentar extrema rusticidade, grande porte e elevadas produções. Tratava-se do café Piatã (prefixo C387 da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas), em torno do qual se investigou a possibilidade de utilização nos trabalhos de melhoramento (Krug et al., 1950). Em função de certos caracteres morfológicos, pensou-se, inicialmente, tratar-se da espécie *C. liberica* ($2n = 22$). Estudos mais detalhados desses caracteres e de seu comportamento meiótico, bem como da progênie de livre polinização ($2n = 44$), indicaram, no entanto, tratar-se, provavelmente, de um híbrido natural, auto-incompatível, derivado da união de um gameta normal de *C. arabica* ($2n = 44$) com um gameta não reduzido de *C. dewevrei* ($2n = 22$) (Mendes, 1949; Krug et al., 1950; Krug & Carvalho, 1951).

O emprego da técnica de eletroforese para análise de isoenzimas é bastante útil para detectar dife-

renças genéticas existentes entre as enzimas, refletidas por uma mobilidade diferencial da molécula quando submetida a um campo elétrico.

Tais isoenzimas, reveladas como bandas no gel mediante a eletroforese, são codificadas por alelos que apresentam herança simples e ação gênica codominante, facilitando as análises genéticas (Allard, 1956; Brewer, 1970; Medina Filho, 1983).

No presente trabalho, estudaram-se, além da coloração das sementes, as isoenzimas do café Piatã, empregando-se a eletroforese horizontal em gel de amido visando à obtenção de maiores informações sobre sua origem e biologia de reprodução.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nas análises isoenzimáticas, utilizaram-se tanto endospermas de sementes, provenientes de frutos maduros, como, em alguns casos, folhas. Coletou-se o material do cafeeiro Piatã, de *C. dewevrei*, de *C. arabica*, de vários cultivares, de mutantes de *C. arabica* (Quadro 1) e de diversas espécies de

Coffea mantidas em coleção viva na Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. O pergamino foi removido e as sementes desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) durante dez minutos. Após lavagem em água corrente por quinze minutos e remoção da película prateada, colocaram-se as sementes para germinar à temperatura ambiente em placas de Petri contendo papel-filtro umedecido com água destilada. As folhas foram colhidas e lavadas em água corrente.

Endospermas de sementes individuais foram analisados para as enzimas ADH (E.C.1.1.1.1 - álcool desidrogenase), PGI (E.C.5.1.3.9 - fosfoglucoisomerase) e PGM (E.C.2.7.5.1 - fosfoglucomutase) pela técnica de eletroforese horizontal em gel de amido.

Obteve-se amostra de cada semente, removendo-se, com bisturi, cerca de 10% do endosperma na região oposta ao embrião. Os endospermas e folhas removidos eram imediatamente macerados em glutatona tamponada (25 mg/ml em tampão TRIS 0,1M - MgCl₂ 0,04M pH 8,5 e pH da solução final ajustado para 7,5 com NaOH 4N). O extrato resultante era absorvido em papel para eletroforese e mantido sob refrigeração até a inserção no gel. Tecidos de folhas foram analisados para PGM e PGI.

Realizaram-se as eletroforeses em aparelho descrito por Tanksley (1979), com as seguintes especificações metodológicas:

Amido Sigma: 12%

Tampão do gel: 25 mL/L TRIS 0,73M; 25 mL/L ácido cítrico 0,15M; pH 8,0 ajustado com TRIS 0,73M.

Tampão dos eletrodos: ácido bórico 0,3M; pH 8,3 ajustado com NaOH 4N.

Condições elétricas: 25mA sem ultrapassar 150V por 25 minutos para inserção dos extratos no gel. Removidas as amostras e decorrida uma hora nas mesmas condições, ajustou-se a amperagem para 30mA sem ultrapassar 300V. Após 30-40 minutos, ajustou-se a voltagem para 300V sem ultrapassar 30mA, aproximadamente por duas horas.

