

# BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas  
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 13

Campinas, outubro de 1954

N.º 22

## CITOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS SEM SEMENTES NO CAFÉ "MUNDO NOVO" (\*)

A. J. T. MENDES, DIXIER M. MEDINA e CÂNDIDA H. T. MENDES CONAGIN, *engenheiros agrônomos, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo de Campinas*

### RESUMO

Uma pequena porcentagem de frutos sem sementes é comum às plantas de tôdas as variedades de *Coffea arabica*, parecendo tratar-se de um fenômeno puramente fisiológico. No café **Mundo Novo** porém, além dêste tipo de plantas, há outras com elevada porcentagem de lojas vazias ("chochos"). Constituindo isto um grave defeito para uma variedade comercial, procurou-se estudar a sua causa.

As observações feitas no processo da microsporogênese mostraram irregularidades na distribuição dos cromossômios. Sendo encontradas tanto nas plantas de alta porcentagem como nas de baixa porcentagem de chochos, não deve residir nessas anomalias a causa procurada.

Em estudos comparativos dos dois tipos de plantas do **Mundo Novo** e da variedade **bourbon**, pôde-se verificar :

a) que, em linhas gerais, o processo da formação do saco embrionário e o desenvolvimento do endosperma e do embrião são idênticos, havendo um ligeiro atrazo para as plantas **Mundo Novo** ;

b) que nestas últimas existem anormalidades diversas no saco embrionário, em proporção muito mais elevada do que no **bourbon**. Ocorrendo com igual freqüência nos dois tipos de plantas do café **Mundo Novo**, estas anormalidades também não devem se relacionar com a formação de chochos.

Estudos realizados em frutos de diversas idades, permitiram relacionar a alta freqüência de lojas vazias com o aparecimento de uma estrutura anormal, em forma de disco, encontrada no interior dos restos de perisperma. Êste "disco" (com cêrca de 3 mm de diâmetro) só apareceu na planta de alta freqüência de chochos, não tendo sido constatado na planta **Mundo Novo** de baixa freqüência de chochos, nem na planta **bourbon**.

O exame citológico revelou que essa estrutura é constituída de endosperma, contendo um embrião anormal ; de côr clara a princípio, torna-se pardacenta à medida que degenera ; recebeu a denominação de "endosperma discóide".

De oito plantas examinadas a seguir, encontrou-se endosperma discóide nas quatro que produzem alta porcentagem de lojas sem sementes, o que permitiu classificar as plantas **Mundo Novo** em duas categorias : 1) plantas onde ocorre o "disco" ; 2) plantas nas quais o "disco" não ocorre.

A alta freqüência de chochos nessa variedade está, pois, condicionada à presença do **endosperma discóide**.

Os autores sugerem uma hipótese genética para explicar êsse novo fenômeno : plantas de alta freqüência de chochos são heterozigotas para um par de fatores, que na condição duplamente recessiva têm ação letal ; como conseqüência, há paralização do endosperma no início do seu desenvolvimento, e, em seu lugar, é encontrado o "disco".

(\*) Recebido para publicação em 10 de junho de 1954.

## 1 - INTRODUÇÃO

Existe atualmente, entre os lavradores do Estado de São Paulo, um grande interesse pelo café a que se deu o nome de **Mundo Novo**, apregoadas que são sua rusticidade e sua produtividade alta e menos variável que o comum. O Instituto Agronômico, no entanto, não aconselha a sua cultura sem prévia seleção, uma vez que se verificou (1) a existência de dois defeitos principais: a) a ocorrência de plantas praticamente improdutivas (9 a 23% em quatro localidades diferentes), e b) a produção de frutos desprovidos de sementes: em numerosas amostras de 100 frutos, a média das lojas sem sementes era de 16,6 em Jaú, 20 em Campinas, 23 em Mococa e 26 em Pindorama.

Não selecionada a planta matriz, o lavrador estará arriscando a dedicar trato e espaço útil a plantas improdutivas, devendo-se ainda verificar se a sua maior produtividade não é apenas aparente, o rendimento de sua plantação sendo diminuído por uma elevada ocorrência de frutos "chochos".

O Instituto Agronômico desenvolve um plano de seleção deste café, procurando obter plantas matrizes livres daqueles dois principais defeitos. À Secção de Citologia coube investigar a causa da ocorrência dos frutos "chochos", à qual incidentalmente poderia estar ligada a ocorrência de plantas improdutivas. Determinada a causa, poder-se-ia dizer da possibilidade de superá-la ou mesmo eliminá-la.

## 2 - MATERIAL E MÉTODO

Escolheram-se duas plantas **Mundo Novo** que, segundo os dados da Secção de Genética, eram respectivamente de alta frequência (CP 376-5) e de baixa frequência de chochos (C P 387-17). Como contróle, usou-se também uma planta considerada normal — um cafeeiro **bourbon** (Co 663), obtido anteriormente na Secção de Citologia (3) pela duplicação de cromossômios de um haplóide ( $2n = 22$ ) e que, portanto, tinha  $2n = 44$  e era homozigoto. Quase tôdas as observações foram feitas nestas três plantas, entre setembro de 1952 e agosto de 1953. Para algumas observações complementares feitas em setembro de 1953, a planta C P 387-17 foi substituída pela C P 376-4, também de baixa frequência de chochos, pois que aquela fôra destruída por um incêndio que atingiu a plantação no mês de julho de 1953.

Para o estudo da microsporogênese, colheram-se os botões em uma mistura de álcool absoluto e ácido acético glacial na proporção de três partes para uma, respectivamente; depois de uma fixação durante 24 horas, as anteras eram examinadas pelo método do carmin acético; em um refrigerador o material podia ser conservado para exame, em boas condições, por uma semana ou mais; no ambiente de laboratório essa conservação não ia além de 2 ou 3 dias.

Para o estudo do saco embrionário, fertilização e fenômenos subsequentes, manipularam-se em cada uma das três plantas, numerosos ramos com botões prestes a se abrir, protegendo-os, castrando-os, controlando a polinização. Assim, de cada planta **Mundo Novo** foram colhidos, a espaço

de tempo regular, ovários de : a) botões castrados e não polinizados ; b) botões castrados e polinizados pela outra planta da mesma variedade ; c) botões castrados e polinizados pela planta normal (**bourbon**) ; d) botões castrados e auto-polinizados ; e) flores livremente polinizadas. Ao mesmo tempo, da planta **bourbon**, colhiam-se ovários correspondentes aos itens **a**, **d** e **e** ; os itens **b** e **c**, neste caso, correspondiam a botões castrados e polinizados por uma e outra planta **Mundo Novo**. Os ovários eram colhidos em Craí (7) e incluídos em parafina, depois de convenientemente desidratados através de uma série de álcoois etílico e butílico normais. Os cortes ao micrótopo foram feitos na espessura de 12 micros e coloridos pela hematoxilina de Heidenhain. A colheita se processou desde a data da polinização até o amadurecimento dos frutos, por um período de cerca de 180 dias ; anotavam-se, então, o número de ovários colhidos e o número de ovários restantes em cada ramo, para se ter uma idéia sobre a queda normal dos ovários ; para uma avaliação mais exata, porém, desta ocorrência, em cada planta foram reservados, de cada item, diversos ramos dos quais não se colhiam ovários, anotando-se simplesmente, a espaços regulares, a queda natural e a porcentagem de frutificação.

Convém notar que, em geral, os ovários normalmente fertilizados apresentaram, após 45 dias, um aumento de tamanho que permitiu uma dissecação cada vez mais fácil ; dêse modo foi possível, a partir dessa idade, incluir os óvulos em parafina, destituídos das demais partes do ovário.

