INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM HÍBRIDOS DE CAFÉ ARABUSTA (*C. ARABICA* CV BOURBON VERMELHO X *C. CANEPHORA* CV ROBUSTA)

LAÍS MOREIRA GRANATO

Orientadora: Cecília Alzira Ferreira Pinto-Maglio

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Campinas, SP
Maio 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

G748c Granato, Laís Moreira
Comportamento meiótico em híbridos de café arabusta (*C. arabica* cv Bourbon Vermelho X *C. canephora* cv Robusta) / Laís Moreira Granato Campinas, 2010. 91 fls.

Orientadora: Cecília Alzira Ferreira Pinto-Maglio
Dissertação (Mestrado em Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia)– Instituto Agronômico

1. Café 2. Meiose 3. Café - irregularidades meióticas,
4. Híbridos interespecíficos, 5. Estabilidade genética 6. *Coffea arábica*
7. *Coffea canephora.* I. Pinto-Maglio, Cecília Alzira Ferreira
II. Título

CDD. 633.73

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Comportamento meiótico em híbridos de café arabusta (*Coffea arabica* cv Bourbon Vermelho x *C. canephora* cv Robusta)**

Aluna: **Laís Moreira Granato**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **12182/08**

Orientadora: **Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio - IAC

Dr. Ricardo Augusto Lombello - CCNH, Universidade Federal do ABC

Dra. Neiva Izabel Pierozzi - IAC

Campinas, 13 de abril de 2010

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agronômico

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, cujo amor, carinho e apoio são essenciais e foram indispensáveis para conclusão desse trabalho.

“Não importa o que fizeram com você. O que importa é o que você faz com aquilo que fizeram com você”.

Jean Paul Sartre

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que colaboraram de alguma forma para a realização desse trabalho:

- Ao Instituto Agronômico de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, pela oportunidade de realização do curso e desse trabalho.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro fundamental para a realização dessa dissertação.
- À minha orientadora, Profa. Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto-Maglio pela orientação, apoio e exemplos de ética profissional, dedicação e persistência para enfrentar as dificuldades encontradas no decorrer do trabalho.
- Ao Centro de Recursos Genéticos Vegetais pela disponibilização das instalações em geral, veículos para as viagens de coleta e em especial a infra-estrutura do Laboratório de Citogenética.
- Ao pesquisador do Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Dr. Luís Carlos Ramos pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas.
- Ao Diretor, pesquisador Paulo Boller Gallo e aos funcionários da APTA Regional Nordeste Paulista – Mococa-SP, pela disponibilização e o cuidado com o material de estudo, as plantas dos cafeeiros arabusta.
- Aos docentes do curso de pós-graduação pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação, em especial, ao Prof. Dr. Carlos Eduardo de Oliveira Camargo (*in memoriam*) pelo reconhecimento a minha dedicação; e à Profa. Dra. Maria Elisa A. G. Zagatto Paterniani pelo incentivo e amizade.
- Aos membros da banca, pela disposição em corrigir essa dissertação e pelas críticas que virão acrescentar e engrandecer esse trabalho.
- Aos pesquisadores do Laboratório de Citogenética Vegetal, Dra. Neiva Isabel Pierozzi e Dr. Ricardo Lombello pela confiança, amizade, auxílio e atenção.
- À colega de Laboratório, Liamar Zanella pela amizade.
- Aos meus pais, pelo incentivo, apoio, paciência e amor absolutos, compartilhando todos os momentos alegres e difíceis no decorrer do curso.
- A minha irmã que me deu o maior presente do ano, minha sobrinha e afilhada, que chegou para trazer alegria.

- Aos colegas da Pós-Graduação em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia pela amizade e auxílio durante essa etapa importante.
- Aos amigos que conquistei no decorrer desse período, em especial: Renata, Guilherme, José Rafael pela amizade, conselhos e bons momentos
- Ao querido Eduardo Augusto (Cajuru) pela ajuda importantíssima nas análises estatísticas e em outras etapas deste trabalho, mas principalmente pelo carinho, dedicação e paciência.
- Às minhas estimadas amigas e colegas de república, Cecília, Bárbhara, Lenita, Marília e Simone, pelo carinho, companheirismo, paciência e força nos momentos bons e difíceis.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS VII
ÍNDICE DE FIGURAS VIII
RESUMO IX
ABSTRACT X
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Aspectos econômicos do café 3
2.2 Considerações sobre o gênero *Coffea* 4
2.3 Importância dos estudos de comportamento meiótico 5
2.4 Estudos meióticos em *Coffea arabica* e *Coffea canephora* 6
2.5 Estudos meióticos em híbridos 8
2.6 Estudos do comportamento meiótico em híbridos de café 11
2.7 Viabilidade polínica 14
3 MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1 Dados climáticos 16
3.2 Material 16
3.2.1 Origem do material 17
3.3 Métodos 18
3.3.1 Meiose 18
3.3.1.1 Coleta do material 18
3.3.1.2 Preparação de lâminas 18
3.3.1.3 Análise das lâminas de meiose 20
3.3.2 Viabilidade do pólen 21
3.3.2.1 Testes de viabilidade 21
3.3.2.2 Análise das lâminas de pólen 22
3.4 Análise estatística 22
3.5 Imagens 23
4 RESULTADOS 23
4.1 Meiose 23
4.1.1 Plantas parentais 23
4.1.2 Híbrido arabusta F_1 28
4.1.3 População F_2 29
4.2 Viabilidade polínica 42
4.2.1 Plantas parentais 42
4.2.2 Híbrido arabusta F_1 42
4.2.3 População F_2 42
4.3 Correlações 50
5 DISCUSSÃO 51
5.1 Meiose 51
5.2 Viabilidade polínica 63
5.2.1 Plantas parentais 63
5.2.2 Híbrido arabusta F_1 65
5.2.3 População F_2 66
5.3 Correlação 68
6 CONCLUSÕES 70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72
9 ANEXOS 79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Temperatura média (°C), precipitação total (mm), umidade média relativa (%) e Evapotranspiração potencial (mm ano-1) 16

Tabela 2 - Número cromossômico para células analisadas nos parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (Co 667) e *C. canephora* cv Robusta (Co 254) e no híbrido interespecífico arabusta F_1 24

Tabela 3 - Médias e respectivos desvios padrão do número de monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes na fase de metáfase I, nas plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (P_1), *C. canephora* cv Robusta (P_2) e do híbrido arabusta F_1 24

Tabela 4 - Porcentagem de anormalidades meióticas e viabilidade polínica das plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 (P_1) e *C. canephora* cv Robusta Co 254 (P_2) e do híbrido arabusta F_1 27

Tabela 5 - Porcentagens de díades, tríades, políades e micrócitos encontrados nas tétrades; índice meiótico e viabilidade dos grãos de pólen medidos por coloração (VPC) e por germinação (VPG), para os parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 (P_1) e *C. canephora* cv Robusta Co 254 (P_2) e no híbrido arabusta (F_1). 28

Tabela 6 - Números cromossômicos para células analisadas na população amostrada de híbridos arabusta F_2. 30

Tabela 7 - Número total de células em divisão meiótica (CDM) analisadas e número e porcentagem de células com divisão meiótica irregular, índice meiótico (%) e porcentagem de grãos de polens viáveis obtidos por meio de coloração (VPC) e germinação *in vitro* (VPG) para a população F_2 de híbridos arabusta de café (Continua) 32

Tabela 8 - Médias e desvios padrão do número de bivalentes, monovalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes na fase de metáfase I, nas plantas da população F_2 examinadas. 35

Tabela 9 - Porcentagens de anormalidades meióticas em plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café (Continua). 37

Tabela 10 - Porcentagem de polens germinados do híbrido arabusta F_2 em diferentes meios de germinação. 44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Plantas da população de híbridos F_2 de cafeeiros arabusta no Pólo da APTA Regional Nordeste Paulista (Mococa-SP), destacando-se as características morfológicas distintas. 19

Figura 2 - Protocolo para coleta de material. A: Inflorescência com flores abertas para coleta de pólen; B: Botões para coleta de preparações meióticas; C: Ramos com botões florais mantidos em condições de laboratório; D: Pré-fixação para análise de botões. . 20

Figura 3 - Irregularidades em células em divisão meiótica nas fases de metáfase I e metáfase II de plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Bivalente e tetravalentes; B: Polivalente e cromossomos em segregação precoce; C: Monovalentes; D: Trivalente e Polivalente; E, F: Cromossomos em segregação precoce 34

Figura 4 - Irregularidades em células em divisão meiótica, nas fases de anáfase I e anáfase II, de plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A-C: Cromossomos retardatários em anáfase I; D: Cromossomos com aderência; E-F: Cromossomos retardatários em anáfase II. 39

Figura 5 - Anomalias presentes em células em divisão meiótica das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Tetravalente; B-C: Bivalentes nos pólos; D: Cromossomos dispersos; E: Ponte cromossômica; F: Telófase II com núcleos desiguais 40

Figura 6 - Produtos finais da microsporogênese das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Tétrade normal; B: Tríade; C: Tríade com um micrócito; D: Díade com dois micrócitos; E: Políade com micrócitos irregulares; F: Tétrade com vários micrócitos. 41

Figura 7 - Visão geral dos testes de germinação para os grãos de pólen das plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon vermelho Co 667 e *C. canephora* cv Robusta Co254 e do híbrido arabusta F_1. A-B: Polens do parental *C.* arabi*ca*; C-D: Polens do parental *C. canephora*; E-F: Polens do híbrido F_1. 43

Figura 8 - Visão geral dos grãos de pólen das plantas da população F_2 de híbridos de arabusta de café submetidos ao teste de coloração com corante Alexander. A, B, C e D: Polens viáveis (coloridos) e polens inviáveis (sem coloração); E: Grãos com diferentes diâmetros; F: Tétrade mal formada. 45

Figura 9 - Particularidades dos grãos de pólen das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café coloridos com Alexander. A: Dois grãos dentro de uma única capa de calose; B: Pólen com parede mais espessa; C: Diferença de tamanho entre polens inviáveis; D: Grão de pólen com dois tubos polínicos; E: Grãos de polens que permaneceram agrupados em cacho. 48

Figura 10 - Pólen das plantas F_2 de híbridos arabusta de café, coloração com corante Alexander. A C e F: Micrócitos misturados aos polens; B, E: Tubos polínicos normais com material genético; C: Diferença de viabilidade e tamanho de grãos de pólen; D: Tubos polínicos com e sem material genético 49

Comportamento meiótico em híbridos de café arabusta (*C. arabica* cv Bourbon Vermelho e *C. canephora* cv Robusta)

RESUMO

As duas espécies de café mais importantes comercialmente são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* e híbridos entre essas duas espécies têm sido obtidos através de indução de autotetraploidia em *C. canephora*. Tais híbridos, geralmente, apresentam fertilidade reduzida com produção variável de frutos e sementes ou esterilidade total. A meiose é um evento com papel fundamental na microsporogênese que resulta na formação dos gametas. O pareamento e a segregação precisa dos cromossomos, durante este processo, quase sempre resultam na viabilidade dos gametas. A fertilidade dos gametas pode ser afetada se irregularidades forem encontradas no curso da divisão meiótica. O estudo da microsporogênese foi realizado em indivíduos da população F_2 de híbridos arabusta de café, bem como no híbrido arabusta F_1 e nos parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (Co 667) e *C. canephora* cv Robusta (Co 254), com o objetivo de se estabelecer os perfis dos híbridos quanto ao grau de sua fertilidade e estabilidade genética em comparação aos parentais. Botões florais foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento, fixados em Carnoy e as lâminas preparadas conforme padrão da técnica de esmagamento com carmim acético 1,2%. As células em divisão meiótica foram analisadas em microscopia de fase e as imagens capturadas com um analisador de imagens computadorizado. Foi feita a análise de 360 células para os parentais e para o híbrido F_1. Para cada planta F_2 foram analisadas cerca de 210 células, sendo em média, 30 células para cada fase da meiose (metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II, anáfase II, telófase II) e 60 de tétrades. Foram quantificadas as células com irregularidades e as normais e em seguida obtidas as freqüências das diferentes anormalidades para o total das células analisadas. Os produtos finais da microsporogênese, ou seja, o pólen produzido, também teve a viabilidade avaliada por meio dos testes de coloração, com o corante Alexander, e através de testes de germinação *in vitro*. As análises revelaram que, na maioria dos híbridos, os cromossomos associaram-se predominantemente como bivalentes, porém vários tipos de anormalidades foram também observadas, tais como: variação no número de cromossomos, presença de cromossomos monovalentes, multivalentes, retardatários, cromossomos com aderência, ocorrência de segregação precoce, presença de bivalentes nos pólos, pontes cromossômicas, formação de díades, tríades, e tétrades com e sem a

ocorrência de micrócitos. A freqüência das anomalias variou de 51,1% na planta 94 a 93,3% na planta 143, índices estes relativamente altos de irregularidades meióticas. A viabilidade polínica também variou entre as plantas da população de híbridos F_2 de 26,24% na planta 74 a 79,16% na planta 45. A partir destas análises foi possível estabelecer perfis relativos ao comportamento meiótico para as plantas amostradas da população F_2 de híbridos arabusta de café. As plantas estudadas apresentaram diferenças marcantes quanto ao comportamento meiótico e à fertilidade.

Palavras-chave: irregularidades meióticas, híbridos interespecíficos, estabilidade genética, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*

Meiotic behavior in hybrids arabusta of coffee (*C. arabica* cv Bourbon Vermelho x *C. canephora* cv Robusta)

ABSTRACT

The most commercially important species of coffee are *Coffea arabica* and *Coffea canephora* and hybrids of these two species that have been obtained through induction of autotetraploidy in *C. canephora*. Usually they present reduced fertility with variable production of fruits and seeds or have total sterility. Meiosis is an event with a key role in microsporogenesis that results in the formation of gametes. The right pairing and segregation of chromosomes during this process almost always result in the viability of gametes. The fertility of the gametes may be affected if irregularities are found in the course of meiotic division. The study of microsporogenesis was carried out in individuals from a F_2 hybrids arabusta population of coffee as well as in arabusta F_1 and also in its progenitors, *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (Co667) and *C. canephora* cv Robusta (Co254) in order to establish the hybrid profiles concerning their degrees of fertility and their genetic stability. Flower buds were collected at different developmental stages, fixed in Carnoy and slides were prepared according to standard squash technique with 1.2% acetic carmine. Meiotic cells were examined in a phase microscope and images were captured with a computerized image analyzer. It was analyzed 360 cells for progenitors and hybrid F_1. For each F_2 plant were analyzed about 210 cells, with an average of 30 cells for each stage of meiosis (metaphase I, anaphase I,

telophase I, metaphase II, anaphase II, telophase II) and 60 for tetrads. Cell irregularities were quantified as well as the normal ones and then the frequencies were obtained for different abnormalities of all the analyzed cells. The products of microsporogenesis, the pollen grain, had the viability tested by staining tests with Alexander dye, and through *in vitro* germination tests. The analyses revealed that in most hybrids, the chromosomes associated predominantly as bivalents, but many types of abnormalities were also observed, such as variation in chromosome number, presence of monovalent and multivalent chromosomes, lagging and stickness chromosomes, occurrence of early chromosome segregation, presence of bivalents at the poles, chromosome bridges, formation of dyads, tryads and tetrads with and without the occurrence of microcytes. The frequency of abnormalities ranged from 51.1% in plant 94 to 93.3% in the plant 143. Pollen viability also varied among plants of the population F_2 of hybrids from 26.24% in the plant 74 to 79.16% in plant 45. From these analyses it was possible to establish profiles to the meiotic behavior for population's sampled plants of F_2 hybrids arabusta coffee. The plants studied showed marked differences on the meiotic behavior and fertility.