Revelação das isoenzimas:

ADH (E.C.1.1.1.1 - álcool desidrogenase) ⁽⁵⁾

NAD ⁺	20 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
TRIS (0,1 M) - MgCl ₂ (0,04 M)	
pH 7,5 com HCl 3N	50 mL
ETOH (99%)	3 mL

PGI (E.C.5.1.3.9 - fosfoglucomutase)
(Vallejos, 1983)

Frutose-6-P	40 mg
NADP ⁺	7 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
TRIS (0,1 M) - MgCl ₂ (0,04 M)	
pH 7,5 com HCl 3N	50 mL
Glucose-6-PDH	15 unid.

PGM (E.C.2.7.5.1 - fosfoglucomutase) ⁽⁵⁾

Glucose-1-P	150 mg
NADP ⁺	7 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
TRIS (0,1 M) - MgCl ₂ (0,04 M)	
pH 7,5 com HCl 3N	50 mL
Glucose-6-PDH	15 unid.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal material analisado foi o endosperma das sementes. Cabe salientar que esse é um tecido oriundo da união de um dos núcleos generativos masculinos, provenientes do grão de pólen, com os dois núcleos polares do saco embrionário. Trata-se, portanto, de um tecido triploide formado por três núcleos, sendo dois derivados do genitor feminino (núcleos polares) e geneticamente idênticos.

Os resultados das análises isoenzímicas para PGM, PGI e ADH são detalhados a seguir e seus respectivos padrões, mostrados na figura 1.

⁽⁵⁾ S.D. TANKSLEY. Comunicação pessoal, 1980.

PGM - Todo o material de *C.arabica* investigado (Quadro 1) apresentou, no gel, o mesmo padrão de uma banda (padrão 1). A espécie *C. dewevrei* também é monomórfica, com padrão, porém de uma banda com migração retardada (padrão 2) em relação àquela de *C.arabica* (Figura 1).

Observou-se variabilidade nas sementes do Piatã, de tal modo que, além dos padrões de uma banda existentes em *C. arabica* e *C. dewevrei*, também se distinguiram outros três padrões - 3, 4 e 5 - compostos de duas bandas. Os padrões 3 e 4 exibem uma das bandas com maior intensidade de coloração.

A ocorrência de padrões com uma ou duas bandas é indicativa de que em café, à semelhança de todas as outras plantas estudadas (Weeden & Wendel, 1989), PGM é monômera, constituída somente de uma cadeia polipeptídica, codificada pelo loco referido, neste estudo, como **Pgm-1**. Os padrões 3, 4 e 5, observados no Piatã, correspondem a endospermas heterozigotos para os alelos **A** (avançado) de *C. arabica* e **R** (retardado) de *C. dewevrei*. A constituição genética dos diversos fenótipos de bandas seria a seguinte: **A/A/A** (padrão 1), **R/R/R** (padrão 2), **A/R/R** (padrão 3), **A/A/R** (padrão 4) e **A/A/R/R** (padrão 5).

Essas constituições genéticas se baseiam no fato de que o endosperma é um tecido triplóide e, da mesma forma que os conhecidos casos de plantas trissômicas heterozigotas para o loco do cromossomo em trissomia, ocorre um efeito de dosagem gênica (Birchler, 1983). Esse efeito é evidenciado pela maior intensidade de coloração da banda correspondente ao alelo que se encontra em dose dupla. Assim, o padrão 3 (**A/R/R**), cuja banda retardada é muito mais intensa, representaria um endosperma com duas doses do alelo **R** de *C. dewevrei* e apenas uma dose do alelo **A** de *C. arabica*. Situação inversa estaria ocorrendo em relação ao padrão 4, representado por dois alelos **A** e apenas um **R**. No padrão 5, mais raro, no qual não se observou diferença na intensidade das bandas, possivelmente estariam presentes alelos **A** e **R** em igual número (**A/A/R/R**). Essa hipótese é bastante aceitável se se considerar a natureza híbrida interespecífica do café Piatã e a freqüente formação de monovalentes na anáfase

I da meiose, irregularidades na segregação dos cromossomos que levariam à formação de gametas até com 28 cromossomos (Mendes, 1949). Como consequência, endospermas aneuplóides com quatro ou mais alelos poderiam ser formados.