### 3 - MICROSPOROGENESE

Para o estudo da microsporogênese é necessário que se proceda à colheita do material diariamente, durante algum tempo, para se garantir a fixação das fases sucessivas, que ocorrem repentinamente, de preferência no curto espaço de uma manhã. É muito freqüente acontecer que o material colhido num dia esteja muito atrasado e que o colhido no dia seguinte esteja adiantado demais. Para maior garantia, colheram-se ramos com botões, nas vésperas do dia crítico, conservando-os em um vaso com água no laboratório ; verificou-se que neste material as diversas fases da meiose ocorriam principalmente entre meia noite e sete horas da manhã ; nas plantas das quais os ramos haviam sido colhidos, em geral o processo se atrasava de um dia, ocorrendo as suas fases sucessivas às primeiras horas do dia seguinte.

A microsporogênese foi observada apenas quanto à regularidade da distribuição dos cromossômios e ao número e tamanho dos microspórios formados.

Assim, como se pode verificar pelo quadro 1, o número de anáfases I e II que mostram irregularidades é elevado tanto numa planta com alta freqüência de chochos como em duas plantas com baixa freqüência dêse defeito ; essas anormalidades consistem no atraso da movimentação de um ou dois cromossômios para os polos ; em virtude do atraso referido, resulta às vezes a perda de um ou mais cromossômios no citoplasma ; nem sempre, porém, os cromossômios se perdem e acabam se incluindo em um dos núcleos telofásicos. Desta forma, há formação ocasional de microspórios com número diferente de 22 cromossômios (fig. 1, A-D).

QUADRO 1. — Número e porcentagem de anormalidades constatadas na microsporogênese de três plantas do café **Mundo Novo**

N.º das plantas	Classif. quanto à ocorrência de chochos	Anáfases I			Anáfases II			Tétrades		
		Nor- mais	Anormais		Nor- mais	Anormais		Nor- mais	Anormais	
		n.º	n.º	%	n.º	n.º	%	n.º	n.º	%
C P 376-5.....	Alta	92	33	26,4	262	45	17,2	947	53	5,3
C P 376-4.....	Baixa	94	19	16,7	115	26	18,4	928	72	7,2
C P 387-17.....	Baixa	81	23	22,1	81	23	22,1	1019	81	7,3

As irregularidades constatadas nas anáfases não resultam obrigatoriamente em microspórios com aparência anormal. É o que se pode apreciar no mesmo quadro 1: nas três plantas examinadas, encontrou-se apenas 5,3 — 7,3% de tétrades anormais. Esta anormalidade consistia na ocorrência de “tétrades” com número diferente de 4 células ou às vezes com número normal de células mas de tamanho diferente (fig. 1, *E-F*).

Um dos autores do presente trabalho (4) estudou em detalhe a microsporogênese em *C. arabica* L; servindo-se da variedade *semperflorens*, verificou serem raras as anormalidades do tipo aqui descrito; não encontrou cromossômios adiantados ou atrasados nos fusos anafásicos, sendo que a distribuição desigual de cromossômios pelos polos em anáfase I e anáfase II ocorre apenas em cerca de 9% dos microsporócitos; quanto aos microsporócitos com número anormal de microspórios, encontrou, na mesma variedade, apenas 1%.

Situação semelhante foi encontrada em outra variedade de *C. arabica*, isto é, na variedade *rugosa* (6).

Conclue-se, portanto, que na variedade **Mundo Novo** ocorrem irregularidades meióticas que não são encontradas com frequência em *C. arabica*.

#### 4 - O SACO EMBRIONÁRIO. FERTILIZAÇÃO. DESENVOLVIMENTO DO ENDOSPERMA E DO EMBRIÃO

##### 4.1 - INFORMAÇÃO GERAL

De cada uma das três plantas estudaram-se, isoladamente, os diversos itens referidos no capítulo “material e método”. Verificou-se que, dentro de cada planta, a seqüência de estados do óvulo nos primeiros dias após a abertura das flores era a mesma, tivessem as flores sido castradas e não polinizadas, ou tivessem sido castradas e polinizadas com o próprio pólen ou o pólen de uma das outras duas plantas, ou tivessem ainda sido livremente polinizadas. Depois do 4.º dia, porém, a marcha do processo nas flores artificial e nas livremente polinizadas, diferenciava-se da das demais.

Decidiu-se então que, dentro de cada planta, o material relativo aos quatro primeiros dias podia ser analisado em conjunto. Do 6.º dia em diante (não tivemos material do 5.º dia), podia ser analisado em conjunto o material relativo apenas às três classes de polinização controlada.

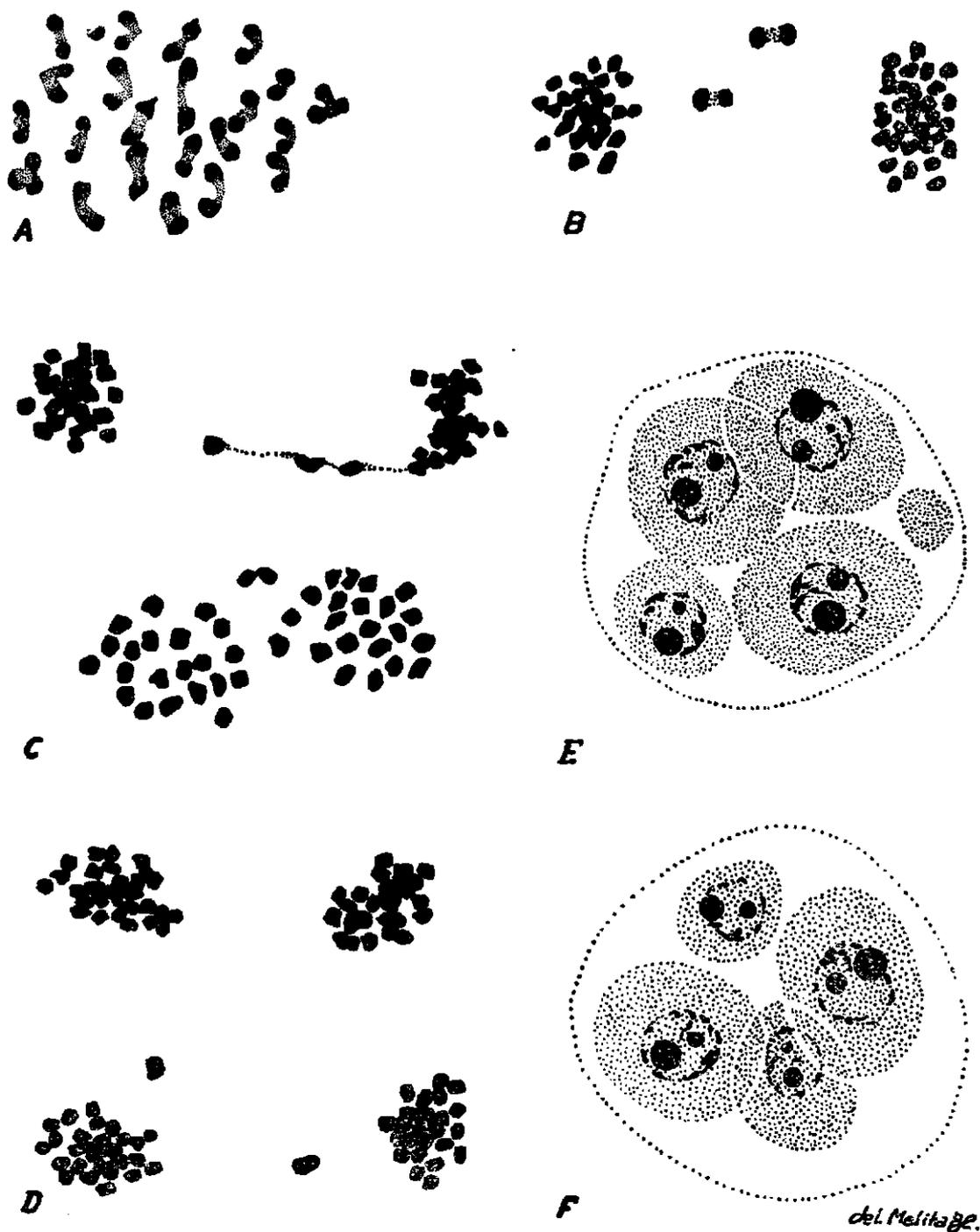


FIGURA 1. — Fases da microsporogênese no café "Mundo Novo". Planta CP 376-5. A a D: x950. E e F: x890. A — Metáfase I com 22 bivalentes. B — Anáfase I mostrando dois pares atrasados. C — Anáfase II com distribuição irregular em um dos grupos. D — Telófase II na qual são vistos dois cromossômos afastados dos demais, no citoplasma. E e F — "Tétrades" de pólen, anormais em número e tamanho.