Key words: meiotic irregularities, interspecific hybrids, genetic stability, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*

1 INTRODUÇÃO

A meiose é um evento com papel fundamental na formação dos gametas, pois promove a redução do número de cromossomos à metade, permitindo assim a manutenção do número cromossômico da espécie ao longo das sucessivas gerações (GUERRA, 1998; PAGLIARINI, 2000). Durante a divisão meiótica, ocorre o pareamento cromossômico, que é uma evidência de que pode haver recombinação entre genes, resultando em variabilidade genética, o que é de máxima importância na adaptação das populações e na evolução dos seres vivos (Yen & Kimber, 1990 citado por TECHIO & DAVIDE, 2007).

A segregação precisa dos cromossomos durante a meiose quase sempre resulta na viabilidade gamética, mas a fertilidade dos gametas pode ser afetada se irregularidades forem encontradas no curso da divisão meiótica.

A análise do comportamento meiótico é uma ferramenta muito utilizada para estudos evolutivos, assim como na escolha de genótipos a serem utilizados em programas de melhoramento genético, já que permite o estabelecimento dos perfis das plantas quanto à sua estabilidade genética e fertilidade, o que pode ser traduzido na possibilidade de uma seleção mais apurada dos genótipos analisados.

As informações meióticas relativas a índices de pareamento, recombinação e padrões de segregação são relevantes, pois podem complementar estudos moleculares. Além disso, os estudos do comportamento meiótico podem acrescentar informações a mapas genômicos, ajudando a explicar o tipo de herança estabelecido por meio do polimorfismo de marcadores moleculares.

Estudos meióticos têm sido realizados em espécies, tais como, *Glycine max* (BIONE et al., 2000); *Brachiaria brizantha* (MENDES-BONATO et al., 2002); *Carica papaya* (BAJPAI, 2006); *Boehmeria nivea* (PIEROZZI, 2008); e em híbridos entre *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *P. cincinnata* (BARBOSA et al., 2006); *Brachiaria ruziziensis* e *B. brizantha* (ADAMOWSKI, 2008), a fim de explicar as causas da redução da viabilidade polínica ou examinar as relações entre genomas.

YEN, Y.; KIMBER, G. Genome relationships of *Triticum searsii* to other S-genome diplois *Triticum* species. **Genome**, v.33, p.369-373.

Uma vez que a reduzida fertilidade é geralmente decorrente do comportamento meiótico irregular, o estudo do pareamento cromossômico e das anormalidades geradas no decorrer da divisão meiótica pode revelar o grau de irregularidade existente em plantas híbridas.

A análise da microsporogênese apresenta ainda outra vantagem em relação a outros métodos usados para distinguir genomas individuais, pois é um método menos dispendioso. Através da análise meiótica pode ser demonstrado o fato de que se dois genomas são suficientemente similares para ter pareamento na meiose estes podem sofrer recombinação genética (CHAPMAN & KIMBER, 1992).

Alguns trabalhos sobre comportamento meiótico em plantas de café foram realizados em espécies diplóides (MEDINA, 1952; MEDINA & RIJO, 1969), na espécie poliplóide *C. arabica* (MENDES, 1950; MEDINA, 1950), em *C. canephora* poliploidizado sinteticamente (BOAVENTURA, 1990) e em híbridos interespecíficos (KRUG & MENDES, 1940; MEDINA, 1963; MONACO & MEDINA, 1965; KAMMACHER & CAPOT, 1972; LOUARN, 1976; OWUOR, 1985; BOAVENTURA & CRUZ, 1987).

Dados sobre a viabilidade polínica complementam o estudo do comportamento meiótico, pois permitem estabelecer a relação existente entre a fertilidade do pólen e as anormalidades meióticas (TECHIO, 2002).

Diversas plantas de cafeeiros híbridos F_2 foram obtidas a partir da hibridação interespecífica entre *Coffea arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 (2n = 44), um diaplóide duplicado sinteticamente e *Coffea canephora* cv Robusta Co 254 (2n = 44), também duplicado sinteticamente, dentro do programa de cruzamento visando melhoramento dessa cultura no IAC. Os híbridos F_1 provenientes desse cruzamento, denominado de arabusta, resultaram em híbridos com características de interesse e foram mantidos. Por outro lado, as plantas híbridas F_2 resultantes de autofecundação desta F_1 que não possuíam características de interesse imediato, foram preservadas pelo fato de poderem eventualmente possuir combinações gênicas de interesse que podem ainda ser exploradas em novos cruzamentos.

Por serem plantas híbridas, constituídas por genomas de espécies diferentes, apresentam irregularidades meióticas e possuem um baixo potencial reprodutivo. Assim o interesse em analisar as plantas F_2 de híbridos arabusta está no fato de que essas plantas apresentam características morfológicas bastante distintas, bem como diferentes

níveis de produtividade de frutos, características estas que eventualmente podem ser aproveitadas.

Estudos de comportamento meiótico em híbridos arabusta F_2 de cafeeiros são inéditos e são apresentados aqui neste trabalho. Os objetivos deste trabalho foram analisar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica para uma amostra de uma população segregante constituída de híbridos arabusta F_1 e F_2 e dos parentais (*Coffea arabica* cv Bourbon Vermelho Co667 e *Coffea canephora* cv Robusta Co254), durante os ciclos florais de 2008 e 2009, visando ao estabelecimento dos perfis de fertilidade para as plantas dessa amostra.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos do café

O café está entre os cincos produtos agrícolas mais comercializados e consumidos no mundo. Dentre as espécies do gênero, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as de maior cotação no mercado internacional, sendo que cerca de 70% do café negociado no mundo é do tipo Arábica (*C. arabica*) e 30% é do tipo Robusta (*C. canephora*) (MAHÉ et al., 2007; FAO, 2007).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo e o segundo maior consumidor, além de ser responsável por mais de um terço da produção mundial, como também, das exportações de café (FAO, 2007). Esse fato coloca o café entre as culturas economicamente mais importantes na balança comercial brasileira, com uma estimativa de área cultivada igual a 2.102.106 hectares (CONAB, 2009).

O Estado de São Paulo foi por muitos anos líder na produção de café no Brasil, porém atualmente, de acordo com a CONAB (2009), ocupa a terceira posição no ranking nacional, contribuindo com 8,66% da área cultivada, atrás de Minas Gerais (47,62%) e Espírito Santo (23,61%).

Mais de 90% dos 5,5 bilhões de cafeeiros do País são provenientes das cultivares desenvolvidas pelo programa de genética e melhoramento do cafeeiro do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), o qual foi responsável por grande número de linhagens, e várias cultivares, que foram lançadas e recomendadas para o plantio em diversas regiões cafeeiras do Brasil, contribuindo significativamente para o setor produtivo e para a economia cafeeira (AGUIAR et al., 2004).

2.2 Considerações sobre o gênero *Coffea*

Atualmente, o café encontra-se classificado como pertencente à família Rubiaceae, subfamília Cinchonoideae, tribo Coffeeae que é composta por dois gêneros: *Coffea* L. (subgêneros: *Coffea* e *Baracoffea*) e *Psilanthus* Hook f. (subgêneros: *Psilanthus* e *Afrocoffea*) que juntos abrangem mais de 100 espécies (BRIDSON, 1994).

O gênero *Coffea* tem como centro de origem as regiões tropicais e subtropicais do continente Africano e, das espécies descritas para o gênero, somente duas delas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, têm interesse econômico (CHARRIER & BERTHAUD, 1985; WRINGLEY, 1988). Mas, apesar disso, as espécies silvestres não cultivadas do gênero representam fonte de variabilidade genética, e suas características desejáveis podem ser transferidas para variedades comercias (FAZUOLI et al., 1999).

C. canephora e *C. arabica* apresentam características morfológicas distintas. Quando comparada a *C. arabica*, o cafeeiro de *C. canephora* é geralmente mais vigoroso e produtivo (CLARKE & MACRAE, 1988), mas a qualidade de bebida de *C. canephora* é geralmente inferior a *C. arabica*. Contudo, *C. canephora* é mais resistente a condições adversas, particularmente a várias doenças e pestes, incluindo fontes de resistência à ferrugem, doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, a nematóides e a *Colletotrichum kahawae*, fungo responsável pela moléstia *coffee berry disease* (antracnose dos frutos do cafeeiro) (FAZUOLI et al., 2000).

Essas espécies distinguem-se ainda por características genéticas e adaptativas. *C. canephora* é uma espécie alógama, diplóide (2n=22), auto-incompatível e mais adaptada a regiões de clima quente e úmido (MENDES, 1949), enquanto *C. arabica* é tetraplóide (2n=44), autocompatível e cultivada em clima mais ameno (KRUG & CARVALHO, 1951; CARVALHO et al., 1969).

As evidências das pesquisas genéticas em *Coffea arabica* têm sugerido uma especiação recente e as análises de pareamento e morfologia de cromossomos meióticos têm demonstrado que há similaridade entre os cromossomos do complemento alotetraplóide de *C. arabica*, mais especificamente entre os genomas parentais que constituem o complemento híbrido dessa espécie (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998; PINTO-MAGLIO, 2006).

Deste modo, tem sido demonstrado que a espécie *C. arabica* é mais precisamente um alotetraplóide segmental (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998),

provavelmente originado do cruzamento natural de *C. eugenioides* com *C. congensis* ou com *C. canephora* (RAINA et. al, 1998; LASHERMES et. al, 1999).

A espécie *C. canephora* é importante por ser considerada uma das espécies parentais de *C. arabica* e por ter relevância para o melhoramento do cafeeiro devido à resistência natural a certas doenças e pestes (FAZUOLI et al., 2000). Por isso, estudos citológicos têm sido realizados em *C. canephora*, visando a investigações de natureza evolutiva e o melhoramento do cafeeiro (MENDES, 1950; BOAVENTURA, 1990).

2.3 Importância dos estudos de comportamento meiótico

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva que culmina na redução do número cromossômico. O curso normal e harmonioso da meiose, ou seja, a precisa segregação dos cromossomos acarreta na viabilidade gamética (PAGLIARINI, 2000). E é de suma importância para geração de variabilidade por meio da recombinação dos genes e para a sobrevivência da espécie (GRIFFITS et al., 2006).

A meiose é também controlada por um grande número de genes e a interrupção ou o erro em algum passo da meiose, devido a fatores ambientais ou genéticos (mutações) podem afetar a fertilidade gamética e, dependendo da severidade da anormalidade, a esterilidade total pode ser esperada (PAGLIARINI, 2000).

Estudos relacionados à análise do comportamento meiótico são de extrema importância, pois contribuem para estudos taxonômicos (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998), evolutivos (SYBENGA, 1994) e também para o melhoramento de plantas, pois a estimativa da afinidade genética fornece um indicativo da melhor combinação para troca de alelos entre as espécies (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Os dados do pareamento cromossômico são uma ferramenta de suporte indispensável nas etapas de planejamento e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de um programa de melhoramento genético (TECHIO & DAVIDE, 2007).

Híbridos interespecíficos, obtidos por meio de cruzamentos, apresentam geralmente pólen com fertilidade reduzida. No entanto, a infertilidade de plantas híbridas não pode ser facilmente detectada por análise fenotípica, sendo necessário tanto estudos de viabilidade polínica, como análises de comportamento meiótico para identificá-la. Na maioria das vezes, a reduzida fertilidade é decorrente do comportamento meiótico irregular, e isto ocorre principalmente em função de diferentes níveis de ploidia ou de homologia encontrados em espécies do mesmo gênero.

Conclusões erradas podem ser obtidas se a hipótese da existência de parentesco genômico for baseada apenas na formação de híbridos férteis ou estéreis, sem a análise do pareamento cromossômico, pois em híbridos entre espécies geneticamente similares que se esperava que fossem férteis são, na verdade, estéreis. Isso pode ocorrer devido a alelos complementares letais, diferenciação entre genes e estrutura cromossômica (SINGH, 2002).

Para Crane & Sleper (1989, citado por ELISA, 2006), o pareamento cromossômico em híbridos permite não somente avaliar as relações genômicas entre as espécies envolvidas no cruzamento, mas também fornecer informações importantes em programas de cruzamentos visando a introgressão de genes.

Entretanto, o grau de diferenciação entre espécies hibridizadas pode ser estabelecido não somente pela análise do pareamento cromossômico, mas também pela estimativa e análise de anormalidades meióticas (RIESEBERG et al., 2000).

2.4 Estudos meióticos em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Trabalhos sobre comportamento meiótico foram realizados em espécies de café, assim como em híbridos interespecíficos, com diversas finalidades.

Em *Coffea arabica*, MENDES (1950) constatou o pareamento de 22 bivalentes na metáfase I da microsporogênese nas variedades *semperflorens* e Caturra de *C. arabica.* Apesar desta normalidade no pareamento, este autor constatou algumas anomalias na anáfase I, ou seja, 9% dos núcleos finais tinham um número diferente de 22; na anáfase II, a presença de um cromossomo isolado no citoplasma; e na telófase II, algumas células apresentaram núcleos desiguais e cromossomos espalhados no citoplasma. As demais fases mostraram-se todas normais.

Em análises meióticas realizadas em quatro variedades de *C. arabica*: Tana, Guinnée, Pita e Caturra Amarelo, foram descritas algumas irregularidades, tais como cromossomos assinápticos, associações secundárias entre bivalentes e a presença de alguns multivalentes. Estas irregularidades levaram GRASSIAS & KAMMACHER, (1975) a concluírem que *C. arabica* é um táxon alotetraplóide segmental, ou seja, formado por dois genomas com cromossomos que conservam grande semelhança.

CRANE, C. F.; SLEPER, D. A. A model of meiotic chromosome association in triploids. **Genome**, v. 32, n.1, p.82-98, 1989.