PGI - Em diversas plantas estudadas, a enzima PGI possui estrutura quaternária dímica (Weeden & Wendel, 1989). Na maioria dos casos, PGI está representada por dois locos, sendo um no citosol e outro no plastídeo. Os padrões de bandas observados em *C. arabica*, *C. dewevrei* e no Piatã corroboram essa afirmação (Figura 1). *C. arabica* se mostrou monomórfica (padrão 1) e *C. dewevrei*, polimórfica (padrões 2, 3 e 4) para esse sistema.

A interpretação genética de PGI é bastante complexa e demandaria estudos pormenorizados envolvendo cruzamentos controlados e testes de progênies, acompanhados por análises citológicas e isoenzimicas. Seria necessário comparar os padrões do endosperma de sementes individuais com os de raiz, folha e pólen das plantas originadas dessas sementes. Esse estudo seria possível utilizando o método não destrutivo de análise isoenzimica de endosperma, desenvolvido neste trabalho, o qual permitiria a interpretação genética definitiva de PGI.

Várias são as razões que tornam bastante difícil a interpretação genética dos zimogramas de PGI observados.

A enzima é dímica, apresentando, em indivíduos heterozigotos, uma banda com migração intermediária; *C. dewevrei* é polimórfica em relação à PGI; Piatã é heterozigoto, ocorrendo segregação em suas sementes (padrões 1 a 9); o tecido triplóide do endosperma pode ser, no Piatã, de natureza aneuplóide, em virtude da segregação anormal dos cromossomos na meiose (Mendes, 1949); o Piatã ter-se-ia originado da fusão de dois núcleos: um de restituição (diplóide) formado ou na meiose I ou na meiose II de *C. dewevrei*, que é uma espécie diplóide, alógama e polimórfica, e outro, de *C. arabica*, uma espécie alotetraplóide segmental. Esses fatos resultam em considerável complexidade genômica que impedem a interpretação definitiva dos zimogramas do endosperma.