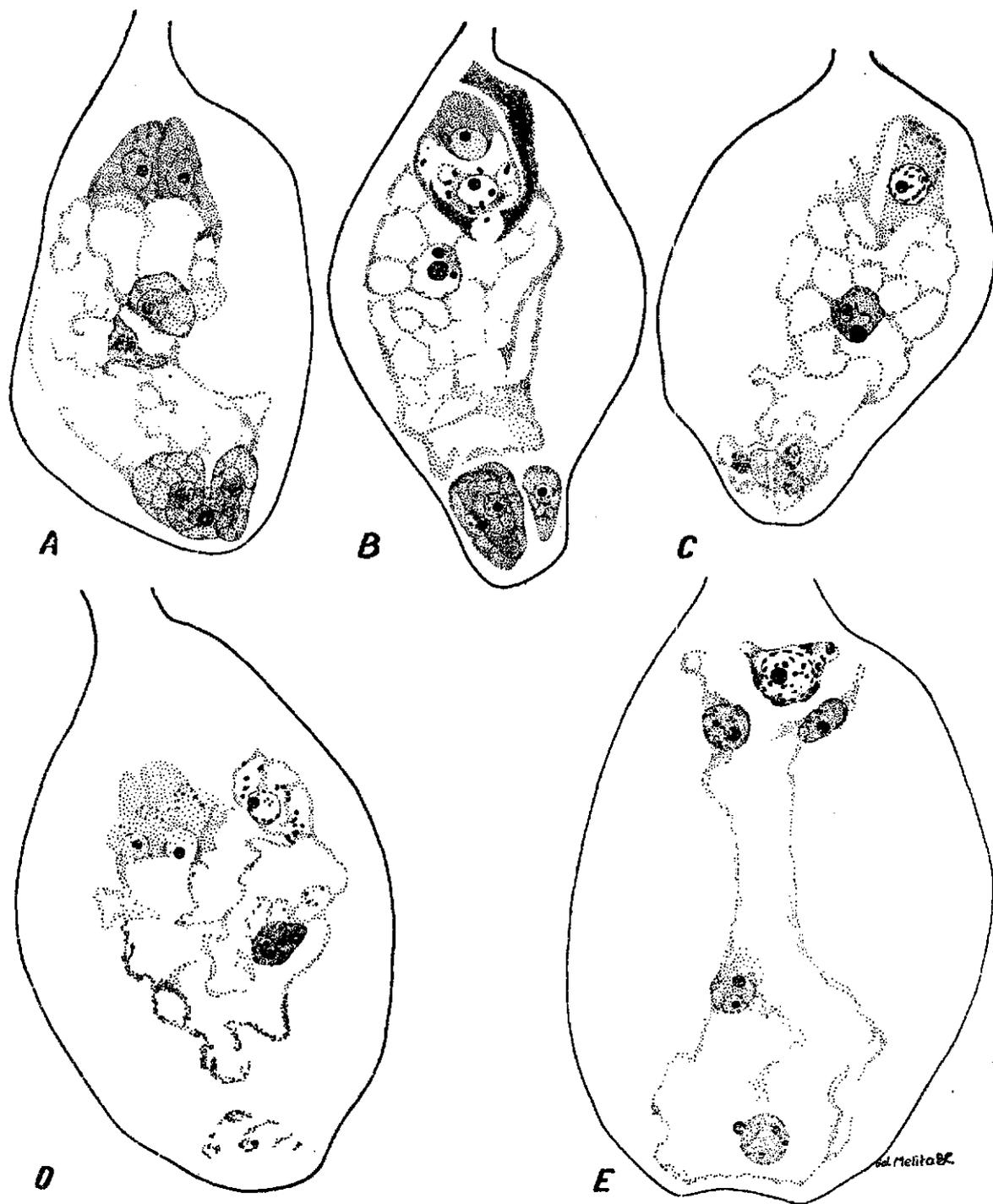


FIGURA 2. — Fertilização e desenvolvimento inicial do endosperma no café "Mundo Novo". x445. Sacos embrionários com a idade de 4, 6, 14, 36 e 53 dias após a polinização. *A* — Núcleos polares fundidos. *B* — Vestígios de tubo polínico. *C* — Núcleo primário do endosperma muito proeminente. *D* — Célula ovo pouco proeminente. *E* — Endosperma retransnucleado.

Estudado assim o material de cada planta, foi possível compará-lo entre as plantas. Observou-se que de um modo geral não há diferenças na seqüência de estágios, desde a formação do saco embrionário até o amadurecimento do fruto ; os estados se sucedem com pequena variação de datas, observando-se apenas que nas plantas **Mundo Novo** há um ligeiro atraso no processo da maturação.

Foram notadas também nestas plantas numerosas irregularidades, só raramente constatadas nas plantas **bourbon** ; estas irregularidades serão discutidas mais adiante. Será descrito em primeiro lugar, o desenvolvimento do endosperma e do embrião nas três plantas e sob as diferentes polinizações, fazendo-se abstração às irregularidades.

As observações realizadas mostraram que o processo geral do desenvolvimento do endosperma se conduz do modo já descrito anteriormente (2), diferindo, no entanto, em dois pontos : no tempo que decorre entre a polinização e a fertilização (cinco dias em vez de um dia) e no tempo que o saco embrionário permanece intacto quando não fertilizado (27 dias em vez de 15), respectivamente no presente material e naquele estudado anteriormente.

#### 4.2 - MARCHA GERAL DO PROCESSO

##### 4.2.1 - NAS POLINIZAÇÕES CONTROLADAS

Por ocasião da abertura das flores, e até quatro dias depois, encontram-se sacos embrionários ainda incompletos, nos estados tetra- e octanucleados. Aos quatro dias os núcleos polares já podem se apresentar fundidos (fig. 2, A). No 6.º dia esta fusão é constatada em quase todos os sacos embrionários, observando-se a presença do tubo polínico na cavidade (fig. 2, B). Após a fertilização, desaparecem gradualmente as antípodas e as sinérgidas ; aos 11 e aos 14 dias, em geral já tinham degenerado essas células, restando no interior do saco embrionário apenas a célula óvo com o citoplasma cheio de inclusões e o núcleo primário do endosperma, muito proeminente (fig. 2, C). A primeira divisão do núcleo do endosperma ocorre somente depois dos 14 dias, porém, até mesmo aos 36 dias ainda se encontram núcleos indivisos ao mesmo tempo que sacos embrionários com endospermas bi- e tetranucleados ; a cavidade do saco embrionário cresce bastante dos 14 aos 36 dias ; a célula óvo se torna arredondada, porém pouco proeminente (fig. 2, D).

Aos 42 dias já se distinguem na planta, pelo tamanho, os ovários fertilizados dos não fertilizados ; aquêles são maiores e êstes, fadados a se desprender, não crescem mais ; a degenerescência dos óvulos não fertilizados é semelhante à dos óvulos das flores não polinizadas, como veremos adiante.

Entre os ovários que vão frutificar distinguem-se ainda dois tipos : a) aquêles em que os dois óvulos foram fertilizados ; b) aquêles em que apenas um óvulo foi fertilizado.