Como uma alternativa para superar o reduzido tamanho dos cromossomos somáticos de café, PINTO-MAGLIO & CRUZ (1987) realizaram um experimento em meiose visando à identificação dos cromossomos nucleolares, de modo a verificar a possibilidade de utilizar os cromossomos meióticos na fase de paquíteno para identificar os cromossomos de café. Demonstraram que os cromossomos homólogos apresentavam-se totalmente pareados, portanto com número gamético "n".

Com base na comparação morfológica dos cromossomos nucleolares, as autoras sugeriram *C. eugenioides*, *C. canephora*, *C. congensis* ou *C. liberica* como possíveis espécies parentais para *C. arabica*.

PINTO-MAGLIO & CRUZ (1998) apontaram a grande semelhança entre os dois genomas que compõem essa espécie a partir da análise do padrão de cromômeros em cromossomos meióticos na fase de paquíteno. A análise revelou que os 22 bivalentes de *C. arabica* apresentam 54% de similaridade estrutural, o que evidenciou a condição de alotetraplóide de segmento desta espécie. Apesar dessa similaridade entre os cromossomos não homólogos de *C. arabica*, não foi observada a formação de multivalentes na meiose. Com base nestas observações, as autoras sugeriram a presença de um mecanismo de controle genético que impediria o pareamento entre cromossomos homeólogos em *C. arabica*, assim como ocorre no trigo e provavelmente dos poliplóides em geral, o que é fundamental para a estabilidade reprodutiva.

MENDES (1950) estudou a microsporogênese da espécie *Coffea canephora*, espécie diplóide com 22 cromossomos, e demonstrou um processo normal de pareamento e separação dos cromossomos, produzindo grãos de pólen com 11 cromossomos.

A duplicação do número de cromossomos de *C. canephora* foi obtida pela primeira vez por MENDES (1947) através do tratamento de sementes com soluções de colchicina, para tentar solucionar os problemas de esterilidade em programas de melhoramento, advindos do cruzamento desta espécie diplóide com o tetraplóide arábica, resultando em plantas F_1 triplóides (2n=33) e estéreis.

VISHVESHWARA & CHINNAPPA (1965), analisaram o comportamento meiótico de uma planta de *C. canephora* que teve seu número de cromossomos duplicado. As associações cromossômicas em diacinese e metáfase I encontradas por célula apresentaram médias de 1,18I; 7,42II; 1,5III e 5,75IV. A freqüência das associações mostrou que os bivalentes nessa planta são consideravelmente em maior

número que os tetravalentes, e os mono e trivalentes são em número bem menor e com médias quase iguais.

OWUOR (1985), estudando também uma planta de *C. canephora* tetraplóide, analisou 38 células em metáfase I, observando uma freqüência média de associação cromossômica de 2,4±1,8I; 14,9±0,9II; 0,8±1,7III e 2,3±1,0IV. Em anáfase I, o autor constatou que em 40,3±3,0% das células os cromossomos se separavam normalmente e retardatários foram encontrados em 3,3±3,0% das células. A meiose era irregular, resultando em uma baixa fertilidade de pólen.

BOAVENTURA (1990) igualmente realizou análises meióticas em células-mães de pólen de *C. canephora* tetraplóide, as quais revelaram que em diacinese, 92% das células analisadas possuíam 2n=44 cromossomos, porém em 84% destas células havia a formação de mono, bi, tri e tetravalentes. Na análise da metáfase I, apenas 13,16% dos meiócitos apresentaram 22 bivalentes. Para os monovalentes presentes em quase todas as células, a variação foi de 1 a 13; para os trivalentes, de 1 a 3; e para os tetravalentes a variação foi de 1 a 5. As irregularidades anafásicas se resumiram na disjunção irregular dos cromossomos para os pólos, já que cromossomos retardatários foram vistos muito raramente e pontes cromatídicas não foram observadas, seja em anáfase I ou em anáfase II. Após a ocorrência de citocinese, foram observadas tríades, tétrades e políades de micrósporos, além da ocorrência de micrócitos.

2.5 Estudos meióticos em híbridos

O comportamento meiótico tem sido analisado tanto em espécies como também em híbridos com diferentes finalidades: determinação da estabilidade genética de híbridos; determinação de causas de fertilidade reduzida ou esterilidade; estabelecimento de relações ou graus de afinidade genética entre espécies.

Normalmente, híbridos com genomas semelhantes apresentam pareamento completo. Os híbridos resultantes do cruzamento de *Triticum monococcum* (2n=2x=14) com *T. urartu* e *T. turgidum* (2n= 4x= 28) com *T. urartu* (2n = 2x = 14) foram estudados com o intuito de se confirmar a similaridade dos genomas. O híbrido resultante do primeiro cruzamento mostrou um pareamento completo, já o híbrido entre as duas últimas espécies é um triplóide, 2n = 3x = 21, com formação de sete bivalentes e sete univalentes na diacinese e metáfase I. Os resultados sugeriram que *T. turgidum* é um alotetraplóide que carrega o genoma derivado de *T. monococcum* e *T. urartu* e que essas espécies apresentam genomas similares (JOHNSON, 1975).

Por outro lado, um comportamento meiótico bastante irregular pode ser exibido em diversos híbridos. DUNDAS et al. (1987) estudou o híbrido entre duas espécies de *Atylosia* nativas da Austrália, *A. acutifolla* e *A. pluriflora,* para avaliar seu potencial para uso em programas de melhoramento para forragem. Os resultados encontrados demonstraram uma meiose com uma baixa freqüência de bivalentes na metáfase I, assim como a ocorrência de univalentes, multivalentes, pontes, fragmentos de cromossomos, cromossomos retardatários e micronúcleos. Essas anormalidades indicaram um alto nível de esterilidade do híbrido quando comparado com os parentais, o que impede que essas espécies sejam utilizadas em programas de melhoramento.

Da mesma forma, o híbrido entre *Hordeum lechleri* e *H. vulgare* mostrou vários tipos de irregularidades meióticas, assim como um tipo peculiar de eliminação de cromossomos. Células em metáfase I mostraram uma variação extrema do número de cromossomos (4 a 54) e a maioria dos cromossomos ocorreu como univalentes, apesar de ter ocorrido certo nível de pareamento cromossômico com formação de bi e trivalentes. Outras irregularidades tais como segregação irregular, micronúcleos e fragmentos de cromossomos ocorreram com alta freqüência e a presença de gametas desbalanceados foi comum (LINDE-LAURSEN & BOTHMER, 1993).

BARBOSA & VIEIRA (1997), investigaram o comportamento meiótico de híbridos somáticos obtidos por fusão de protoplastos. Para isso, foram analisados quatro genótipos do híbrido somático entre *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. amethystina*. Foram observados pelo menos 14 bivalentes na maioria das células analisadas, porém anormalidades, tais como univalentes, quadrivalentes, cromossomos retardatários e pontes anafásicas também foram registradas. A alta viabilidade dos grãos de pólen indicou que esses materiais podem ser usados para o melhoramento genético, objetivando a introgressão de genes.

Os estudos da meiose e da viabilidade do pólen também foram realizados por BARBOSA et al. (2006), com os híbridos entre *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *P. cincinnata*, revelando uma meiose normal e uma alta estabilidade, com a maioria das células híbridas mostrando 18 bivalentes. Contudo, algumas instabilidades, tais como um quadrivalente resultante de uma translocação entre os progenitores foi observado, além da presença de retardatários e a formação de micronúcleos. Devido às poucas anormalidades, foi encontrado um alto valor de viabilidade do pólen (>70%) tanto nos parentais diplóides como nas plantas híbridas.

ADAMOWSKI et al. (1998) descreveu o comportamento meiótico do alopoliplóide *Paspalum subciliatum* (2n=4x=40) que se mostrou normal até a fase de diacinese, quando a formação de 20 bivalentes foi observada. Na metáfase I, o comportamento dos cromossomos foi anormal, dez bivalentes encontravam-se alinhados na placa metafásica, enquanto que os outros dez permaneceram espalhados no citoplasma. Na anáfase I, os cromossomos tiveram uma segregação irregular, com posterior formação de micronúcleos na telófase I. Esse comportamento irregular dos cromossomos foi o mesmo na segunda divisão da meiose, mostrando clara assincronia no ciclo celular, afetando a viabilidade do pólen.

Durante a análise da microsporogênese dos híbridos de capim elefante e milheto por PAIVA (2006), foi verificado que a ascensão segregação precoce dos cromossomos era responsável pela maioria das irregularidades encontradas na meiose I. A segregação irregular dos cromossomos, observada nos dez híbridos estudados, resultou na formação de fusos anormais. Na telófase I, foi constatada a ocorrência de micronúcleos, indicando a presença de cromossomos retardatários não incluídos nos núcleos em formação, o que, por conseguinte, resultou na ocorrência de micrócitos adicionais nas tétrades.

TECHIO et al. (2006) relataram também em híbridos triplóides de capim-elefante e milheto, uma alta freqüência de distúrbios meióticos, desde as fases iniciais até a formação dos produtos meióticos. Entre as anormalidades observadas, encontravam-se a formação de univalentes e multivalentes, ascensão precoce de cromossomos tanto na primeira divisão meiótica quanto na segunda, segregação irregular, pontes simples e múltiplas, cromossomos aderentes, núcleo assincrônico, formação de células com tamanhos desiguais, citomixia, fuso anormal, células binucleadas e formação de micronúcleos.

RISSO-PASCOTTO et al. (2005) analisando híbridos entre *Brachiaria ruziziensis* e *B. brizantha* observaram que a maioria dos cromossomos pareou-se como bivalentes, embora tenham sido encontrados trivalentes e quadrivalentes. Irregularidades meióticas, tais como segregação cromossômica irregular, cromossomos com aderência e citocinese anormal, levaram a uma esterilidade de 65% dos grãos de pólen. Segundo as autoras, em ambas as divisões meióticas, houve a migração precoce e tardia de cromossomos para os pólos, além da alta freqüência de formação de micronúcleos. Os micrósporos originados na meiose II resultaram da citocinese anormal após a telófase I.

Anomalias na microsporogênese foram igualmente relatadas em um híbrido interespecífico entre um acesso sexual poliploidizado artificialmente (2n=4x=36) de *Brachiaria ruziziensis* e um acesso tetraplóide apomítico de *Brachiaria brizantha*. Os cromossomos associaram-se predominantemente como bivalentes, mas mostraram uma segregação irregular. Durante a metáfase I, em 27,8% dos meiócitos do híbrido entre as duas espécies, os bivalentes distribuíram-se em duas placas metafásicas. Na anáfase I, em 29,7% das células mães do pólen, um dos genomas não se dividiu sincronicamente, resultando na presença de cromossomos retardatários. A segunda divisão foi também irregular, resultando em políades (MENDES-BONATO et al., 2006).

ADAMOWSKI (2008) também estudou o comportamento meiótico de três híbridos interespecíficos entre *Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* retrocruzados com *B. brizantha.* Os cromossomos parearam-se predominantemente em multivalentes, sugerindo recombinação genética e introgressão de genes específicos de *B.brizantha* em *B.ruziziensis*. Estes três híbridos apresentaram alta freqüência de irregularidades meióticas, principalmente aquelas relacionadas à segregação irregular de cromossomos, típica de poliplóides. As anormalidades registradas foram: migração precoce aos pólos na metáfase I e II, bivalentes não unidos na placa equatorial, genomas arranjados em duas placas distintas na metáfase, cromossomos retardatários ou ainda um genoma inteiro como retardatário na anáfase I e II, pequenos ou grandes micronúcleos na telófase I, II e tétrades.

O exame da meiose de um híbrido interespecífico entre *Brachiaria ruziziensis* (2n=4x=36) e *B. decumbes* (2n=4x=36) revelou sincícios, envolvendo um grande número de células, em 15,40% dos meiócitos. Na metáfase I, um grande número de fragmentos cromossômicos foi encontrado e um grande número de células apresentou segregação cromossômica irregular em ambas as divisões meióticas. Essas anormalidades acarretaram a formação de núcleos picnóticos e de micronúcleos. As tétrades observadas mostraram de um a vários micronúcleos em cada micrósporo, o que ocasionou a completa esterilidade do pólen (MENDES-BONATO et al., 2007).

2.6 Estudos do comportamento meiótico em híbridos de café

A transferência de genes desejáveis de espécies selvagens para variedades cultivadas por meio de cruzamentos é uma das estratégias do melhoramento genético vegetal. Contudo, problemas inerentes a cruzamentos interespecíficos, tais como instabilidade híbrida, infertilidade, segregações não mendelianas, e baixos níveis de

crossing-over intergenômico, podem constituir importantes limitações (STEBBINS, 1972).

Em café, a transferência de características desejáveis, em particular, resistência a doenças entre espécies próximas, como de *C. canephora* para *C. arabica*, sem afetar as características de C. *arabica*, tem sido o principal objetivo do melhoramento do cafeeiro no mundo (HERRERA et al., 2002).

Contudo, híbridos interespecíficos são difíceis de serem mantidos devido à incompatibilidade do número cromossômico ou pela diferença entre os genomas das espécies parentais (CAPOT, 1972; BETTENCOURT, 1973). Isso ocasionou no interesse em estudar a meiose de híbridos de café para elucidar as possíveis causas da baixa fertilidade, assim como o grau de afinidade dos genomas das espécies que formam os híbridos.

KRUG & MENDES (1940), publicaram um trabalho elucidando o comportamento meiótico de um híbrido triplóide entre *C. arabica* e *C. canephora.* A metáfase I mostrou médias para univalentes, bivalentes, trivalentes iguais a 14,4; 5,4 e 2,6 respectivamente. Na continuação da meiose, a distribuição dos cromossomos foi extremamente irregular, sendo que algumas vezes, os cromossomos de um mesmo bivalente passaram para o mesmo pólo. Em 46% das células analisadas encontraram cromossomos atrasados que não foram incluídos nos núcleos em formação e formaram micronúcleos na telófase. Já na segunda divisão, a freqüência de retardatários foi menor que na primeira (43%), o que resultou em tétrades quase sempre anormais.

Da mesma maneira, observando-se a microsporogênese de um híbrido triplóide de *C. racemosa* com *C. arabica* (2n=33), verificou-se em metáfase I uma média de 13,1I; 9,7II; 8,0III. A separação dos cromossomos processou-se de forma bastante irregular em anáfase I, com monovalentes que adiantaram para os pólos e outros que permaneciam na placa equatorial da célula. Essas irregularidades acarretaram também problemas de segregação na meiose II, com muitos retardatários retidos no citoplasma, como também na formação das tétrades (MEDINA, 1963).

Estudos meióticos em híbridos F_1 de *C. excelsa* x *C. eugenioides* e de *C. liberica* x *C. eugenioides* foram realizados por VISHVESHWARA (1963). Estes híbridos mostraram irregularidades tais como: ausência de pareamento, distribuição desigual dos cromossomos (segregação desbalanceada), pontes cromatídicas e citocinese precoce. Essas irregularidades foram consideradas as prováveis causas da esterilidade gamética.