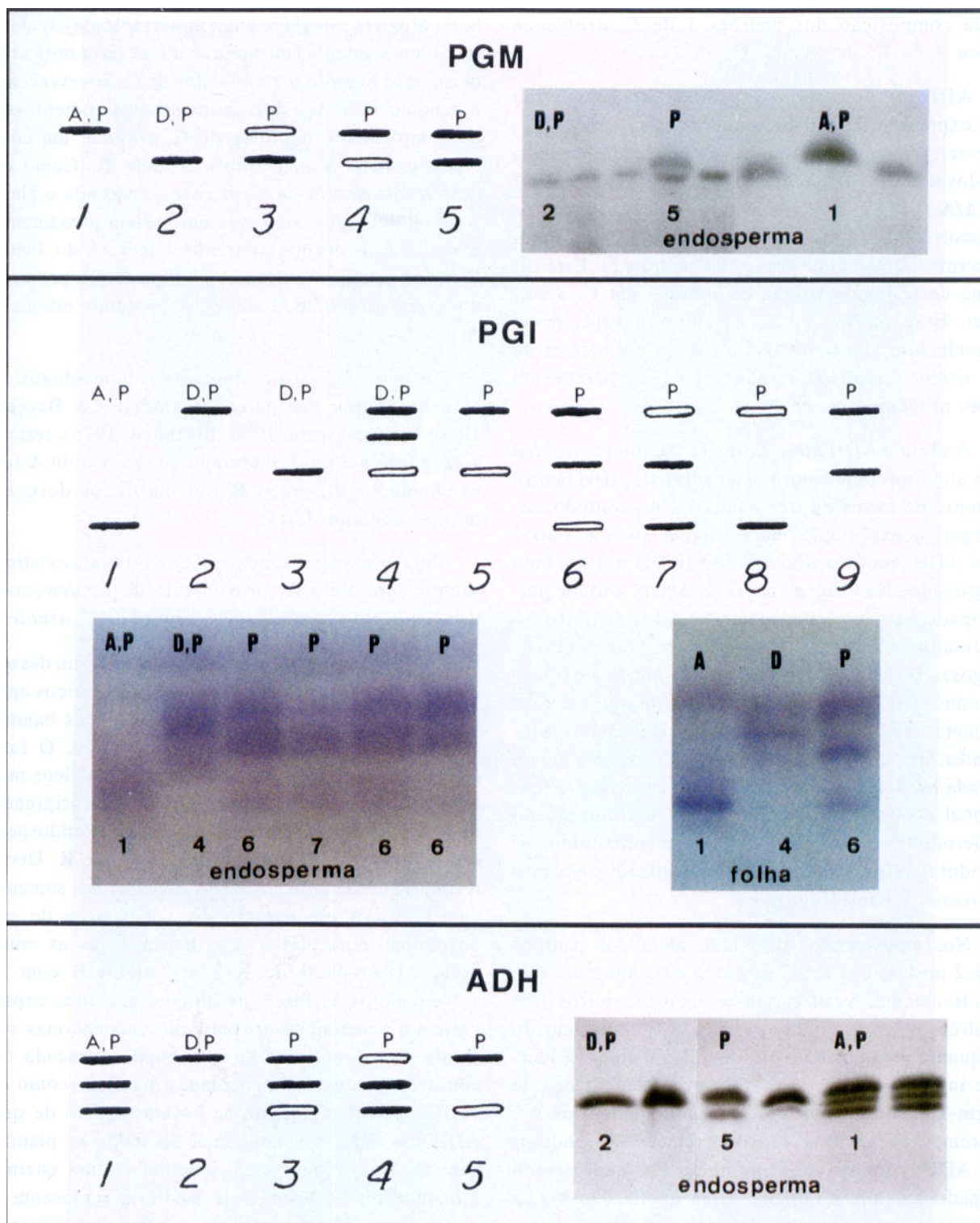


Figura 1. Padrões de PGM, PGI e ADH observados em: *C. arabica* (A), *C. dewevrei* (D) e no café Piatã (P).

Não obstante, importa que o padrão de PGI observado nas folhas do café Piatã pode ser explicado pela composição dos padrões 1 de *C. arabica* e 2 ou 4 de *C. dewevrei*.

ADH - Apenas um loco parece estar envolvido na expressão de ADH no endosperma. Em *C. dewevrei*, observou-se uma banda avançada, sendo o endosperma, provavelmente, de constituição **Adh-1 A/A/A** (padrão 2). Já em *C. arabica*, verificou-se a ocorrência de três bandas: uma retardada, outra intermediária e uma avançada (padrão 1). Esta última corresponde àquela encontrada em *C. dewevrei*. Esse padrão de três bandas ocorre, invariavelmente, em todos os cultivares e mutantes de *C. arabica* analisados; não segregam, porém, em suas progênies.

A enzima ADH ativa é dímera. Sendo *C. arabica* um alotetraplóide e porque o padrão de ADH ocorre sempre na forma de três bandas, sem, contudo, segregar, a explicação mais simples para o fato é que ADH, em *C. arabica*, é codificada por um loco duplicado. Na origem de *C. arabica*, teriam participado duas espécies contendo alelos distintos localizados em cromossomos diferentes (homeólogos). Tais homeólogos estariam em homozigose e, como a meiose de *C. arabica* é normal, em seus gametas estariam sempre presentes dois alelos diferentes, um de cada homeólogo, correspondentes à banda avançada e à retardada. Como a enzima funcional é dímera, ocorreria sempre a formação do heterodímero, que, nesse caso, seria constituído por produtos de genes não alélicos localizados nos cromossomos homeólogos.