No primeiro caso os dois óvulos crescem rapidamente e na face em que se juxtapõem tornam-se planos e achatados ; quando um dos óvulos aborta, o perisperma da loja contígua força o septo que a separa da outra loja e, não encontrando resistência, empurra-o de encontro à parede dorsal da cavidade. Conseqüentemente, uma das lojas se reduz a uma fenda contendo o óvulo

abortado ; na outra loja desenvolve-se um óvulo que toma a forma arredondada.

No primeiro caso desenvolvem-se dois grãos "chatos" e no segundo, um grão "moca".

A partir desta data, observa-se uma ligeira tendência para que a marcha do processo se acelere mais no **bourbon** do que no **Mundo Novo**. Aos 53 dias, o endosperma do **Mundo Novo** tem 2 a 20 núcleos (fig. 2, *E*) ; o do **bourbon** tem 30 a 50 núcleos (fig. 3, *A*). Em geral o endosperma de 20 núcleos e até menos, já tem estrutura celular. Aos 63 dias, contam-se 8 a 50 células no endosperma do **Mundo Novo** e cêrca de 120 no endosperma do **bourbon**.

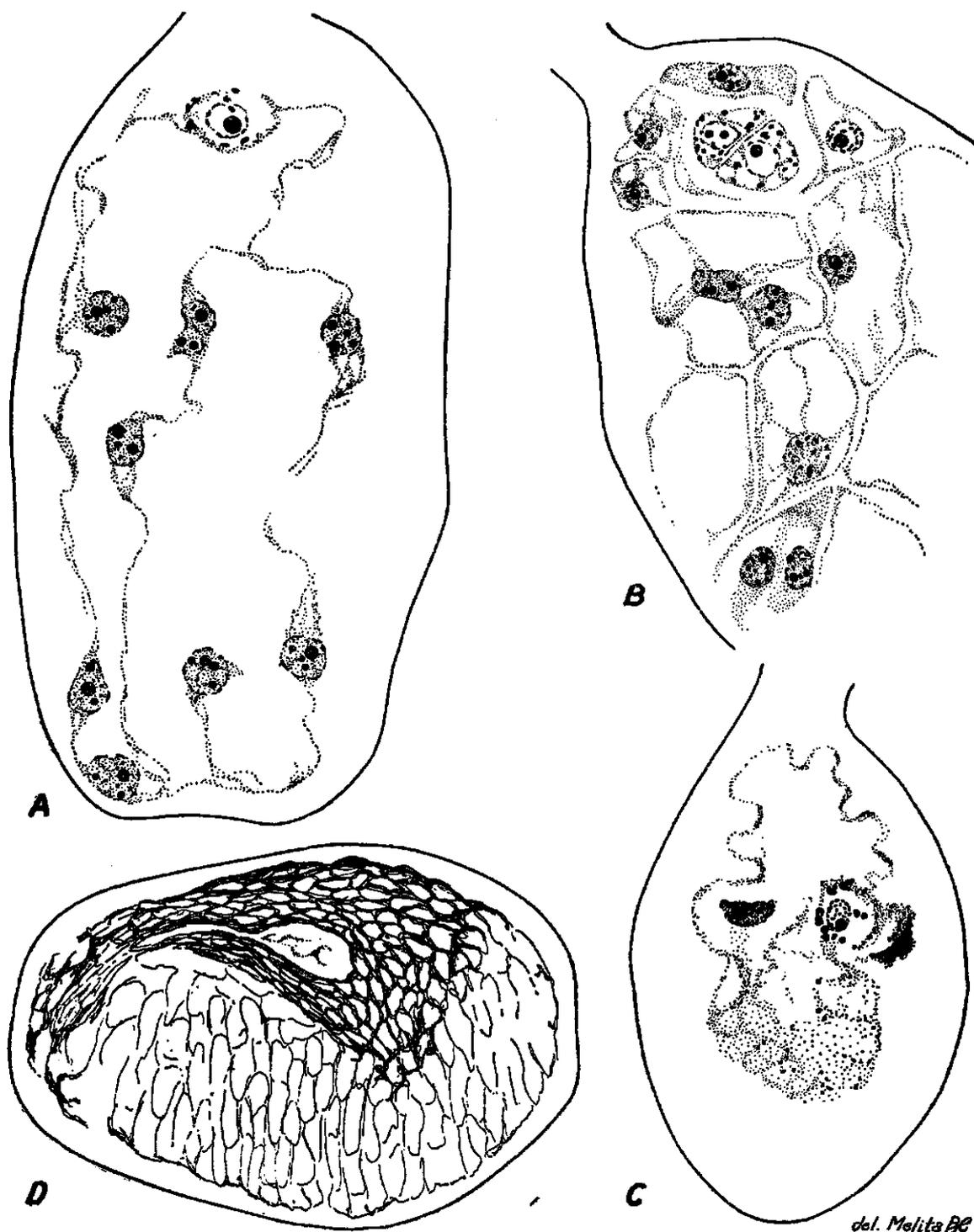
A distinção de tamanho dos ovários é perfeita aos 74 dias : todos os classificados na colheita como "pequenos" tinham os dois óvulos degenerados ; os "grandes", podiam, pela forma, ser divididos em "normais" e "mocas" ; os primeiros tinham dois óvulos desenvolvidos, os últimos tinham um óvulo desenvolvido e um degenerado.

Nesta idade, os óvulos desenvolvidos já podem ser facilmente destacados do ovário ; apresentam-se com o aspecto de sementes pequenas, constituídas ainda de tecido materno (perisperma), em cujo interior cresce o endosperma ; êste, todavia, não é revelado pela dissecção, nem visível sob o aumento de uma lupa (48 x) ; quando muito se observa, às vêzes, uma ligeira depressão no local onde êle deve estar se desenvolvendo. O exame microscópico destas pseudo sementes, de perisperma, revela, porém, em seu interior, endosperma de forma alongada, com um número de células que varia desde 14 até 200 ou mais no **Mundo Novo** ; no **bourbon**, torna-se impossível contá-las. Numa das extremidades do endosperma, observa-se a célula ôvo, em geral indivisa ; em alguns casos, ela já se dividiu e o embrião incipiente tem 2 a 4 células (fig. 3, *B*).

Aos 90 dias ainda há ovários não desenvolvidos presos à planta, porém a maior parte dêles já se desprende ; apresentam invariavelmente os dois óvulos abortados. Os ovários bem desenvolvidos já são pequenos frutos ; dêste ponto para a frente, o óvulo cresce com rapidez, desenvolvendo-se também o endosperma e dentro dêste o embrião. Na variedade **bourbon** o endosperma pode ser visto a olho nú (fig. 4, *B*) ; ocupa aproximadamente 1/10 do volume do perisperma, tem uma côr leitosa e é de consistência mole ; o embrião ainda não se revela ao exame macroscópico. No café **Mundo Novo** o endosperma não é visível sob o aumento de uma lupa ; ao microscópio porém, vê-se que é bem desenvolvido e apresenta um embrião de 5 a 12 células.