Observações realizadas na meiose de um híbrido triplóide entre *C. arabica* e *C. kapakata* demonstraram um pareamento de 10,07I + 9,45II + 1,33III, em média, para diacinese e metáfase I. Foram encontrados cromossomos retardatários na anáfase I, e conseqüentemente na metáfase II, encontraram-se monovalentes que se dividiam precocemente. Na anáfase II, foram observados retardatários e ausência de 2 a 11 cromossomos. Como conseqüência, as tétrades eram irregulares com a presença de micronúcleos e micrócitos (MÔNACO & MEDINA, 1965).

CHINNAPPA (1970) descreveu a morfologia de plantas e a associação de cromossomos na metáfase I de seis híbridos entre *C. canephora* e *C. liberica*. O autor relatou alta freqüência de bivalentes, além de trivalentes e quadrivalentes que foram observados pela primeira vez em tais híbridos. Apesar de apresentarem aparentes barreiras de hibridação, as duas espécies mostraram considerável homologia cromossômica.

Variações no número de quiasmas e alta freqüência de bivalentes foram encontradas em diferentes híbridos interespecíficos de café. No híbrido interespecífico entre *Coffea congensis* x *C. eugenioides*, alguns cromossomos monovalentes registrados na metáfase I, formaram retardatários na anáfase I e pontes também foram observadas, porém em menor freqüência. Já para o híbrido *C. liberica* x *C. dewevrei* menores porcentagens de irregularidades foram encontradas, 17,3% e 23,2% para as anáfases I e II respectivamente, assim como a formação de 11 bivalentes em 100% das células (MEDINA, 1972).

GRASSIAS (1977) observou uma alta freqüência de univalentes em dois híbridos arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*), a maioria atribuída à separação precoce de bivalentes, uma vez que em estágios subseqüentes poucos cromossomos foram perdidos e a distribuição na anáfase I foi comparativamente pouco irregular. Concluiu então que a baixa fertilidade dos híbridos arabusta foi devido a distúrbios meióticos.

Também ao analisar a meiose de *C. arabica* e *C. canephora* tetraplóide, o híbrido arabusta F_1, OWUOR (1985) encontrou uma alta freqüência de univalentes e multivalentes (trivalentes e tetravalentes) na metáfase I. A associação cromossômica média por célula foi de 6,1±0,8I; 17,4±0,4II; 0,8±0,1III; 0,2±0,2IV e em anáfase I registrou-se uma freqüência média de retardatários por célula de 2,5±1,1.

O híbrido conhecido como Icatu, também derivado do cruzamento de *C. arabica* e *C. canephora* foi obtido por meio da hibridação entre um haplóide de *C. arabica* com número cromossômico duplicado (2n=44) e *C. canephora* tetraplóide. A

microsporogênese foi analisada e a fórmula média do pareamento em metáfase I foi de 6,98I; 15,29II; 1,09III e 0,85IV. Na anáfase I, 24,8% das células mostraram disjunção normal e 18,3% apresentaram separações irregulares. Já na anáfase II foi observada a presença de retardatários e somente em 25,38% das células houve distribuição normal de 22 cromossomos para cada pólo celular. No entanto, 69,4% das tétrades apresentaram-se normais (BOAVENTURA & CRUZ, 1987).

2.7 Viabilidade polínica

Estudos de comportamento meiótico e fertilidade do pólen são estimativas importantes para determinar a variabilidade genética da espécie, como também para a caracterização de germoplasma, estudo da biodiversidade e ainda para ajudar na seleção de plantas a serem incluídas em um programa de melhoramento de plantas.

Dados sobre a viabilidade polínica permitem fazer correlações com anormalidades meióticas e auxiliar na seleção de genótipos, tornando-se uma ferramenta útil na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica (TECHIO, 2002).

Os principais métodos utilizados na avaliação da viabilidade de pólen são os testes de coloração e testes de germinação *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

A coloração é um procedimento simples, fornecendo os resultados rapidamente. Considerando que existe uma correlação entre viabilidade-coloração, a estimativa é dada pela contagem dos grãos de pólen com citoplasma colorido e não colorido que se mostram viáveis e inviáveis, respectivamente. Vários corantes são empregados com essa finalidade, como carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (SHIVANNA & RANGASWAMY, 1982) fluoresceína di-acetato e verde malaquita com fucsina básica (ALEXANDER, 1980).

Segundo TECHIO (2002), o método de coloração, não é totalmente confiável, apesar de ser um procedimento simples e barato, pois pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade. Nesse caso, pode-se optar pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que se correlaciona diretamente com a capacidade para fertilização.

Na germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura contendo sacarose e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. O grão de pólen é considerado viável quando o comprimento do seu tubo é maior que o seu diâmetro (BETTIOL-NETO et al., 2009).

A maioria dos problemas de fertilidade relatados é resultante da ocorrência de anormalidades meióticas tais como problemas no pareamento cromossômico.

Um dos trabalhos mais completos e antigos sobre a viabilidade polínica em café é de FABER (1912). O autor fez ensaios de germinação de pólen de *C. liberica*, *C. arabica*, *C. laurentii*, *C. abeokutae*, *C. excelsa*, *C. Uganda*, *C. dewevrei* e *C. quillou* (*C. canephora*), semeando-os em lâminas com meios nutritivos e colocados em câmaras úmidas. Este autor utilizou diferentes meios e em diferentes concentrações, porém, nessas experiências, o melhor meio foi uma solução de Agar a 1% com 20% de sacarose, na qual os grãos de pólen de café germinaram rapidamente, formando tubos longos.

MENDES (1950) estudou o comportamento meiótico e a viabilidade polínica em plantas de *C. canephora* diplóide e com complemento cromossômico duplicado. Devido à grande regularidade na divisão meiótica das células de *C. canephora* diplóide (93,68%), concluiu que o pólen desta era viável. Já analisando a viabilidade de pólen de *C. canephora* (4x), observou que apenas 21,0% dos grãos de pólen eram viáveis, o esperado para uma planta com o número de cromossomos duplicado sinteticamente.

Posteriormente, este mesmo autor analisou também a viabilidade polínica por meio de germinação *in vitro*, em três espécies de café (*C. canephora, C. congensis e C. dewevrei*), utilizando meio de germinação contendo agar (0,5%) e sacarose (1%). Os resultados da germinação revelaram que em *C. dewevrei* a porcentagem de germinação variou entre 19,28% a 27,63%; já para *C. congensis* houve plantas com 50,24% de viabilidade, assim como plantas cujos polens nem germinaram. *C. canephora* obteve 55,2% de grãos germinados em sua melhor lâmina (CONAGIN & MENDES, 1961).

OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) estudaram a fertilidade do híbrido arabusta F_1 e das espécies parentais. Para isso, foram feitos testes de viabilidade polínica por coloração com carmim acético 1% e por germinação em meio com 10% de sacarose. Os valores encontrados para os dois testes foram respectivamente 97,4±0,3 e 72,0±2,6 para *C. arabica*; 94,4±1,8 e 64,0±6,3 para *C. canephora* tetraplóide e 62,4±1.5 e 7,9±0,6 para o híbrido F_1.

Outro estudo da viabilidade polínica com o híbrido derivado do cruzamento de *C. arabica* e *C. canephora*, conhecido como Icatu foi obtido através da hibridação entre um haplóide de *C. arabica* com cromossomos duplicados (2n=44) com *C. canephora* tetraplóide. O trabalho foi realizado objetivando verificar as causas responsáveis pela baixa e variável produção de frutos e sementes nesse híbrido. Os resultados

demonstraram uma viabilidade dos grãos de pólen de 30,7% (BOAVENTURA & CRUZ, 1987).

Apesar do número de bivalentes entre *C. eugenioides* tetraplóide e *C. canephora* tetraplóide ser semelhante, *C. canephora* sofreu comparativamente uma maior redução da viabilidade polínica (21,0%) e apresentou também grãos de pólen de tamanhos diferentes (BOAVENTURA, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Dados climáticos

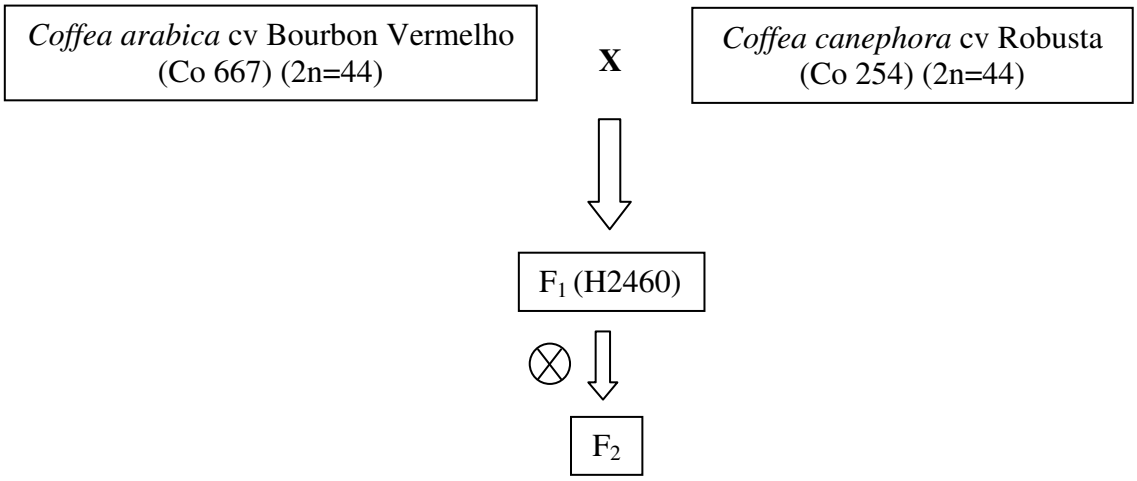
Os dados climáticos referentes aos anos da coleta de ramos florais dos cafeeiros estão apresentados na Tabela 1 e foram fornecidos pelo Centro Integrado de Informações Agrometereológicas (CIIAGRO).

Tabela 1 - Temperatura média (°C), precipitação total (mm), umidade média relativa (%) e evapotranspiração potencial (mm ano-1)

Dados climáticos	2008		2009	
	Mococa	**Campinas**	**Mococa**	**Campinas**
Temperatura média	22,4	21,9	21,3	21,6
Precipitação	1306	1315	1794	1594
Umidade relativa	66,3	76,0	73,0	70,0
ET_0	1481	1128	1218	1139

3.2 Material

O material biológico avaliado constituiu-se das plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho Co667, *C. canephora* cv Robusta Co254, o híbrido F_1 arabusta e de uma amostra de 30 plantas de uma população F_2 de café obtida da seqüência dos seguintes cruzamentos interespecíficos:



Os parentais e o híbrido F_1 estão localizados no Centro Experimental do IAC em Campinas-SP, Fazenda Santa Elisa (latitude 22º54S, longitude 47º03W e altitude 854m). A população arabusta F_2 (Figura 1) está localizada em um campo experimental do pólo da APTA Regional Nordeste Paulista (da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo) localizado no município de Mococa-SP (latitude 21°28S, longitude 47°01W e altitude 665m).

3.2.1 Origem do material

O parental *Coffea canephora* cv. Robusta (Co 254) foi obtido por meio da duplicação artificial do número de cromossomos de um indivíduo diplóide normal (2n = 22) via colchicina, pelo pesquisador Antonio José Teixeira Mendes, em 1940 (MENDES & BACCHI, 1940), da antiga Seção de Citologia do IAC.

Já o parental *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho (Co 667) foi obtido a partir de um indivíduo haplóide (n = 22), também duplicado via colchicina pelo mesmo pesquisador em 1943 (MENDES, 1944).

O híbrido arabusta F_1 (H2460) foi criado por MENDES (1950) a partir do cruzamento interespecífico entre os parentais acima, o Co 667 - *Coffea arabica* cv. Bourbon Vermelho (receptor, P_1) e o Co 254 - *C. canephora* cv. Robusta diplóide duplicado (doador, P_2).

A população de híbridos F_2 é formada por plantas resultantes de autofecundações do híbrido arabusta F_1 (H2460) que foram realizadas entre os anos de 1992 e 2003.

3.3 Métodos

3.3.1 Meiose

3.3.1.1 Coleta do material

Para o estudo da meiose, os ramos florais com botões jovens foram coletados nos meses de julho, agosto e setembro de 2008 e 2009, durante os ciclos florais do cafeeiro.

Os ramos com botões florais jovens foram mantidos em condições de laboratório, em uma câmara úmida até a maturação dos mesmos e desencadeamento do processo meiótico. Os botões florais foram coletados aleatoriamente de diferentes inflorescências, obtendo-se assim botões em diversos estágios de desenvolvimento. Após a retirada do perianto, os botões foram fixados em Carnoy (álcool absoluto e ácido acético glacial na proporção 3:1 respectivamente), em seguida passados por uma bomba de vácuo e a seguir acondicionados em freezer (-20° C) até o momento das análises.

3.3.1.2 Preparação de lâminas

Nas análises meióticas foram utilizadas as anteras dos botões florais para as preparações citológicas.

As lâminas foram preparadas com o procedimento padrão da técnica de esmagamento usando-se coloração com o corante carmim acético 1,2%. Para isso, três anteras escolhidas aleatoriamente foram esmagadas sobre uma lâmina contendo duas gotas de carmim acético. Essa operação foi executada com o auxílio de um bastão de vidro para evitar a oxidação do material.

O excesso de material, células de diferentes tecidos das células em divisão meiótica (CDM), foi retirado da lâmina para garantir um bom espalhamento das células e evitar a formação de planos ópticos devido à espessura dos debris. A seguir, uma lamínula foi colocada sobre o material e a preparação aquecida na chama de uma lamparina.

Posteriormente, o conjunto de lâmina e lamínula foi pressionado fortemente enquanto ainda estava quente, entre um papel de filtro, a fim de acentuar o espalhamento das células. Após o esmagamento, as lâminas foram seladas com cera para utilização em curto prazo e guardadas em freezer (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998).

Figura 1: Plantas da população de híbridos F_2 de cafeeiros arabusta no Pólo da APTA Regional Nordeste Paulista (Mococa-SP), destacando-se as características morfológicas distintas. Barra = 30 cm.