Nos endospermas do Piatã, além dos padrões 1 e 2 observados em *C. arabica* e *C. dewevrei* respectivamente, verificaram-se também outros três padrões (3, 4 e 5). Os padrões 3 e 4 diferem do 1 quanto à intensidade de uma das bandas. Poder-se-ia interpretar esse fenômeno, à semelhança de **Pgm-1**, como um efeito de dosagem gênica. Existe, porém, uma peculiaridade em relação aos padrões de ADH: nenhum endosperma do Piatã apresentou o padrão banda retardada. Uma explicação lógica para isso é que o núcleo de restituição de *C. dewevrei*, do qual se originou o café Piatã, fosse homozigoto para o alelo **A**. Por sua vez, o gameta normal

de *C. arabica*, que teria originado o café Piatã, continha em um cromossomo o alelo **A** e, em seu homeólogo (*C. arabica* é um alotetraplóide), o alelo **R**. Somaticamente, portanto, o Piatã teria dois cromossomos homólogos derivados de *C. dewevrei* carregando o alelo **A**, e dois cromossomos homeólogos do complemento haplóide de *C. arabica*: um contendo o alelo **A** e, o outro, o alelo **R**. Como os dois cromossomos de *C. dewevrei* contendo o alelo **A** são homólogos, supõe-se que teriam pareamento e segregação normais durante a meiose do Piatã. Em seus gametas, portanto, estaria sempre presente um cromossomo de *C. dewevrei* contendo um alelo **A**.

Por outro lado, os cromossomos homeólogos de *C. arabica*, por não parearem (Mendes & Bacchi, 1940; Vishveshwara, 1960; Berthaud, 1976), teriam segregação anormal, incluindo-se ora o alelo **A** (de um homeólogo), ora o **R** (do outro), os dois, ou mesmo nenhum deles.

Em conseqüência, nos gametas do Piatã existiria sempre, um alelo **A**, proveniente de *C. dewevrei*, um **A**, um **R**, ou ambos, ou nenhum, de *C. arabica*.

A união de dois gametas com qualquer um desses genótipos resultaria em padrões eletroforéticos apenas com uma banda avançada ou com três bandas em função da formação do heterodímero. O fato de o endosperma ser formado por dois núcleos maternos de mesma constituição e um núcleo originado do pólen levaria à formação, no Piatã, de endospermas com diferentes doses dos alelos **A** e **R**. Disso resultaria desde a formação de endospermas somente com alelos **A** em número de 3 a 6 até a de endospermas com alelos **A** e **R** em todas as combinações possíveis de 1, 2 e 3 alelos **R** com 3, 4, 5 e 6 alelos **A**. Tais constituições genéticas explicariam a ocorrência, no Piatã, de endospermas somente com fenótipos de uma banda avançada ou com três bandas de intensidades diversas, como se verificou. Tal raciocínio se baseia no fato de que ADH em café, à semelhança de todas as plantas bem estudadas para esse sistema, é uma enzima dímera e que a banda intermediária representa o heterodímero. Entretanto, não explica aqueles raros endospermas de padrão 5 com duas bandas (retardada e avançada), sem a banda intermediária.

É possível que devido a uma divergência evolutiva, heterodímeros se formem apenas entre os produtos gênicos dos alelos **A** e **R**, provenientes de *C. arabica*, porém não entre **R** de *C. arabica* e **A** de *C. dewevrei*.

Concluindo, os padrões isoenzímicos para ADH, PGI e PGM confirmaram a hipótese de que o cafeeiro Piatã seja um híbrido entre *C. arabica* e *C. dewevrei*. Estudos de 16 espécies de *Coffea* indicaram que nenhuma possui, conjuntamente, os padrões de ADH, PGI e PGM de *C. arabica* e *C. dewevrei* (Medina Filho, dados não publicados). Esses padrões se encontram combinados no café Piatã. Além disso, folhas e frutos desse cafeeiro (Figura 2) apresentam características das duas espécies.

Com relação à coloração do endosperma das suas sementes, verificou-se que, entre 200 sementes, 54 (27%) exibiram a coloração cera, concordando, pois, com Krug et al. (1950), que encontraram 23,6% de sementes cera. As demais são, na maioria, verde-escuras (Figura 2) ou, ainda, intermediárias.