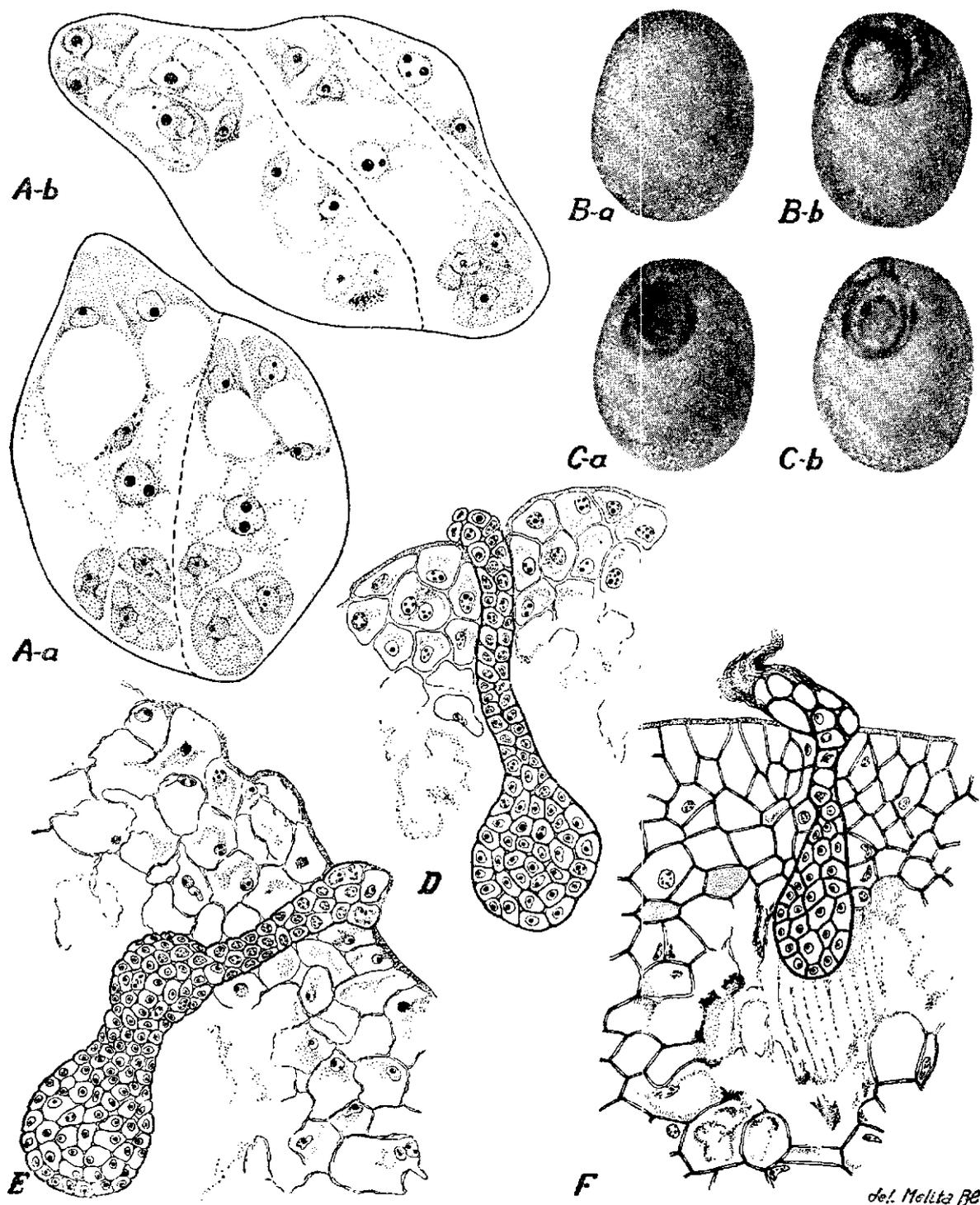
Aos 120 dias as "sementes" têm quase o tamanho normal ; tanto numa como noutra variedade o perisperma vai cedendo rapidamente o lugar ao endosperma, que passa a ocupar de 7/10 a 9/10 do seu volume ; tem-se então uma semente de endosperma leitosa e pouco consistente, envolvida por uma camada mais ou menos grossa de perisperma esverdeado ; dentro do endosperma, o embrião facilmente se destaca, pela sua forma característica e pela sua consistência dura.

Tanto numa como noutra variedade foram observados casos em que não havia embrião dentro do endosperma, e também casos de ausência de endosperma.



del. Melita BC

FIGURA 3. — *A e B* — Variedade bourbon. Sacos embrionários com a idade de 53 a 74 dias após a polinização. x445. *A* — Endosperma multinucleado. *B* — Endosperma multi-celular; primeira divisão da célula ovo. *C e D* — Café "Mundo Novo". *C* — Saco embrionário 42 dias após a castração. x445. As últimas estruturas a degenerar são a oosfera e o núcleo do saco embrionário. *D* — óvulo 74 dias após a castração. x67. A degenerescência completa de fora para dentro atinge o saco embrionário.



de! Melita B2

FIGURA 4. — *A* — Sacos embrionários duplo e triplo na variedade "Mundo Novo". x445. *B* — Variedade *bourbon*. Óvulo extraído de fruto com 90 dias. x10. *Ba* — Não se nota, externamente, qualquer sinal de endosperma; *Bb* — O endosperma é encontrado no interior do óvulo pela dissecação. *C* — Variedade "Mundo Novo". Óvulo extraído de fruto com 120 dias. x10. *Ca* — Observa-se externamente uma depressão de coloração mais escura. *Cb* — A dissecação revela o endosperma discóide. *D a F* — Variedade "Mundo Novo". x140. *D* — Disco de 111 dias; bordos meristemáticos; embrião normal. *E* — Disco de 126 dias; crescimento paralizado; embrião anormal. *F* — Endosperma cujo crescimento foi paralizado e se tornou rijo; embrião normal aparentemente.

Aos 145 dias o endosperma alcança seu tamanho normal e torna-se rijo; entretanto, o fruto ainda continua a crescer; aparentemente este crescimento se dá apenas no pericarpo, e o mesocarpo se transforma numa polpa adocicada à medida que o fruto amadurece.

Na planta **bourbon**, o fruto aumenta de volume até os 180 dias mais ou menos; nessa idade ele está maduro; a semente é então constituída de uma massa de endosperma córneo, envolvida por uma película fina, a futura película prateada; dentro do endosperma, um embrião normal ocupa uma posição análoga àquela que o endosperma ocupava dentro do perisperma, no início do desenvolvimento; em alguns casos há dois embriões e noutros casos não há embrião.

Nas plantas **Mundo Novo** o aumento de volume dos frutos se processa até mais tarde. Aos 190 dias tem início a maturação na planta de baixa frequência de chochos; aos 207 dias nela se colhem os frutos maduros. Na planta de alta frequência de chochos os frutos estão ainda verdes aos 207 dias; aos 222 dias colhem-se nela os primeiros frutos maduros.

#### 4.2.2 - BOTÕES EMASCULADOS

Nos botões castrados e não polinizados, o saco embrionário permanece intacto até os 27 dias; aos 32 dias inicia-se a sua desintegração: as antípodas degeneram, os núcleos polares se tornam amebóides e enegrecidos; na oosfera observam-se as inclusões citoplasmáticas características de sua idade (fig. 2, *E*); aos 42 dias as antípodas já desapareceram ou se colorem fracamente; os últimos elementos a desaparecer são os núcleos polares e a oosfera (fig. 3, *C*). Aos 63 dias nada mais há dentro da cavidade; esta, porém, é grande; não há "colapso" das células que a contornam; o óvulo, que crescera muito pouco depois da abertura da flor, degenera de fora para dentro; aos 74 dias a degenerescência atinge o saco embrionário, que se converte numa fenda alongada e estreita; o óvulo é então uma pequena massa de células degeneradas (fig. 3, *D*). O ovário pode permanecer ainda algum tempo na planta e até mesmo não cair, a não ser por ocasião da maturação dos demais frutos; porém, não cresce e nunca se obteve um único fruto a partir de flor não polinizada.

#### 4.2.3 - POLINIZAÇÃO LIVRE

Nos ovários de flores livremente polinizadas, também só se observou sinal de penetração do tubo polínico no saco embrionário, no 6.º dia, tal como foi observado nas plantas de polinização controlada. O material correspondente à polinização livre apresentou, nas diversas idades, sacos embrionários não fertilizados, em frequência maior do que a encontrada nos três tipos de polinização controlada. Isto indica, possivelmente, que a polinização controlada foi mais eficiente que a livre.