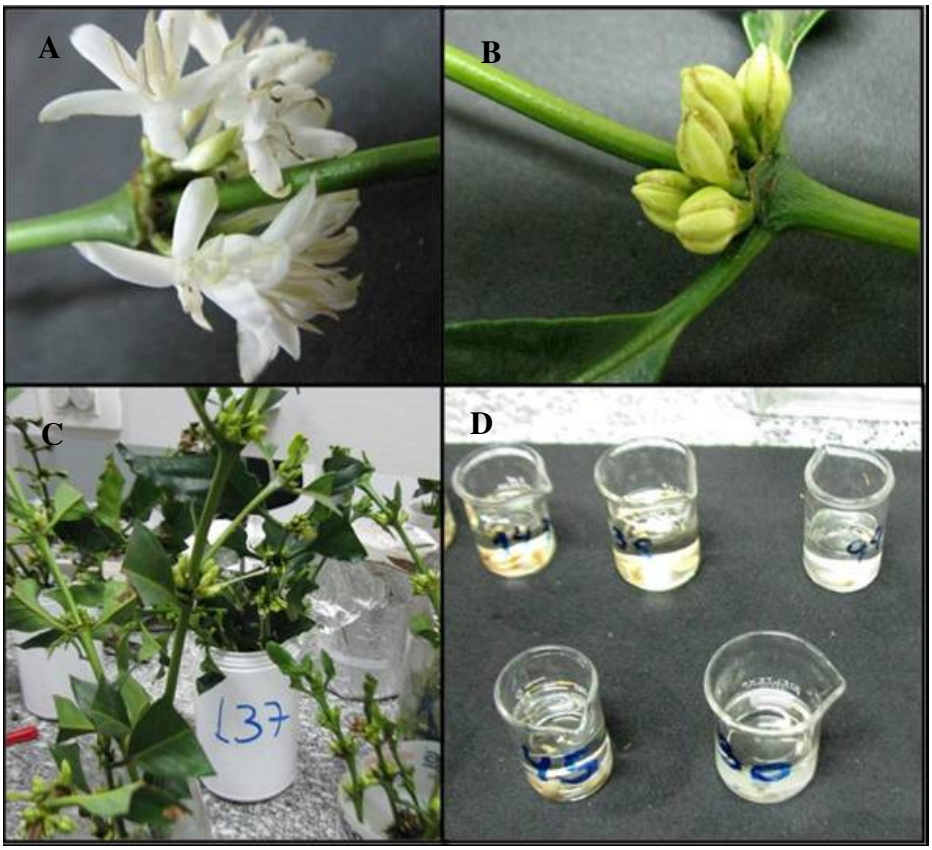


Figura 2 - Protocolo para coleta de material. A: Inflorescência com flores abertas para coleta de pólen; B: Botões para coleta de preparações meióticas; C: Ramos com botões florais mantidos em condições de laboratório; D: Pré-fixação para análise de botões.

3.3.1.3 Análise das lâminas de meiose

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz com condensador de contraste de fase com as seguintes combinações ópticas: ocular 10x, objetiva 100x, variador de aumento 1,5x.

Para obtenção de números cromossômicos diplóides, analisou-se a fase de metáfase I, estimando o número de cromossomos por meio do número de bivalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes.

Para cada planta F_2 foram observadas 240 células, sendo 30 células para cada fase da meiose e 60 células para as tétrades. Já para cada um dos parentais, *C. arabica* cv Bourbon Vermelho, *C. canephora* cv Robusta e para o híbrido interespecífico F_1 arabusta, foram analisadas 360 células. As fases da meiose analisadas incluíram metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II, anáfase II e telófase II, sendo quantificadas células em estágios normais e as irregularidades meióticas.

3.3.2 Viabilidade do pólen

Para determinação da viabilidade do pólen os ramos com botões florais foram mantidos em uma câmara úmida, até a fase de maturação do botão e início da antese.

3.3.2.1 Testes de viabilidade

A viabilidade do pólen foi estimada tanto pela capacidade de coloração do citoplasma dos mesmos como por meio de testes de germinação *in vitro*.

Na análise da viabilidade polínica por coloração (VPC) foi utilizado o corante Alexander nº 2 (ALEXANDER, 1980). As lâminas de cada planta foram preparadas com todas as anteras de um botão floral. Para isso, as anteras foram esmagadas sobre uma lâmina contendo duas gotas do corante especificado. O excesso de material foi retirado e após um leve aquecimento, estas foram vedadas com cera e conservadas em geladeira até o momento da análise microscópica.

Para a análise da viabilidade polínica por germinação *in vitro* (VPG) foram realizados, anteriormente, testes com seis meios de germinação, utilizando polens da planta 16 da população F_2, com o intuito de encontrar o meio de cultura mais adequado para germinação dos grãos de pólen de café.

Meio 1: 1,25g de sacarose, 0,9g de agar (cultura de tecidos tipo E-Sigma), dissolvidos em 100 ml de água destilada (CONGER, 1953).

Meio 2 e 3: 2,5g de sacarose e 1,75g de agar, dissolvidos em 100 ml de água destilada. Estes dois meios possuem a mesma composição com exceção do tipo de agar: no meio 2 utilizou-se o agar próprio para cultura de tecidos, tipo E-Sigma e no meio 3 o agar próprio para bactérias, o Bactoagar Mikrobiolie (Merck).

Meio 4: 20g de sacarose e 2g de agar dissolvidos em 100 ml de água destilada (CONAGIN & MENDES, 1961).

Meios enriquecidos 5 e 6: 5g de sacarose; 2g de agar; 0,01g de ácido bórico; 0,03g de nitrato de cálcio; 0,02 de sulfato de magnésio e 0,01g de nitrato de potássio, em 100 ml de água destilada (BETTIOL-NETO et al., 2009). Estes dois meios também possuem a mesma composição, diferindo apenas no tipo de agar utilizado. Para o meio 5 utilizou-se o agar próprio para cultura de tecidos, tipo E-Sigma e no meio 6 foi usado o Bactoagar Mikrobiolie (Merck).

Os meios foram homogeneizados em forno de microondas (potência máxima por dois minutos). Após resfriamento, mas ainda líquidos, os meios de cultura foram vertidos sobre lâminas de vidro para microscopia, formando uma película sólida sobre

as mesmas. Em seguida, os grãos de pólen dos botões florais foram espalhados com auxílio de um pincel sobre uma lâmina contendo o meio já solidificado e à temperatura ambiente.

As lâminas foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro umedecido, formando uma câmara úmida, e incubadas em estufa, no escuro, com temperatura de 28Cº durante quatro horas.

Depois de quatro horas, foi usado o corante Alexander nº 2 para interromper o crescimento dos tubos polínicos e promover a coloração, possibilitando uma melhor observação e a diferenciação dos grãos de pólen cheios e vazios, assim como, tubos sem coloração e com pouco material genético.

Após os testes com os diferentes meios de germinação, constatou-se que o meio 6 (BETTIOL-NETO et al, 2009) proporcionou a melhor germinação dos grãos de pólen, sendo então utilizado para análise da VPG das plantas em estudo, repetindo-se o mesmo processo de preparação das lâminas como descrito anteriormente.

3.3.2.2 Análise das lâminas de pólen

As lâminas de viabilidade do pólen foram analisadas em microscópio de luz com condensador de contraste de fase com as seguintes combinações ópticas: ocular 10x, objetiva 10x, variador de aumento 1,0x.

No teste de viabilidade por coloração foram considerados viáveis, os grãos de pólen que apresentaram conteúdo citoplasmático colorido pelo corante Alexander, e inviáveis, aqueles sem coloração, por ausência de citoplasma, e/ou, com tamanhos muito menores que a maioria ou ainda com diminuição da porção citoplasmática. Foram analisadas quatro lâminas por planta, sendo 10 campos em cada lâmina.

A viabilidade do pólen, determinada através dos testes de germinação, foi estimada em função da porcentagem de grãos de pólen germinados, sendo considerados viáveis os grãos de pólen que apresentavam tudo polínico germinado e com comprimento maior ou igual ao diâmetro do pólen. Foram analisadas duas lâminas por planta, sendo 10 campos em cada lâmina.

3.4 Análise estatística

Foram contabilizadas as células normais e aquelas com anomalias meióticas para cada uma das fases da meiose. Posteriormente, as porcentagens dos números de células

em divisão meiótica (CDM) sem anomalias e com anormais foram obtidas, para cada anomalia e em cada categoria de plantas (parentais, F_1, F_2).

Os números de bivalentes, univalentes e multivalentes também foram contabilizados e os resultados foram expressos como médias e os respectivos desvios padrão. E posteriormente, aplicou-se o teste F seguido pelo teste de Tukey para comparação das médias.

Para determinação do índice meiótico, ou seja, a porcentagem de tétrades normais foi avaliada 60 tétrades por planta (parentais, F_1, F_2). Sendo consideradas plantas com produtos meióticos normais, aquelas que apresentaram índice meiótico entre 80 a 90%.

Para as porcentagens dos totais de células em divisão meiótica, anormais, tétrades anormais, VPC e VPG, foram também calculados os intervalos de confiança, como apresentado por PIMENTEL-GOMES (1973).

A correlação entre a quantidade de irregularidades meióticas e viabilidade polínica foi estimada por meio da correlação de Pearson.

3.5 Imagens

As imagens dos meiócitos, das tétrades e grãos de pólen foram capturadas com microscópio Olympus BX50 e câmera digital refrigerada Olympus Q-Color 3. A captura foi feita através de um sistema de análise de imagens computadorizado e com o software Image-ProPlus versão 6.0 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Meiose

4.1.1 Plantas parentais

O número cromossômico foi contabilizado nas células analisadas de *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (Co 667) e *C. canephora* cv Robusta (Co 254) como um dos parâmetros para estabelecer o grau de normalidade dos parentais. A análise dos meiócitos do parental *C. arabica* indicou 44 cromossomos em 58 células e apenas 2 células com 42 cromossomos (Tabela 2).

Tabela 2 - Número cromossômico para células analisadas nos parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (Co 667) e *C. canephora* cv Robusta (Co 254) e no híbrido interespecífico arabusta F_1

2n	P_1		P_2		F_1	
	N	%	N	%	N	%
40	0	0,00	1	1,67	4	6,90
41	0	0,00	0	0,00	2	3,45
42	2	3,33	5	8,33	6	10,34
43	0	0,00	0	0,00	4	6,90
44	58	96,67	48	80,00	41	70,69
46	0	0,00	6	10,00	1	1,72

* N = total de células registradas

Na análise da meiose desses parentais (*Coffea arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 e *Coffea canephora* cv Robusta Co 254), e também do híbrido arabusta F_1 observou-se que na metáfase I a maioria dos cromossomos pareou-se na forma de bivalentes, indicando um alto índice de normalidade no pareamento. Entretanto, algumas anomalias também foram registradas no decorrer da meiose, como a presença de monovalentes, tetravalentes, segregação precoce dos cromossomos, tanto na metáfase I como na metáfase II, cromossomos retardatários, díades, tríades e micrócitos.

O parental *C. arabica* apresentou uma média de bivalentes por célula igual a 21,77±0,57 (Tabela 3), o que indicou que a grande maioria das células analisadas apresentou-se normal em relação ao pareamento dos cromossomos. Essa normalidade pode ser vista também através da porcentagem total relativa de células em divisão meiótica com anomalias, indicando que 31,10% das células analisadas apresentaram algum tipo de irregularidade meiótica (Tabela 4).

Tabela 3 - Médias e desvios padrão do número de monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes na fase de metáfase I, nas plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (P_1), *C. canephora* cv Robusta (P_2) e do híbrido arabusta F_1

Geração	Plantas	Monovalente (I)	Bivalente (II)	Trivalente (III)	Tetravalente (IV)	Polivalente (poli)
P_1	Co 667	0,13±0,51a	21,77±0,57a	0,00a	0,07±0,25a	0,00a
P_2	Co 254	0,80±1,13a	20,03±1,69a	0,00a	0,70±0,79a	0,00a
F_1	H2460	4,88±2,77b	18,97±2,31a	0,00a	0,20±0,41a	0,03±0,18a

Médias seguidas por letras diferentes = diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

Apesar da taxa de anormalidade ter sido relativamente baixa, observou-se a presença de monovalentes, tetravalentes, segregação precoce, cromossomos retardatários, díades, tríades e presença de micrócitos nas células do parental *C. arabica* (Tabela 4 e 5).

A quantidade de monovalentes foi registrada tanto na forma de média como em porcentagem. A média do número de monovalentes por célula em metáfase I no parental *C. arabica* foi de 0,13±0,51 e o percentual de células analisadas com a presença de monovalentes foi de 6,67%.

Outra anomalia observada, ainda em metáfase I, foi a presença de tetravalentes. Registrou-se uma média de 0,07±0,25 de tetravalentes por célula e uma porcentagem de 6,67% das células com a presença de tetravalentes.

De acordo com os resultados da análise dos cromossomos, observou-se que 23,33% das células analisadas em metáfase I e 50% das células analisadas em metáfase II apresentaram cromossomos com segregação precoce.

Uma irregularidade encontrada com relativa freqüência em diversas fases da meiose foram os cromossomos retardatários. A presença de retardatários foi notada em 33,33% das células em anáfase I, 26,67% das células em telófase I, 36,67% das células em anáfase II e em 13,33% das células em telófase II.

Analisando-se os produtos meióticos verificou-se que o parental *C. arabica* apresentou uma alta porcentagem de tétrades normais (92,49%). Mesmo assim, essa planta ainda apresentou 1,67% de díades, 4,17% de tríades e 1,67% de células com micrócitos. A partir desses dados, estabeleceu-se o índice meiótico, ou seja, a porcentagem de tétrades normais, que foi de 94,17% para esse parental (Tabela 5).

Na análise meiótica realizada no parental *C. canephora* tetraplóide foram registrados igualmente a média de bivalentes, o número de cromossomos e também observadas irregularidades: monovalentes, tetravalentes, segregação precoce dos cromossomos para os pólos, retardatários, tríades, políades e micrócitos.

O número de cromossomos apresentou uma variação entre as células, já que em 60 células analisadas, observou-se: 48 células com 44 cromossomos; 6 células com 46 cromossomos; 5 células com 42 cromossomos e 1 célula com 40 cromossomos (Tabela 2).

Uma média igual a 20,03±1,69 de bivalentes por célula foi registrada nas células em metáfase I para a espécie *C. canephora*, sendo que este valor não foi significativamente diferente do registrado para o parental arabica.

O valor calculado por meio da contagem de células totais analisadas do parental *C. canephora,* demonstrou que 38,33% das células em divisão meiótica apresentaram algum tipo de anormalidade.

A média de monovalentes por célula em metáfase I foi de 0,80±1,13 e a porcentagem de células nesta fase apresentando monovalentes foi de 36,67%.

Do mesmo modo, a média de tetravalentes por célula em metáfase I foi de 0,70±0,79 e a porcentagem de células em metáfase I apresentando tetravalentes foi de 53,33%.

Outra anormalidade observada foi a segregação precoce dos cromossomos para os pólos em metáfase I e II. Na primeira divisão, observou-se que 6,67% das células possuíam cromossomos com segregação precoce, já na segunda divisão, 40% das células tiveram seus cromossomos fora da placa equatorial, seguindo para os pólos.

Para *C. canephora* também foram registrados cromossomos retardatários em 26,67% das células analisadas em anáfase I, 36,67% das células em telófase I, 36,67% das células em anáfase II e 36,67% em telófase II.