O alelo mutante cera (*ce*) de *C. arabica* é recessivo, conferindo coloração amarelada ao endosperma de constituição genética *ce ce ce* (Carvalho & Krug, 1949). *C. dewevrei* possui, normalmente, sementes de coloração cera. No entanto, o alelo cera dessa espécie é dominante em relação ao que confere coloração verde em *C. arabica* (Krug & Carvalho, 1951).

De acordo com Krug et al. (1950), o cafeeiro Piatã é praticamente auto-incompatível, pois somente cerca de 1% de frutos foi obtido de flores autopolinizadas.

Baseando-se na genética da coloração cera em *C. arabica* e em *C. dewevrei*, e considerando o fato de que o café Piatã, cujas sementes foram analisadas, encontra-se plantado entre exemplares das duas espécies, pode-se concluir que as sementes cera do cafeeiro Piatã seriam oriundas ou do cruzamento com *C. dewevrei* ou de autofecundação, e as sementes verde-escuras seriam o resultado de cruzamentos com *C. arabica* ou, também, de autofecundação. Analisando-se, portanto, só a coloração das sementes, é difícil obter maiores informações

sobre a biologia da reprodução do Piatã em condições de livre polinização nas proximidades de *C. dewevrei* e *C. arabica*.

Os padrões de isoenzimas em amostra de 20 sementes cera e de 20 verde-escuras do café Piatã encontram-se no quadro 1. Esses resultados, apesar de não indicar a origem dos gametas que participaram na formação de cada semente analisada, podem excluir certas hipóteses.

Quadro 1. Relação de cultivares e mutantes de *Coffea arabica* analisados isoenzimicamente

Cultivares	
Bourbon Amarelo	Glaucia
Bourbon Vermelho	Abissínica
Murta	Maragogipe
Mundo Novo	Sumatra
Caturra Amarelo	Iarama
Caturra Vermelho	Agaro
Catuai	Palido Viridis
Laurina	Bullata
Mokka	Catimor
Pacas	Ennarea
Vila Sarchi	Cioccie
Vila Lobos	Barbuk Sudan
San Ramón	Amphilo
São Bernardo	Sudan Rume
Amarelo de Botucatu	Caripe
Nacional	
Mutantes	
Bronze	Goiaba
Purpuracens	Nana
Semierecta	Crespa
Semperflorens	Cera
Erecta	Variegata
Polysperma	Minutifolia
Abramulosa	Volutifolia
Anormalis	

Quadro 2. Possível origem de 20 sementes cera e 20 sementes verde-escuras do café Piatã, deduzida a partir dos fenótipos coloração e padrão das isoenzimas ADH, PGI e PGM de sementes individuais. "O" corresponde a autofecundação; "A" e "D", a cruzamento com *C. arabica* e *C. dewevrei* respectivamente