#### 4.3 - IRREGULARIDADES NO SACO EMBRIONÁRIO

Em ambas as plantas estudadas do café **Mundo Novo**, numerosas anormalidades são encontradas nos sacos embrionários; o observador não pode precisar, sem uma análise ulterior dos dados, se elas são menos freqüentes

numa ou noutra planta. Sobressaem entre as anormalidades, os **sacos embrionários duplos**, isto é, cavidades em que se encontram dois conjuntos de células de saco embrionário; estas células podem estar arrançadas na maneira usual e cada sistema se assemelhar a um saco embrionário normal, ou podem estar irregularmente arrançadas; às vêzes um dos sistemas é normal e o outro anormal; outras vêzes faltam células em um deles ou nos dois (fig. 4, A).

Outras anormalidades que ocorrem são: a) **núcleos ou células extra-numerárias**: em vez de oito, encontram-se até 18 núcleos; b) **núcleos ou células indiferenciadas**; c) **sacos embrionários triplos**; d) óvulos sem vestígio de saco embrionário; e, finalmente, e) casos diversos, difíceis de classificar.

As anomalias atrás enumeradas são encontradas tanto em ovários jovens (no dia da abertura da flor) como em ovários velhos, até os 42 dias. Nestes últimos, porém, as anormalidades mais freqüentes são: a) sacos embrionários em degenerescência; b) óvulos em degenerescência.

A partir dos 42 dias, podem se classificar, pelo tamanho, os ovários que vão dar formação a frutos; os ovários fadados a cair, não crescem mais. O exame ao microscópio mostrou que os ovários não desenvolvidos traziam invariavelmente seus óvulos degenerados; nos ovários grandes, as lojas eram preenchidas pelo perisperma, que, como já dissemos quando descrevemos a formação normal das sementes, cresce bastante em volume e, mais tarde, acaba sendo substituído pelo endosperma que se desenvolve em seu interior.

Na planta que serviu de contróle, da variedade **bourbon** (Co 663), o observador verifica desde logo que as anormalidades são menos freqüentes; quanto ao tipo das anormalidades, também se observa que os sacos embrionários duplos e suas variações, que constituem a mais freqüente aberração no **Mundo Novo**, só raríssimas vêzes ocorrem no **bourbon**.

Para que os dados numéricos pudessem ser comparados, foram reunidas no quadro 2 as freqüências das anomalias nas três plantas. As observações se referem a material colhido desde o 1.º até o 42.º dia após a abertura das flores. Vê-se então que no 1.º e 2.º dias, a ocorrência de anomalias nas duas plantas **Mundo Novo** é muito maior que no **bourbon**, sendo que na de alta porcentagem de chochos ainda ela é maior que na de baixa porcentagem. Há uma bem perceptível diminuição de anormalidades do 1.º ao 6.º dia, nas três plantas; daí em diante os dados se mostram mais variáveis notando-se que, nos dias subseqüentes, havia uma tendência para estabilização ou para uma leve diminuição; aos 42 dias, as três plantas apresentam uma porcentagem de anormalidades muito próxima da encontrada no 6.º dia e situam-se nas mesmas posições relativas quanto ao número das anormalidades: a planta C P 376-5 tem mais anomalias que a C P 387-17 e esta, por sua vez, mais que a Co 663.

A diminuição nas porcentagens de sacos embrionários anormais poderia ser atribuída a uma eliminação, pela planta, de ovários anormais. Com o fim especial de conhecer o grau de diminuição natural do número de ovários, foram conservados, desde o início, diversos ramos correspondentes a todos

QUADRO 2. — Número e porcentagem de sacos embrionários anormais nas três plantas estudadas

Idade (*)	Bourbon homozigoto Co663				Mundo Novo							
					Baixa % de "chochos" CP 387-17				Alta % de "chochos" CP 376-5			
	Total	Nor- mais	Anormais		Total	Nor- mais	Anormais		Total	Nor- mais	Anormais	
dias	n.º	n.º	n.º	%	n.º	n.º	n.º	%	n.º	n.º	n.º	%
1-2 -----	27	22	5	19	71	44	27	38	81	39	42	52
4 -----	16	15	1		21	16	5		22	13	9	
6 -----	20	17	3		18	14	4		22	15	7	
3-6 -----	36	32	4	11	39	30	9	23	44	28	16	36
8 -----	19	19	0		31	27	4		36	27	9	
11 -----	18	16	2		12	6	6		13	9	4	
7-11 -----	37	35	2	5	43	33	10	23	49	36	13	27
14 -----	10	9	1		19	13	6		18	9	9	
16 -----	11	11	0		19	17	2		21	12	9	
13-16 -----	21	20	1	5	38	30	8	21	39	21	18	46
20 -----	7	5	2		8	8	1		12	11	1	
23 -----	10	9	1		18	11	7		16	15	1	
19-23 -----	17	14	3	18	26	19	8	30	28	26	2	7
27 -----	11	7	4		11	8	3		16	10	6	
32 -----	8	6	2		14	10	4		15	14	1	
24-32 -----	19	13	6	32	25	18	7	28	31	24	7	23
33-36 -----	10	9	1	10	13	10	3	23	12	11	1	8
37-42 -----	9	8	1	11	18	13	5	28	13	8	5	38

(\*) N.º de dias decorridos a partir da data da abertura da flor.

os itens, nos quais não se faziam colheitas, reservando-os apenas para contagens periódicas dos ovários caídos naturalmente.

Os dados relativos a estas observações foram reunidos no quadro 3 e classificados em três períodos : até o 42.º dia, do 43.º ao 110.º dia e do 111.º ao 180.º dia. Para cada período estabelecido foi calculada a queda porcentual média de cada planta, para o que foram utilizados apenas os dados das polinizações controladas. Nas três plantas a queda dos ovários foi mais pronunciada no 2.º período ; a queda foi insignificante até o 6.º dia, justamente o período em que a diminuição de anomalias nos sacos embrionários foi mais sensível. Não se pode portanto, atribuir esta diminuição inicial de anomalias à queda dos ovários.

### 5 - DESENVOLVIMENTO DO FRUTO CHOCHO. O "ENDOSPERMA DISCÓIDE" (1) E OUTRAS ESTRUTURAS ANORMAIS

Como já foi dito, a partir dos 42 dias podem se separar os ovários que têm os dois óvulos degenerados, daqueles que têm pelo menos um óvulo

(1) A denominação de "disco" é a mais sugestiva para esta estrutura ; porém, no fruto do café há uma região à qual já se consagrou esse nome ; tendo-se verificado que a estrutura que estamos estudando é de natureza endospermica, chamá-la-emos de "endosperma discóide" ; para facilidade de expressão, no entanto, ocasionalmente usaremos a palavra "disco", quando a ela nos referirmos.

normal e que, salvo queda, frutificarão. Tendo verificado que os ovários não desenvolvidos, colhidos nos dias subseqüentes, tinham invariavelmente os dois óvulos degenerados, passou-se a estudar o que acontece aos ovários que frutificam ; o processo normal do desenvolvimento da semente, tanto na variedade **bourbon** como no café **Mundo Novo**, já foi atrás descrito, consistindo em essência, no desenvolvimento de um perisperma transitório que é substituído por um endosperma e um embrião.

Até os 90 dias, porém, examinada com uma lupa, a semente se apresenta constituída de perisperma unicamente ; o endosperma nêle incluso só pode ser visto em cortes examinados ao microscópio. Até essa data, ainda não há cavidades "chochas" ; sejam as lojas uma, duas ou mais, estão elas cheias de perisperma.

A dissecção do perisperma aos 111 dias, revelou nas três plantas, duas coisas diferentes : a) um endosperma mole, em franco desenvolvimento, de côr leitosa, ocupando o que se podia avaliar aproximadamente em 1/5 a 1/4 do volume do perisperma ; dentro dêsse endosperma, um embrião minúsculo, ainda indiferenciado, e às vêzes invisível mesmo à lupa ; b) ausência de endosperma (caso raro). Na planta C P 376-5, ainda um terceiro aspecto pôde ser revelado pela dissecção : ausência de endosperma normal e aparecimento, em seu lugar, de uma estrutura nova, consistente, de forma circular e achatada, de 2 a 3 mm de diâmetro e que será chamado aqui de "disco" (fig. 4, C).