As tétrades para esse parental apresentaram-se da seguinte forma: uma porcentagem de 1,67% em forma de tríades, 2,50% de políades e 7,50% com a presença de micrócitos. A partir da porcentagem de tétrades normais calculou-se o índice meiótico, que foi igual a 88,33% (Tabela 5).

Tabela 4 - Porcentagem de anormalidades meióticas e viabilidade polínica das plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 (P_1) e *C. canephora* cv Robusta Co 254 (P_2) e do híbrido arabusta F_1

Planta	Fases da meiose e tipos de anormalidades														
	Células meióticas			Met I					Ana I	Telo I	Met II	Ana II	Telo II	Tétrade	
	Total	Irregulares		Mono	Tri	Tetra	Poli	Prec	Retard.	Retard.	Prec.	Retard.	Retard.	Normais	Anormais
		N	%												
P_1	360	112	31,10	6,67	0,00	6,67	0,00	23,33	33,33	26,67	50,00	36,67	13,33	92,49	7,51
P_2	360	138	38,33	36,67	0,00	53,33	0,00	6,67	26,67	36,67	40,00	36,67	36,67	88,33	11,67
F_1	360	293	81,39	86,67	0,00	20,00	3,33	23,33	80,00	70,00	80,00	80,00	91,67	25,84	74,16

Met I=metáfase I; Ana I=anáfase I; Telo I=telófase I; Met II=metáfase II; Ana II=anáfase II; Telo II=telófase II

Mono=monovalentes; Tri=trivalentes; Tetra=tetravalentes; Poli=polivalentes; Prec=segregação precoce; Retard.=retardatários

N= número de células em divisão meiótica com irregularidades

Tabela 5 - Porcentagens de díades, tríades, políades e micrócitos encontrados nas tétrades; índice meiótico e viabilidade dos grãos de pólen medidos por coloração (VPC) e por germinação (VPG), para os parentais *C. arabica* cv Bourbon Vermelho Co 667 (P_1) e *C. canephora* cv Robusta Co 254 (P_2) e no híbrido arabusta (F_1)

Plantas	Tétrade				Índice meiótico	VPC	VPG
	Díades	Tríades	Políades	Micrócitos			
P_1	1,67	4,17	0,00	1,67	94,17	84,21	38,60
P_2	0,00	1,67	2,50	7,50	88,33	62,86	12,27
F_1	0,00	0,83	0,00	73,33	25,83	53,70	6,25

4.1.2 Híbrido arabusta F_1

Ao analisar células em metáfase I do híbrido arabusta F_1 pode-se constatar um número inconstante de cromossomos que variou de 2n=40 a 2n=46 (Tabela 2).

O estudo da meiose revelou várias anomalias, tais como: monovalentes, tetravalentes, polivalentes, segregação precoce, cromossomos retardatários, bivalentes nos pólos, tríades e micrócitos e os resultados das médias e porcentagens estão respectivamente nas tabelas 3, 4 e 5.

A média de bivalentes por célula analisada em metáfase I, no híbrido arabusta F_1, foi de 18,97±2,31.

A porcentagem de células meióticas com anomalias indica que a taxa de irregularidades no híbrido arabusta F_1 foi elevada, chegando a atingir 81,39% das células em divisão meiótica.

Em metáfase I, observou-se uma média igual a 0,80±2,77 de monovalentes por célula e uma porcentagem de células com a presença de monovalentes igual a 86,67%. Este valor diferiu significativamente a 5% pelo teste de Tukey, dos parentais (Tabela 3).

Da mesma forma, a média de tetravalentes observados por célula foi igual a 0,20±0,41 e a porcentagem das células analisadas em metáfase I com tetravalentes foi de 20%.

Outra anomalia observada foi a presença média de 0,03±0,18 de polivalentes em média por célula, e uma porcentagem de 3,33% de células com polivalentes.

Analisando-se as células meióticas, pode-se observar ainda uma segregação precoce dos cromossomos para os pólos. Essa anomalia esteve presente em 23,33% das células analisadas em metáfase I e em 80% das células analisadas em metáfase II.

A ocorrência de cromossomos retardatários também foi freqüente no híbrido F_1 avaliado. Registrou-se a presença dessa anomalia em 80% das células analisadas em

anáfase I e em 70% das células em telófase I. Na segunda divisão meiótica também se pôde observar retardatários nas células, assim sendo, observou-se retardatários em 80% das células analisadas em anáfase II e em 91,67% das células em telófase II. Todos estes valores foram superiores aos encontrados nos parentais P_1 e P_2 (Tabela 4).

Observaram-se também bivalentes que não se separaram, nos pólos das células em anáfase I, porém essa irregularidade não foi contabilizada.

As tétrades também se mostraram anormais em forma de tríades e com a presença de micrócitos, corroborando com as irregularidades da meiose. Para o híbrido arabusta F_1 verificou-se a ocorrência de 0,83% de tríades e também 73,33% de tétrades contendo micrócitos.

Esses dados das tétrades permitiram calcular o índice meiótico que foi igual a 25,83% para o híbrido arabusta F_1, valor bem inferior aos dos parentais P_1 e P_2 (Tabela 5).

4.1.3 População F_2

O número cromossômico também foi verificado e constatou-se a ocorrência de número variável de cromossomos nas células em metáfase I em todas as plantas de híbridos F_2 analisadas e essa variação do número de cromossomos ocorreu tanto entre as células de uma mesma planta, quanto entre as plantas (Tabela 6). A planta 89 apresentou a menor porcentagem de células com 44 cromossomos (16,67%) enquanto que as plantas 40, 98 e 99 apresentaram a maior porcentagem de células analisadas com 44 cromossomos (93,33%).

Nas análises meióticas realizadas nas 30 plantas de híbridos F_2 foram registrados de um modo geral, altos índices de irregularidades meióticas. As plantas apresentaram uma variação em relação ao total de anormalidades, assim como, para cada tipo de anomalia. Desse modo, a planta que apresentou a menor porcentagem total de células em divisão meiótica com anomalias (51,1%) foi a planta 94, enquanto a maior porcentagem (93,3%) foi registrada na planta 143 (Tabela 7).

Foram observados bivalentes associados a vários tipos de anomalias, tais como: variação no número de cromossomos, monovalentes, multivalentes, segregação precoce, presença de retardatários, bivalentes nos pólos, pontes cromossômicas, cromossomos com aderência, díades, tríades e micrócitos.

Os bivalentes, observados na meiose desses híbridos foram contabilizados e expressos em média de bivalentes por célula. Essa média variou entre as plantas: de

15,10±3,23 na planta 124 a 19,50%±1,25 na planta 23 (Tabela 8). Observou-se que os bivalentes, normalmente pareados, apresentaram-se em sua maioria, na forma de bastão (Figura 3A).

Tabela 6 - Números cromossômicos para células analisadas na população amostrada de híbridos arabusta F_2

Plantas	N° cromossômico (2n)							
	40	**41**	**42**	**43**	**44**	**46**	**47**	**48**
	N° de células							
01	0	1	6	0	23	0	0	0
07	2	2	4	0	21	1	0	0
16	3	1	1	0	21	4	0	0
17	3	2	4	0	21	0	0	0
23	2	1	1	0	25	1	0	0
35	*	*	*	*	*	*	*	*
29	0	1	0	0	27	2	0	0
38	5	0	2	0	23	0	0	0
39	1	1	1	0	26	0	1	0
40	0	0	2	0	28	0	0	0
44	5	0	0	1	23	1	0	0
45	3	0	5	0	17	5	0	0
54	2	1	3	0	22	1	0	1
56	4	0	7	0	17	2	0	0
57	5	0	3	0	21	1	0	0
60	0	2	0	0	20	3	3	2
63	5	0	5	0	19	1	0	0
73	9	0	0	0	18	1	0	2
74	3	0	2	0	24	0	0	1
82	4	1	4	0	21	0	0	0
86	1	1	2	0	26	0	0	0
89	5	0	14	0	5	4	0	2
94	5	2	6	1	16	0	0	0
98	2	0	0	0	28	0	0	0
99	0	0	0	0	28	1	0	1
102	1	2	1	0	26	0	0	0
117	4	0	5	1	19	0	0	1
124	7	0	3	0	16	2	0	2
143	9	0	6	1	14	0	0	0
152	5	0	5	0	20	0	0	0

N=30 células analisadas por planta;
* Contagem não realizada

Analisando-se os resultados, constatou-se que a presença de monovalentes em metáfase I (Figura 3B e 3C) é, comparativamente, a anomalia mais freqüente registrada para os híbridos F_2. Os resultados para o registro dessa anomalia foram apresentados em médias por célula e em porcentagem de células. A média de monovalentes por célula analisada variou de 2,80±1,77 na planta 63 a 7,07±2,36 na planta 98 (Tabela 8).

Igualmente, a porcentagem de células com monovalentes apresentou-se variável entre as plantas sendo a menor delas (75%) observada na planta 86. No entanto essa anomalia foi observada em 100% das células analisadas para as plantas 07, 16, 17, 38, 40, 45, 54, 56, 73, 89, 94, 98, 99 e 143 (Tabela 9).

Também na metáfase I, observou-se ainda a presença de multivalentes, mais especificamente divididos em trivalentes (Figura 3D), tetravalentes (Figura 3A) e polivalentes (Figura 3B e 3D).

Em relação à presença de trivalentes, quando se contabilizou o número de trivalentes por célula, observou-se uma variação da média de 0,00 nas plantas 94 e 99 a 0,63±0,76 na planta 60 (Tabela 8). Já quando a porcentagem de células com a presença de trivalentes foi calculada, não foi registrada nenhuma célula com a presença de trivalente (0%) nas plantas 94 e 99, por outro lado, a planta 60 apresentou uma porcentagem de 46,67% das células com essa anomalia (Tabela 9).

Quanto à presença de tetravalentes nas células das plantas híbridas F_2, a planta 23 teve a menor média por célula (0,10±0,40), enquanto a planta 74 apresentou a maior média (1,60±1,19) (Tabela 8). A menor porcentagem de células com tetravalentes foi registrada também para a planta 23 (6,67%) e a mais elevada para planta 16 (83,33%) (Tabela 9).

Outra forma de anomalia encontrada em metáfase I foram os polivalentes. Essa anomalia não foi registrada em todas as plantas F_2, mas em algumas os polivalentes foram freqüentes. A presença de polivalentes nas células em metáfase I analisadas variou em média de 0,00 nas plantas 16, 23, 29, 39, 40, 45, 89 e 143, a 0,97±1,31 na planta 152 (Tabela 8). Calculou-se ainda a porcentagem de células com a presença de polivalentes, a qual também variou, sendo que a planta 56 apresentou o maior valor, 43,33% de células com polivalentes (Tabela 9).

Tabela 7 - Número total de células em divisão meiótica (CDM) analisadas, número e porcentagem de células com divisão meiótica irregular, índice meiótico (%) e porcentagem de grãos de polens viáveis obtidos por meio de coloração (VPC) e germinação *in vitro* (VPG) para a população F_2 de híbridos arabusta de café (Continua)

	Plantas														
	01	**07**	**16**	**17**	**23**	**29**	**35***	**38**	**39**	**40**	**44**	**45**	**54**	**56**	**57**
N° CDM analisadas	180	180	180	180	180	160	180	160	170	180	180	180	170	180	180
N° CDM irregulares	112	105	111	135	113	131	105	111	125	121	108	124	114	110	121
% CDM irregulares	62,2 (61-36)	58,3 (57-40)	61,7 (60-37)	75,0 (74-24)	62,8 (61-36)	72,8 (71-26)	58,3 (68-29)	61,7 (64-33)	69,4 (68-29)	67,2 (66-31)	60,0 (58-39)	68,9 (67-30)	63,3 (62-35)	61,1 (60-37)	67,2 (66-31)
Índice meiótico	55,0 (43-53)	51,7 (50-46)	10,0 (9-88)	20,0 (19-78)	35,0 (33-63)	26,7 (25-71)	48,3 (53-43)	48,3 (46-50)	60,0 (58-38)	46,7 (45-51)	6,7 (6-91)	41,7 (40-56)	15,0 (14-83)	11,7 (11-86)	25,0 (24-73)
VPC	79,0 (77-20)	78,0 (76-20)	74,9 (73-23)	55,0 (53-43)	56,6 (54-41)	48,7 (46-49)	68,5 (66-30)	68,8 (67-29)	62,2 (60-36)	66,0 (64-35)	52,2 (50-46)	79,2 (77-19)	55,9 (54-42)	41,0 (39-57)	44,2 (42-53)
VPG	10,0 (9-88)	9,8 (9-88)	36,5 (35-61)	4,2 (4-94)	7,7 (7-91)	38,4 (36-59)	21,1 (20-77)	21,3 (20-77)	21,4 (20-76)	7,5 (7-91)	7,4 (7-91)	31,8 (30-66)	16,9 (16-81)	12,0 (11-86)	7,8 (7-90)

* Planta 35 não teve análise da metáfase I

Tabela 7 – Continuação.