N.º da semente	Cor	Origem	ADH	Origem	PGI	Origem	PGM	Origem	Origem conclusão
1	Verde	OA	1	ODA	6	ODA	1	OA	OA
2	Verde	OA	1	ODA	6	ODA	1	OA	OA
3	Verde	OA	3	ODA	8	ODA	4	ODA	OA
4	Verde	OA	2	OD	6	ODA	2	OD	O
5	Verde	OA	2	OD	6	ODA	3	ODA	O
6	Verde	OA	3	ODA	7	ODA	3	ODA	OA
7	Verde	OA	4	ODA	6	ODA	3	ODA	OA
8	Verde	OA	2	OD	7	ODA	5	ODA	O
9	Verde	OA	3	ODA	6	ODA	3	ODA	OA
10	Verde	OA	4	ODA	6	ODA	3	ODA	OA
11	Verde	OA	3	ODA	6	ODA	4	ODA	OA
12	Verde	OA	3	ODA	6	ODA	?	?	OA
13	Verde	OA	3	ODA	6	ODA	3	ODA	OA
14	Verde	OA	3	ODA	7	ODA	2	OD	O
15	Verde	OA	1	ODA	7	ODA	5	ODA	OA
16	Verde	OA	3	ODA	5	OD	5	ODA	O
17	Verde	OA	2	OD	8	ODA	5	ODA	O
18	Verde	OA	1	ODA	6	ODA	1	OA	OA
19	Verde	OA	1	ODA	7	ODA	5	ODA	OA
20	Verde	OA	1	ODA	1	OA	4	ODA	OA
21	Cera	OD	3	ODA	6	ODA	4	ODA	OD
22	Cera	OD	1	ODA	6	ODA	3	ODA	OD
23	Cera	OD	2	OD	6	ODA	?	?	OD
24	Cera	OD	1	ODA	7	ODA	?	?	OD
25	Cera	OD	2	OD	6	ODA	5	ODA	OD
26	Cera	OD	1	ODA	8	ODA	2	OD	OD
27	Cera	OD	2	OD	6	ODA	3	ODA	OD
28	Cera	OD	2	OD	8	ODA	3	ODA	OD
29	Cera	OD	3	ODA	8	ODA	?	?	OD
30	Cera	OD	3	ODA	6	ODA	?	?	OD
31	Cera	OD	2	OD	7	ODA	4	ODA	OD
32	Cera	OD	2	OD	1	OA	1	OA	O
33	Cera	OD	3	ODA	6	ODA	5	ODA	OD
34	Cera	OD	2	OD	8	ODA	5	ODA	OD
35	Cera	OD	1	ODA	9	OD	3	ODA	OD
36	Cera	OD	1	ODA	9	OD	3	ODA	OD
37	Cera	OD	2	OD	8	ODA	4	ODA	OD
38	Cera	OD	1	ODA	7	ODA	5	ODA	OD
39	Cera	OD	1	ODA	8	ODA	3	ODA	OD
40	Cera	OD	1	ODA	6	ODA	2	OD	OD

Assim, da mesma forma que o fenótipo de semente verde-escura exclui a possibilidade de essa semente se ter originado do cruzamento com *C. dewevrei*, os padrões 1 de PGI e PGM (Figura 1) também a excluem. Por outro lado, os padrões 2 de ADH e PGM excluem a participação de *C. arabica* nas polinizações. Outras possíveis origens são mostradas no quadro 1, no qual se verifica que a análise de sementes individuais, com respeito aos fenótipos coloração e padrões de ADH, PGI e PGM fornecem, conjuntamente, em muitos casos, mais informações que qualquer fenótipo analisado isoladamente.

Como exemplo, consideremos a semente n.º 32 do quadro 1. A coloração cera e o padrão 2 de ADH indicam que essa semente se originou ou por autofecundação ou pelo cruzamento com *C. dewevrei*, excluindo a possibilidade de proveniência do cruzamento com *C. arabica*. Por outro lado, os padrões 1 de PGI e PGM indicam que essa semente se originou ou por autofecundação ou pelo cruzamento com *C. arabica*, excluindo a possibilidade de ser oriunda do cruzamento com *C. dewevrei*. Pela análise conjunta desses quatro fenótipos, conclui-se que a semente de n.º 32 só pode ser proveniente de autofecundação, visto que as possibilidades de origem por cruzamento com *C. arabica* ou com *C. dewevrei* foram excluídas. Com esse mesmo raciocínio, obtiveram-se as informações para as demais sementes (Quadro 2).

Verifica-se que entre as 20 sementes verde-escuras analisadas, seis (30%) são produto da autofecundação, tendo as demais se originado ou por autofecundação ou por cruzamento com *C. arabica*, mas não por cruzamento com *C. dewevrei*. Entre aquelas de coloração cera, apenas uma (5%) seria, com certeza, provinda de autofecundação. As 19 restantes seriam originadas ou por autofecundação ou por cruzamento com *C. dewevrei*, excluindo-se o cruzamento com *C. arabica*.

Apesar de esses dados não permitirem estimar a taxa real de fecundação cruzada, provam, sem dúvida, que o café Piatã não é auto-incompatível, como se pensava, mas que, na verdade, a autofecundação é, por certo, freqüente nesse cafeeiro.