O perisperma ainda é carnoso, consistente, aos 120 dias ; o tamanho da pseudo semente de perisperma, que encerra o "disco", não difere do da semente verdadeira, de endosperma, preenchendo, como esta, tôda a loja do ovário. Os "discos" não são maiores que os encontrados aos 111 dias : medem cêrca de 2 a 3 mm de diâmetro.

Aos 145 dias, quando nas sementes normais o endosperma se enrijesse, as "sementes" de perisperma ainda são túrgidas ; o "disco" não aumenta de tamanho, mas também se enrijesse e sua côr se torna pardacenta. Aos 165 dias a situação é a mesma dos 145 dias.

Aos 190 dias, as sementes de endosperma já estão bem duras ; os frutos começam a amadurecer na planta de baixa freqüência de chochos ; as sementes de perisperma murcham e se tornam membranosas, constituídas agora pela epiderme e mais algumas camadas de células adjacentes que persistem. O "disco" se torna bem visível externamente. Em um caso verificou-se a existência de um "disco" acompanhado de uma massa adjacente, muito maior que êle, talvez um embrião gigante ou um endosperma anormal.

Aos 207 dias os frutos ainda estão verdes na planta de alta freqüência de "chochos", mas as sementes já atingiram tamanho definitivo. Nas lojas de perisperma êste tecido murcha ainda mais e um espaço vazio aparece entre o endocarpo fibroso e a membrana de perisperma, dentro da qual o "disco" é duro e de côr escura ; à loja com um tal **espaço vazio** é que se chama de "**chocho**".

Aos 222 dias, há frutos verdes e maduros na planta de alta freqüência de "chochos". Colhidos todos, foram analisados separadamente quanto ao



QUADRO 4. — Número e porcentagem de óvulos abortados e desenvolvidos em frutos verdes e maduros da planta C P 376-5, colhidos com a mesma idade (222 dias)

N.º de frutos e estado de maturação	Óvulos				
	Total	Abortados		Desenvolvidos	
	n.º	n.º	%	n.º	%
Verdes (38) -----	76	28	37	48	63
Maduros (119) -----	233	36	15	197	85

número de óvulos abortados e desenvolvidos (quadro 4). Os óvulos que se desenvolveram foram por sua vez analisados quanto à presença de endosperma ou de perisperma (quadro 5).

QUADRO 5. — Número e porcentagem de sementes de endosperma e de perisperma ("Chochos") em frutos verdes e maduros da planta C P 376-5, colhidos com a mesma idade (222 dias)

Estado de maturação	Óvulos desenvolvidos	Endosperma	Perisperma						
			C/ disco		S/ disco		Total		
			n.º	%	n.º	%	n.º	%	
Verdes -----	48	18	38	21	44	9	18	30	62
Maduros -----	197	177	90	10	5	10	5	20	10
Total -----	245	195	80	31	13	19	7	50	20

Examinados separadamente, os frutos verdes e maduros mostraram sensível diferença na freqüência dos "mocas" e dos "chochos": os frutos que atingiram a maturação em primeiro lugar tinham uma freqüência menor de óvulos abortivos ("mocas"); além disso, os seus óvulos desenvolvidos deram uma freqüência muito maior de endospermas do que de perispermas.

Não fossem os frutos aqui classificados em verdes e maduros, provenientes de polinização controlada, o observador poderia supor que proviessem de sucessivas floradas e poderia atribuir as diferenças encontradas a variáveis condições externas que tivessem influido sôbre a polinização ou mesmo sôbre a meiose.

Parece que se pode concluir que os frutos normalmente constituídos, com duas sementes, têm uma capacidade de maturação mais rápida que os "mocas" e que mesmo êstes amadurecem mais rapidamente que os "chochos". Donde também se conclue que, num estudo comparativo de freqüência tanto

xilina, mostra uma estrutura celular idêntica à do endosperma e, como êste, encerra um "embrião".

O "disco" de constituição recente, e portanto pequeno (111 dias, flor autofecundada), apresenta os bordos meristemáticos como os de um endosperma normal; em seu interior desenvolve-se um embrião (fig. 4, *D*).

A atividade celular do "disco" decresce à medida que êle se desenvolve. O "disco" adulto tem uma côr pardacenta e seu diâmetro raramente passa de 3 mm. As suas células não mais se dividem e muitas entram em degenerescência.

O embrião de um "disco" novo é uma estrutura aparentemente normal, que se diferencia em "corpo" e "suspensor"; suas células são menores que as do tecido que o envolve, e dividem-se ativamente, permanecendo meristemáticas durante um tempo maior que o disco. De um certo ponto em diante, que coincide com a diminuição de atividade das células do disco, o desenvolvimento do embrião deixa de ser normal: aparece um entumescimento, à semelhança de um segundo "corpo" entre o primeiro e o "suspensor"; ao cessar a atividade celular, o embrião tem, assim, uma estrutura característica, muito diferente de um embrião normal (fig. 4, *E*).

O "disco" é um endosperma anormal. Considerado, porém, como "disco", a sua estrutura normal é a que acabamos de descrever; e dentro do caso normal, um caso "anormal" também foi constatado: um disco em cujo interior se desenvolviam quatro embriões, dos quais dois eram normais (e como normais se tornavam "gigantes" dentro do pequeno disco) e dois eram pequeninas massas celulares pouco diferenciadas.

#### 5.4 - OUTRAS ESTRUTURAS

O endosperma jovem com apenas algumas centenas de células, tem uma forma oval ou de balão, determinada pelo saco embrionário. Sua consistência é quase idêntica à do perisperma que o envolve; seu tecido é aquoso, hialino; com um bisturi, cuidadosamente, pode ser destacado do perisperma, desde que não se fira sua epiderme, pois que então o líquido celular extravasante confunde-se com o do perisperma, e nada mais se distingue.

Às vêzes, em frutos já de adiantado desenvolvimento, o endosperma se atrasa e suas células se enrijessem ainda nêste estágio inicial. Ê então muito fácil destacar e manipular um endosperma nêste estado, que se parece com um grão de arroz em miniatura ou um ovo de inseto; as células de um endosperma nêste estado são poliédricas, de parede espessada. O incipiente embrião, em forma de "porunga", tem células menores e citoplasma mais denso (fig. 4, *F*).

Depois da forma oval que atinge dentro do saco embrionário, o endosperma em crescimento se achata e gradativamente vai se transformando numa concha cada vez maior, de consistência leitosa, a qual vai tomando o lugar da massa de perisperma; acompanhando as voltas do perisperma, êle atinge, finalmente, o tamanho e a forma da semente normal; só depois disso é que o tecido se endurece e se torna córneo.

Em alguns casos, o endosperma se atrasa no crescimento e, quando atinge a forma de concha, já o seu tecido se torna córneo, paralisando o crescimento ; esta paralisação pode se dar a qualquer momento e deve ser uma função do amadurecimento do fruto ; se o mesmo atingiu a idade do amadurecimento e o endosperma está ainda em desenvolvimento, êste paralisa e daí a razão de se encontrarem conchas menores ou maiores.

Um "concha" (2) ainda não muito rijo, examinado ao microscópio, revela uma estrutura celular idêntica à do endosperma ; seu embrião, incipiente ou adiantado, não difere de um embrião normal. Tanto no endosperma (bordos) como no embrião, as células se mostram em atividade.

## 6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No desenvolvimento do fruto de café há três fases distintas : a primeira, na qual o óvulo é formado no interior do ovário ; a segunda, decorrente da fertilização, que se caracteriza pelo rápido crescimento do óvulo e do ovário ; nesta fase a semente já é delineada pelo perisperma transitório ; finalmente, a terceira fase em que êsse perisperma é substituído pelo endosperma contendo em seu interior um embrião. Quando tudo corre normalmente, em cada fruto resultam duas sementes normais que são do tipo conhecido como "chato".