	Plantas														
	60	**63**	**73**	**74**	**82**	**86**	**89**	**94**	**98**	**99**	**102**	**117**	**124**	**143**	**152**
N° CDM analisadas	180	180	180	180	180	160	170	180	180	180	180	180	170	180	180
N° CDM irregulares	118	122	159	100	119	96	127	92	112	133	136	133	102	168	128
% CDM irregulares	65,6 (64-33)	67,8 (66-31)	88,3 (87-11)	55,6 (54-43)	66,1 (65-33)	53,3 (58-39)	70,6 (69-28)	51,1 (56-41)	62,2 (64-33)	73,9 (72-25)	75,6 (74-23)	73,9 (72-25)	56,67 (58-39)	93,3 (92-6)	71,1 (70-28)
Índice meiótico	35,0 (33-63)	48,3 (46-50)	5,0 (5-93)	58,3 (56-40)	11,7 (11-86)	41,7 (40-56)	28,3 (27-69)	46,7 (45-51)	51,7 (50-46)	70,0 (68-28)	16,7 (16-81)	35,0 (33-63)	40,0 (38-58)	65,0 (63-33)	31,7 (30-63)
VPC	28,6 (27-69)	74,3 (72-24)	56,5 (54-41)	26,2 (25-72)	47,5 (45-50)	*	52,3 (50-45)	72,5 (70-26)	48,4 (46-49)	44,7 (43-53)	44,5 (42-53)	69,6 (67-29)	70,8 (69-27)	70,7 (68-28)	49,7 (48-50)
VPG	6,8 (6-91)	28,5 (27-69)	*	*	8,5 (8-90)	*	3,8 (3-95)	15,9 (15-82)	3,4 (3-95)	*	15,0 (14-83)	10,7 (10-87)	9,6 (9-89)	16,2 (15-82)	7,3 (6-91)

CDM=células em divisão meiótica;
* Fase não analisada

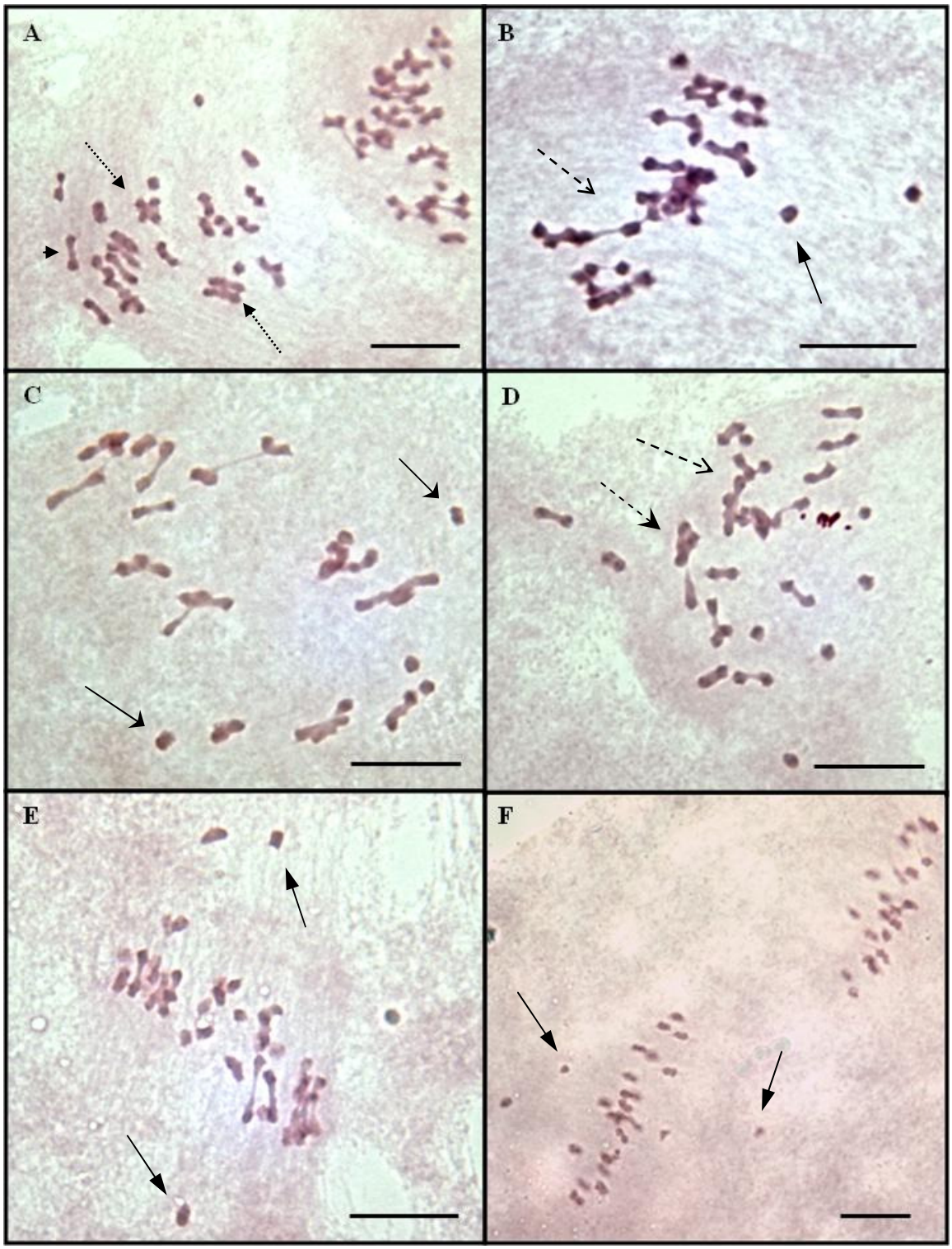


Figura 3 - Irregularidades em células em divisão meiótica nas fases de metáfase I e metáfase II de plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Bivalente na forma de bastão (➧) e tetravalentes (⋯➧); B: Polivalente (- -➧) e cromossomos em segregação precoce (⟶); C: Monovalentes (⟶) ; D: Trivalente (- -➧) e Polivalente (⟶); E, F: Cromossomos em segregação precoce (- -➧). Barra= 10µm.

Tabela 8 - Médias e desvios padrão do número de bivalentes, monovalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes na fase de metáfase I, nas plantas da população F_2 examinadas

Geração	Plantas	Monovalente (I)	Bivalente (II)	Trivalente (III)	Tetravalente (IV)	Polivalente (poli)
F_2	**1**	3,77±1,68	19,27±1,67	0,07±0,25	0,23±0,50	0,03±0,18
	7	4,33±1,35	17,77±1,87	0,10±0,31	0,57±0,68	0,03±0,18
	16	4,67±1,74	16,37±2,11	0,03±0,18	0,20±0,60	0,00
	17	4,83±1,46	18,17±1,70	0,03±0,18	0,37±0,56	0,03±0,18
	23	4,59±1,62	19,50±1,25	0,03±0,18	0,10±0,40	0,00
	29	4,33±2,04	19,13±1,33	0,17±0,46	0,20±0,48	0,00
	35	*	*	*	*	*
	38	4,95±1,39	17,40±1,85	0,10±0,31	0,55±0,76	0,10±0,31
	39	4,53±1,81	18,43±1,70	0,20±0,48	0,47±0,73	0,00
	40	4,23±1,65	18,87±1,31	0,03±0,18	0,43±0,63	0,00
	44	3,53±2,32	15,67±2,64	0,37±0,76	1,17±0,79	0,40±0,72
	45	4,57±1,79	18,60±1,59	0,03±0,18	0,33±0,55	0,00
	54	5,47±1,93	16,57±2,54	0,10±0,31	1,07±0,92	0,13±0,35
	56	3,50±1,04	16,50±2,39	0,17±0,38	0,57±0,68	0,63±0,85
	57	3,90±1,63	17,73±2,12	0,40±0,81	0,47±0,51	0,10±0,40
	60	4,37±2,04	15,23±2,31	0,63±0,76	1,17±0,91	0,53±0,82
	63	2,80±1,77	18,43±1,79	0,07±0,25	0,43±0,68	0,13±0,35
	73	6,47±1,43	16,67±1,72	0,13±0,35	0,27±0,52	0,20±0,41
	74	3,27±1,55	16,20±2,98	0,23±0,63	1,60±1,19	0,20±0,48
	82	3,20±2,31	17,50±2,53	0,07±0,25	0,73±0,83	0,17±0,38
	86	3,45±2,46	16,65±2,25	0,10±0,31	1,15±0,88	0,25±0,44
	89	5,63±2,11	17,20±1,95	0,03±0,18	0,53±0,78	0,00
	94	3,53±1,50	17,63±1,87	0,00	0,77±0,90	0,10±0,31
	98	7,07±2,36	17,00±2,12	0,30±0,53	0,30±0,47	0,07±0,25
	99	3,80±1,71	19,13±1,66	0,00	0,43±0,57	0,03±0,18
	102	5,37±2,54	17,27±2,32	0,10±0,31	0,63±0,72	0,13±0,35
	117	5,83±1,53	16,43±2,03	0,23±050	0,60±0,77	0,20±0,41
	124	4,25±3,01	15,10±3,23	0,60±1,05	1,05±0,94	0,35±0,67
	143	5,63±2,08	17,27±2,20	0,13±0,43	0,40±0,67	0,00
	152	4,10±1,74	18,47±2,39	0,10±0,40	0,40±0,50	0,97±1,30

* Fase não analisada

Analisando o comportamento dos cromossomos, verificou-se uma segregação precoce de cromossomos para os pólos das células (Figura 3B), que variou em metáfase I, de 23,33% nas células da planta 143 a 70% nas plantas 89 e 98. Na metáfase II, essa anomalia também foi observada (Figura 3F), e pôde-se notar que a menor porcentagem de células com segregação precoce para os pólos foi a da planta 74 (33,33%) e a maior (83,33%) a da planta 73 (Tabela 9).

Apesar de não ter sido contabilizado o número de cromossomos nos pólos das células, foi registrado nas análises efetuadas em anáfase I a segregação irregular dos cromossomos.

A presença de cromossomos retardatários foi observada em todas as plantas nas fases de anáfase I, telófase I, anáfase II e telófase II (Figuras 4 e 5D). Em anáfase I as porcentagens de células com retardatários variaram de 26,67% na planta 74 a 86,67% nas plantas 73 e 99. Na telófase I os valores variaram de 36,67% das células na planta 94 a 90% das células na planta 73. Já na anáfase II, as plantas 07 e 63 apresentaram as menores porcentagens (56,67%), enquanto que a planta 73 teve 90% das células analisadas com retardatários. E em telófase II, as porcentagens de células com essa anomalia variaram de 23,33% na planta 07 a 86,67% na planta 82 (Tabela 9).

Foram notadas também outras anormalidades nas plantas (Tabela 9). Observou-se a presença de pontes cromossômicas nas células em anáfase I das plantas 29, 45 e 94 (Figura 5E), a segregação de bivalentes para os pólos nas plantas 01, 23, 54, 74, 89 e 102 (Figura 5B e 5C). Foram observadas também, células com cromossomos aderidos, "stickness" (Figura 4D) nas plantas 01 (6,66%) e 63 (3,33%) e na telófase II a formação de núcleos desiguais nas plantas 01, 23, 29, 45, 57, 60, 82, 86, 98 e 124 (Figura 5F).

Todas as irregularidades da meiose mencionadas nas plantas híbridas analisadas contribuíram para a formação de tétrades anormais (Figura 6). Na planta 44, encontrou-se a maior porcentagem de díades (5%) (Figura 6D) e tríades (30%) (Figura 6B). Já a porcentagem de políades (Figura 6E) foi mais elevada na planta 07 (3,33%). A presença de micrócitos (Figura 6F) foi freqüente e encontrada em todas as plantas, deste modo, a porcentagem de produtos meióticos com micrócitos variou de 26,67% na planta 99 a 90% na planta 73.

Por meio da porcentagem de tétrades normais (Figura 6A), calculou-se o índice meiótico (Tabela 7). A planta 73 mostrou o menor índice meiótico (5%) e a planta 99 o maior índice (70%).

Tabela 9 - Porcentagens de anormalidades meióticas em plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café (Continua)

Fases	Anormalidades (%)	Plantas														
		01	**07**	**16**	**17**	**23**	**29**	**35**	**38**	**39**	**40**	**44**	**45**	**54**	**56**	**57**
Met I	**Monovalentes**	93,33	100,00	100,00	100,00	90,00	96,67	*	100,00	96,67	100,00	80,00	100,00	100,00	100,00	96,67
	Trivalentes	6,67	10,00	3,33	3,33	3,33	13,33	*	10,00	16,67	3,33	23,33	3,33	10,00	16,67	23,33
	Tetravalentes	20,00	46,67	83,33	33,33	6,67	16,67	*	40,00	33,33	36,67	80,00	30,00	63,33	46,67	46,67
	Polivalentes	3,33	3,33	13,33	3,33	0,00	0,00	*	10,00	0,00	0,00	26,67	0,00	13,33	43,33	6,67
	Segregação precoce	40,00	56,67	50,00	56,67	63,33	63,33	*	25,00	63,33	63,33	46,67	40,00	60,00	46,67	40,00
Ana I	**Retardatários**	36,67	66,67	50,00	60,00	63,33	73,33	60,00	80,00	56,67	50,00	33,33	76,67	56,67	66,67	53,33
	Ponte	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00
Telo I	**Retardatários**	46,67	43,33	60,00	73,33	66,67	83,33	80,00	46,67	63,33	60,00	53,33	76.67	56,67	76,67	66,67
Met II	**Segregação precoce**	60,00	63,33	50,00	60,00	76,67	50,00	60,00	50,00	60,00	56,67	53,33	43,33	50,00	56,67	56,67
Ana II	**Retardatários**	70,00	56,67	66,67	80,00	83,33	60,00	76,67	76,67	70,00	63,33	63,33	73,33	70,00	76,67	66,67
	Stickness	6,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Telo II	**Retardatários**	63,33	23,33	60,00	76,67	50,00	73,33	73,33	50,00	70,00	73,33	66,67	43,33	46,67	76,67	63,33
	Núcleos desiguais	6,66	0,00	0,00	0,00	6,66	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	3,33
Tétrades	**Díades**	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Tríades	0,00	0,00	23,33	0,00	0,00	8,33	0,00	0,00	0,00	3,33	30,00	3,33	0,00	1,67	3,33
	Políades	1,67	1,67	10,00	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00	1,67	0,00	1,67	3,33	1,67	0,00	0,00
	Micrócitos	53,33	45,00	56,67	80,00	65,00	63,33	45,00	51,67	63,33	50,00	56,67	51,67	83,33	86,67	71,67

Met I=metáfase I; Ana I=anáfase I; Telo I=telófase I; Met II=metáfase II; Ana II=anáfase II; Telo II=telófase II

* Fase não analisada

Tabela 9 - (Continuação)

Fases	Anormalidades (%)	Plantas														
		60	**63**	**73**	**74**	**82**	**86**	**89**	**94**	**98**	**99**	**102**	**117**	**124**	**143**	**152**
Met I	**Monovalentes**	96,67	86,67	100,00	96,67	76,67	75,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	90,00	80,00	100,00	96,67
	Trivalentes	46,67	6,67	13,33	16,67	6,67	10,00	3,33	0,00	3,33	0,00	10,00	10,00	35,00	10,00	6,67
	Tetravalentes	73,33	36,67	23,33	80,00	53,33	75,00	36,67	50,00	36,67	40,00	50,00	43,33	65,00	30,00	40,00
	Polivalentes	40,00	13,33	20,00	16,67	16,67	25,00	0,00	10,00	0,00	3,33	13,33	20,00	25,00	0,00	3,33
	Segregação precoce	63,33	26,67	36,67	50,00	36,67	40,00	70,00	40,00	70,00	33.33	63,33	63,33	40,00	23,33	50,00
Ana I	**Retardatários**	46,67	66,67	86,67	26,67	53,33	33,33	60,00	70,00	73,33	86,67	76,67	80,00	70,00	80,00	73,33
	Ponte	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Telo I	**Retardatários**	63,33	60,00	90,00	53,33	76,67	70,00	43,33	36,67	40,00	60,00	70,00	60,00	53,33	80,00	80,00
Met II	**Segregação precoce**	56,67	66,67	83,33	33,33	66,67	63,33	76,67	40,00	63,33	60,00	66,67	63,33	46,67	63,33	50,00
Ana II	**Retardatários**	66,67	56,67	90,00	70,00	86,67	63,33	70,00	60,00	70,00	76,67	80,00	76,67	60,00	83,33	63,33
	Stickness	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Telo II	**Retardatários**	63,33	66,67	80,00	53,33	86,67	60,00	53,33	30,00	50,00	60,00	70,00	73,33	50,00	76,67	63,33
	Núcleos desiguais	6,66	0,00	0,00	0,00	3,33	10,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00
Tétrades	**Díades**	0,00	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00
	Tríades	1,67	1,67	5,00	0,00	0,00	0,00	3,33	1,67	0,00	3,33	3,33	0,00	18,33	5,00	0,00
	Políades	1,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Micrócitos	63,33	43,33	90,00	41,67	88,33	58,33	68,33	51,67	46,67	26,67	80,00	65,00	41,67	68,33	68,33