O presente trabalho é válido também para demonstrar o potencial das isoenzimas em estudos relacionados à biologia da reprodução em café. Uma vantagem adicional de sua utilização é que se podem identificar, ainda no estágio de semente, indivíduos provenientes de autofecundação natural, sem depender da obtenção artificial de sementes autofecundadas. Isso é possível pelo fato de a análise de isoenzimas ser um método não destrutivo, permitindo a utilização de pequena parte do endosperma, não impedindo a germinação e o posterior desenvolvimento das plantas correspondentes.

Sabe-se que a bebida do Piatã é inferior à de *C. arabica* (Krug et al., 1950; Teixeira et al., 1974), porém muito superior à de *C. dewevrei* (Medina Filho, dados não publicados). Considerando-se que até 30% de *C. dewevrei* pode ser misturado a *C. arabica* sem grandes modificações na qualidade da bebida (Carvalho et al., 1990), talvez seja renovado o interesse no aproveitamento desse café, pois, além disso, o Piatã é bastante rústico, produtivo e fonte de resistência ao nematóide *Meloidogyne exigua* (Araújo Neto & Alvarenga, 1973; Fazuoli et al., 1977).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, Berkeley, **24**(10): 235-276, 1956.
- ARAÚJO NETO, K. & ALVARENGA, G. Teste de resistência do Piatã (Geração F₂ do H 387) ao nematóide *Meloidogyne exigua* Goeldi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 1., Vitória, 1973. *Resumos*. Vitória, Instituto Brasileiro do Café, 1973. p.27.
- BERTHAUD, J. Étude cytogénétique d'un haploide de *C. arabica*. *Café, Cacao, Thé*, Paris, **20**:91-96, 1976.
- BIRCHLER, J.A. Allozymes in gene dosage studies. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. eds. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part A. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.85-108.
- BREWER, C.J. *An introduction to isozyme techniques*. New York, Academic Press, 1970. 186p.
- CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; TEIXEIRA, A.A. & GUERREIRO FILHO, O. Aproveitamento do café Excelsa em mistura com o café Arábica. *Bragantia*, Campinas, **49**(2):335-343, 1990.

- CARVALHO, A & KRUG, C.A. Genética de *Coffea* XII: Hereditariedade da cor amarela da semente. *Bragantia*, Campinas, **9**:193-202, 1949.
- FAZUOLI, L.C.; MONACO, L.C. & CARVALHO, A. Resistência de cafeeiros a nematóides I: Testes em progênies e híbridos para *Meloidogyne exigua*. *Bragantia*, Campinas, **36**(23):231-238, 1977.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A. The genetics of *Coffea*. *Advances in Genetics*, New York, **4**:127-158, 1951.
- KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T.; CARVALHO, A. & MENDES, A.J.T. Uma nova forma de *Coffea*. *Bragantia*, Campinas, **10**:11-25, 1950.
- MEDINA FILHO, H.P. *Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas*. Campinas, Instituto Agrônomo, 1983. 15p. (Circular, 121)
- MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea* XII: Uma nova forma tetraplóide. *Bragantia*, Campinas, **9**:25-34, 1949.
- MENDES, A.J.T. & BACCHI, O. *Observações citológicas em Coffea V: uma variedade haplóide (di-haplóide) de Coffea arabica L.* Campinas, Instituto Agrônomo, 1940. 26p. (Boletim técnico, 77)
- TANKSLEY, S.D. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, Davis **29**:37-38, 1979.
- TEIXEIRA, A.A.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. & MONACO, L.C. Avaliação da bebida de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Coffea*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **26**(7):565, 1974.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding - Part A*. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.469-516.
- VISHVESHWARA, S. Occurrence of a haploid *Coffea arabica* L. cv Kents. *Indian Coffee*, Bangalore, **34**(3):123-124, 1960.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.M., eds. *Isozymes in Plant Biology*, Dioscorides Press, 1989. p.46-72.