No caso em estudo, isto é, ausência de semente em uma ou nas duas lojas do fruto, há uma interrupção do processo normal atrás apontado, justamente na terceira fase ou seja, na substituição do perisperma pelo endosperma, a qual não se realizando dá como resultado a degenerescência do perisperma e a loja vazia.

Esta degenerescência "tardia" por assim dizer, deve ter uma causa diferente da degenerescência "precoce" que também pode ser observada. No segundo caso, o óvulo degenera no decorrer da primeira fase, seja por um defeito inerente ao próprio óvulo ou seja pela falta de polinização, qualquer destas causas impedindo a fertilização. Se isto ocorrer em ambos os óvulos, o fruto não chega a se desenvolver ; se apenas em uma das lojas, resulta um fruto de uma semente que é do tipo "moca" ; sempre que se impediu a polinização houve degenerescência prematura de ambos os óvulos e o fruto não se desenvolveu.

A degenerescência tardia não resulta da falta de polinização ; pelo contrário, as polinizações controladas permitiram mostrar que só ocorrem lojas vazias ("chochos") quando há polinização (3).

Estabelecido êste fato, infere-se que o "chocho" é determinado por alguma coisa que acontece **após** a polinização ; a origem dessa "alguma coisa" poderia estar no pólen, no próprio óvulo ou ainda em ambos.

(2) Se bem que o termo "concha" seja o mais apropriado para endospermas assim abortados, já é êle universalmente adotado sempre que endospermas imbricados se desenvolvem dentro de uma mesma loja do ovário. No caso presente, usamos a palavra "concha" apenas como a mais explicativa.

(3) Outros estudos em andamento e que não são discutidos no presente trabalho, mostram que não é apenas necessária a polinização para a frutificação, mas que o tubo polínico penetre no interior do ovário, sendo de se presumir que haja necessidade de fertilização.

Uma pequena porcentagem de "chochos" ocorre em tôdas as variedades de café, parecendo tratar-se de um mal fisiológico ; o exame dos restos de perisperma no interior de uma loja "chocha" pode revelar, por vêzes, um embrião pequeno ou gigante, um tecido anormal qualquer ou pode nada revelar. No café **Mundo Novo**, porém, a alta porcentagem de "chochos" é uma ocorrência específica de certas plantas ; êste acréscimo constatado corresponde à formação de um endosperma "discóide" em substituição ao endosperma normal ; as plantas de alta porcentagem de "chochos" apresentam o endosperma discóide e nas de baixa porcentagem de "chochos" essa estrutura não ocorre. A maior ocorrência de chochos não é devida, portanto, a uma simples intensificação de um processo, talvez fisiológico, mas sim a um novo processo, que é a formação dos "discos". Em investigar a origem dos "discos" se resume o problema.

O exame da microsporogênese mostrou uma freqüência relativamente alta de irregularidades numa planta de "disco" ; numa planta "normal" (baixa porcentagem de chochos), as mesmas irregularidades foram constatadas.

Também a alta freqüência de sacos embrionários anormais foi verificada tanto num como no outro tipo de planta. Embora a freqüência tenha sido um pouco menor na planta de baixa porcentagem de lojas vazias, a pequena diferença encontrada não justifica a diferença patente entre as porcentagens de "chochos" e nem a presença ou ausência de "discos".

O "endosperma discóide", portanto, não pode se originar das anomalias citológicas constatadas.

O fato de poderem ser, as plantas de café **Mundo Novo**, classificadas em dois grupos, de **caracteres alternativos**, sugere imediatamente a existência de um contrôle genético do processo.

E como uma hipótese de trabalho, pode-se admitir que a planta onde ocorrem endospermas discóides seja heterozigota para um dado par de fatores Dd. Autofecundada, suas sementes teriam uma das constituições seguintes :

Endosperma	Embrião
1) DDD -----	DD
2) DDd -----	Dd
3) ddD -----	Dd
4) ddd -----	dd

A combinação ddd/dd corresponderia ao **disco** e seria portanto, inviável ; as demais combinações produziriam sementes e embriões normais. Destas sementes resultariam plantas **normais** e plantas **de disco** na proporção de 1:2. Infere-se, ainda, que não deverão existir plantas de constituição genética dd, cujos frutos teriam somente endosperma discóide.

Se a hipótese genética for correta, uma planta **de disco** (Dd) quando polinizada por uma planta **normal** (DD) não deve produzir endosperma discóide, isto é, as lojas vazias poderão ser controladas por uma polinização adequada. Na realidade, quando se praticou essa polinização usando o pólen

de **bourbon** que deverá ser **DD**, não houve formação de disco ; já quando o pólen usado foi da planta **Mundo Novo** sem disco, que também deve ser **DD**, apareceram uns poucos discos, para os quais não se encontrou explicação, a não ser numa emasculação mal feita.

## CYTOLOGY OF THE DEVELOPMENT OF EMPTY FRUITS IN THE MUNDO NOVO COFFEE

### SUMMARY

The occurrence of a small number of fruits with empty locules is common for all varieties of *Coffea arabica* L. and seems to be a physiological phenomenon. Many plants of the Mundo Novo coffee, however, show a high degree of this abnormality. Since this character is undesirable in a commercial variety, a cytological investigation was undertaken to determine its cause.

The microsporogenesis in a plant of Mundo Novo coffee with high percentage of empty fruits presented irregularities in the anaphasic distribution of chromosomes ; the same irregularities were found in a plant of the same variety that showed low percentage of empty fruits. The frequency of anaphasic disturbances in both was higher, however, than that in a Bourbon plant.

A certain degree of abnormalities was present in the development of the embryo-sac of the same two plants of Mundo Novo. These abnormalities are not commonly found in Bourbon plants.

The study of fruits at different ages revealed that in the plant with a high percentage of empty fruits, the increase in the number of these was due to an arrest in the endosperm development at a certain stage, leading to the formation of a small, disc-shaped endosperm. This "discoid endosperm" did not occur in fruits of the Mundo Novo plant that showed low percentage of empty locules, nor in fruits of the Bourbon plants.

The development of the endosperm in four other plants of Mundo Novo coffee that showed high frequency of empty locules and in four plants with low frequency of this abnormality was also compared. Again, the "discs" or the "discoid endosperms" were found only in plants with high frequency of empty locules. Also, they accounted for the excess in number of empty locules when plants of the two groups were compared.

The present observations indicate that the high number of empty fruits found in certain plants of Mundo Novo coffee is not an increase in frequency of a phenomenon which normally occurs in coffee. It results from an independent and abnormal process that induces an arrest in the endosperm development at a definite stage and reduces it to a characteristic disc shape.

It is suggested that the process leading to the formation of disc-shaped endosperm is genetically controlled by a recessive gene **d**. Plants that show "discoid endosperm" are heterozygous **Dd**, and the double recessive condition is lethal. Consequently, the development of endosperm of the condition **ddd** is arrested in the initial stages and a disc is formed in its place. Normal plants are homozygous **DD**.

### LITERATURA CITADA

1. CARVALHO, A., KRUG, C. A., MENDES, J. E. T. [e outros]. Melhoramento do cafeeiro. IV. Café Mundo Novo. *Bragantia* 12:[97]-130. 1952.
2. MENDES, A. J. T. Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development. *Amer. J. Bot.* 28:784-798. 1941.
3. ———— Observações citológicas em *Coffea*. XI. Métodos de tratamento pela colchicina. *Bragantia* 7:[221]-230. 1947.

4. ———— Observações citológicas em *Coffea*. XV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 10:[79]-87. 1950.
5. ———— Partenogênese, partenocarpia e casos anormais de fertilização em *Coffea*. *Bragantia* 6:[265]-274. 1946.
6. **MEDINA, DIXIER M.** Observações citológicas em *Coffea*. XIV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K. M. C. *Bragantia* 10:[61]-66. 1950.
7. **RANDOLF, L. F.** A new fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Tech.* 10:95-96. 1935.