Met I=metáfase I; Ana I=anáfase I; Telo I=telófase I; Met II=metáfase II; Ana II=anáfase II; Telo II=telófase II

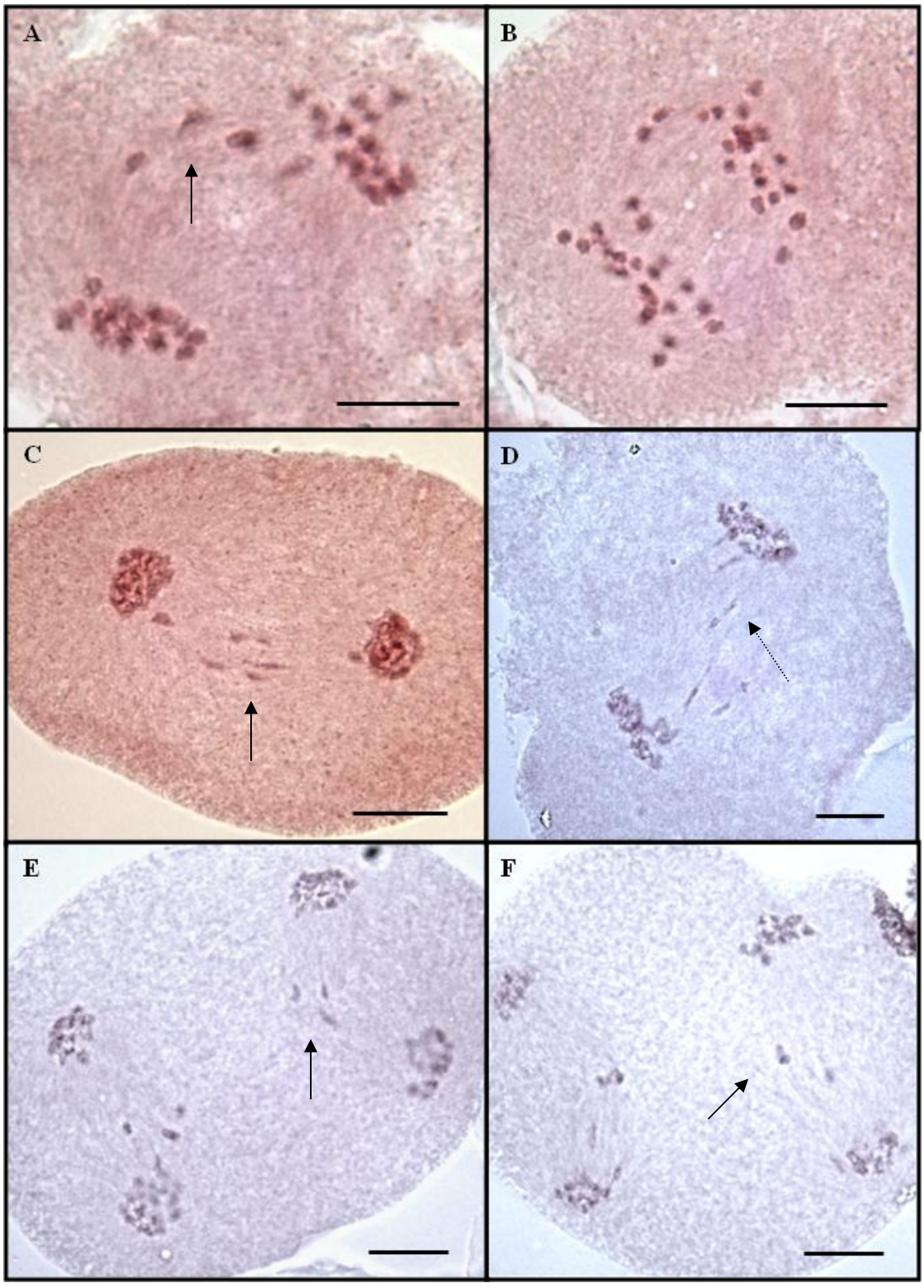


Figura 4 - Irregularidades em células em divisão meiótica, nas fases de anáfase I e anáfase II, de plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A-C: Cromossomos retardatários em anáfase I; D: Cromossomos com aderência; E-F: Cromossomos retardatários em anáfase II. Barra = 10µm.

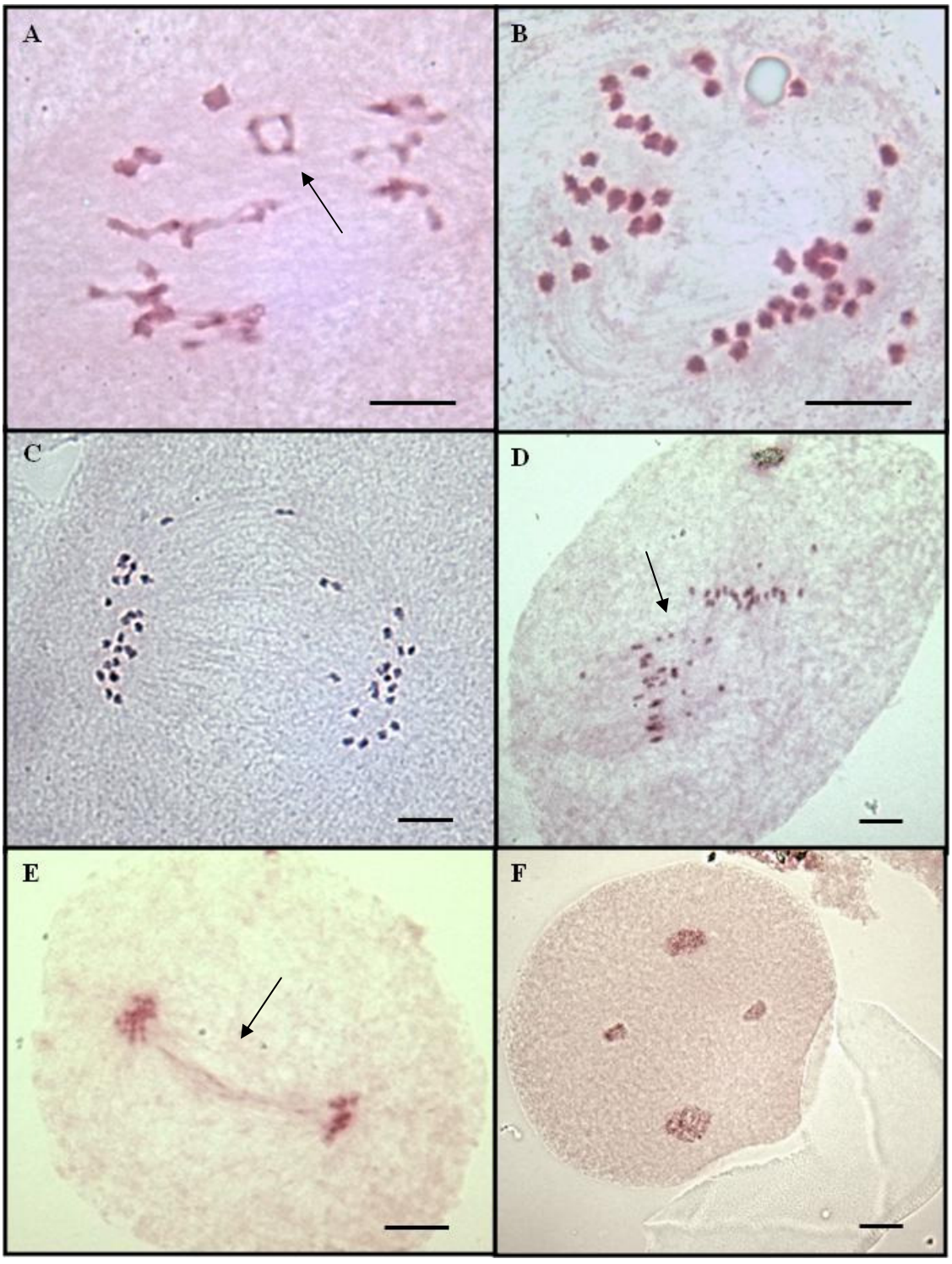


Figura 5 - Anomalias presentes em células em divisão meiótica das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Tetravalente; B-C: Bivalentes nos pólos; D: Cromossomos retardatários e precoces; E: Ponte cromossômica; F: Telófase II com núcleos desiguais. Barra = 10 µm.

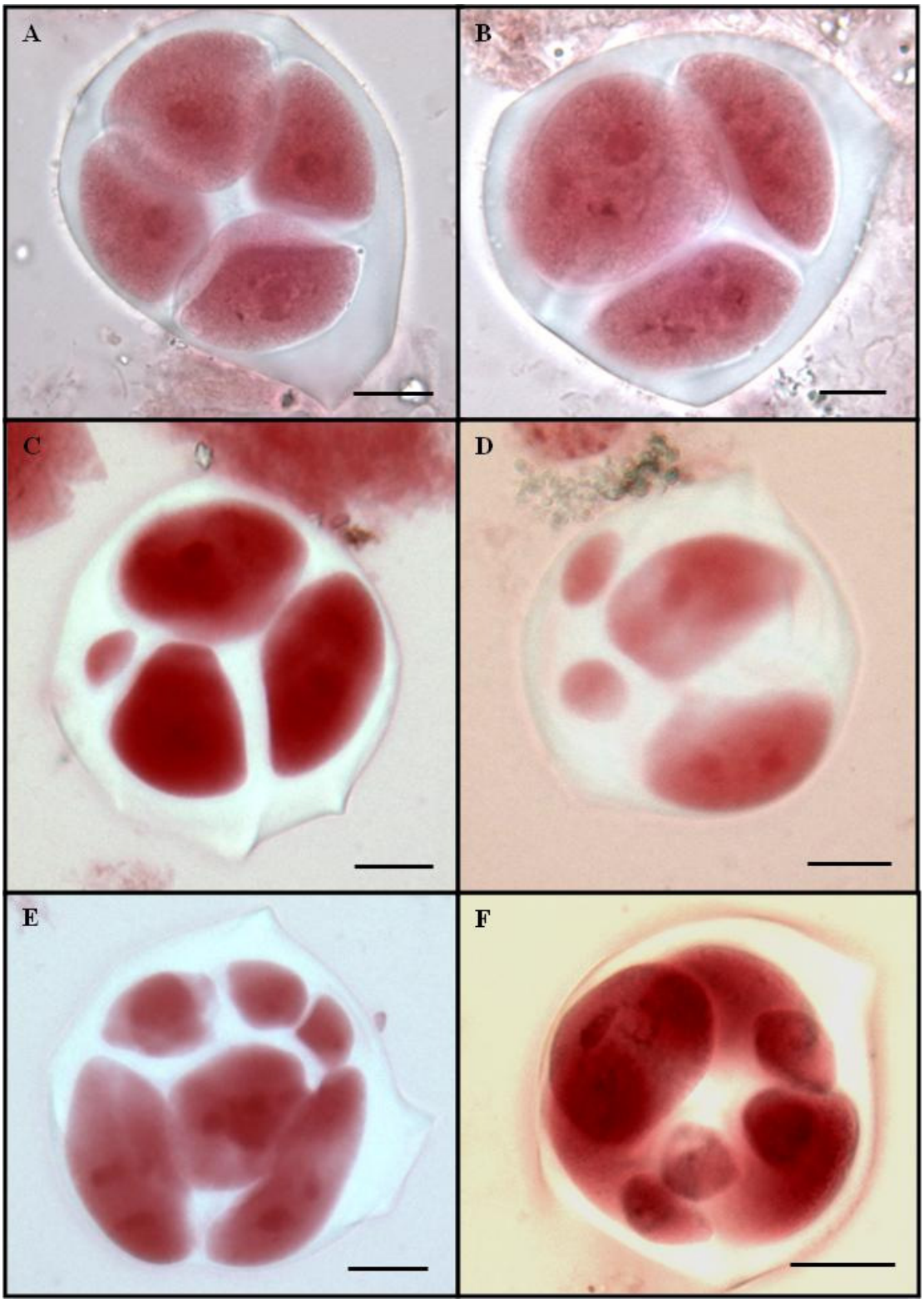


Figura 6 - Produtos finais da microsporogênese das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café. A: Tétrade normal; B: Tríade; C: Tríade com um micrócito; D: Díade com dois micrócitos; E: Políade com micrócitos irregulares; F: Tétrade com vários micrócitos. Barra = 10 µm.

4.2 Viabilidade polínica

4.2.1 Plantas parentais

Em relação à viabilidade polínica de *C. arabica* Co 667, foram realizados os testes por coloração e por germinação *in vitro*, tendo sido registradas porcentagens de viabilidade máxima iguais a 84,21% e 38,6% para cada um dos testes respectivamente (Tabela 5).

A análise dos polens evidenciou que o parental receptor (*C. arabica*) possui grãos bastante uniformes em relação ao tamanho e coloração (Figura 7A e 7B).

Em relação aos grãos de pólen de *C. canephora*, 62,86% deles mostraram-se viáveis (coloridos) nos testes de coloração. Para o teste de germinação uma porcentagem de 12,27% dos grãos apresentou-se viáveis, ou seja, com tubo polínico germinado (Tabela 5).

C. canephora Co254 demonstrou uma particularidade em relação ao tamanho do pólen. Nas preparações analisadas, alguns grãos apresentaram-se em tamanho relativamente maior que os demais (Figura 7C e 7D).

4.2.2 Híbrido arabusta F_1

Quanto à viabilidade polínica para o híbrido F_1, o teste de coloração mostrou 53,70% de viabilidade (VPC) e o teste de germinação *in vitro* somente 6,25% de viabilidade dos grãos (VPG) (Tabela 5).

A análise do pólen mostrou ainda diferenças em relação ao tamanho dos grãos e também a presença de micronúcleos dentro dos grãos (Figura 7E e 7F).

4.2.3 População F_2

Em relação à viabilidade do pólen, os testes de coloração evidenciaram melhor a viabilidade. Por esta razão, a estimativa de viabilidade foi dada pela contagem dos polens corados e não corados (Figura 8). A porcentagem de pólen viável variou entre as plantas F_2, sendo encontrada para planta 74 a menor viabilidade polínica por coloração (VPC) (26,24%), e para a planta 45 a maior (79,16%) (Tabela 6). Esse parâmetro não foi avaliado na planta 86 pelo fato de não ter sido possível obter botões florais na fase de desenvolvimento adequada.

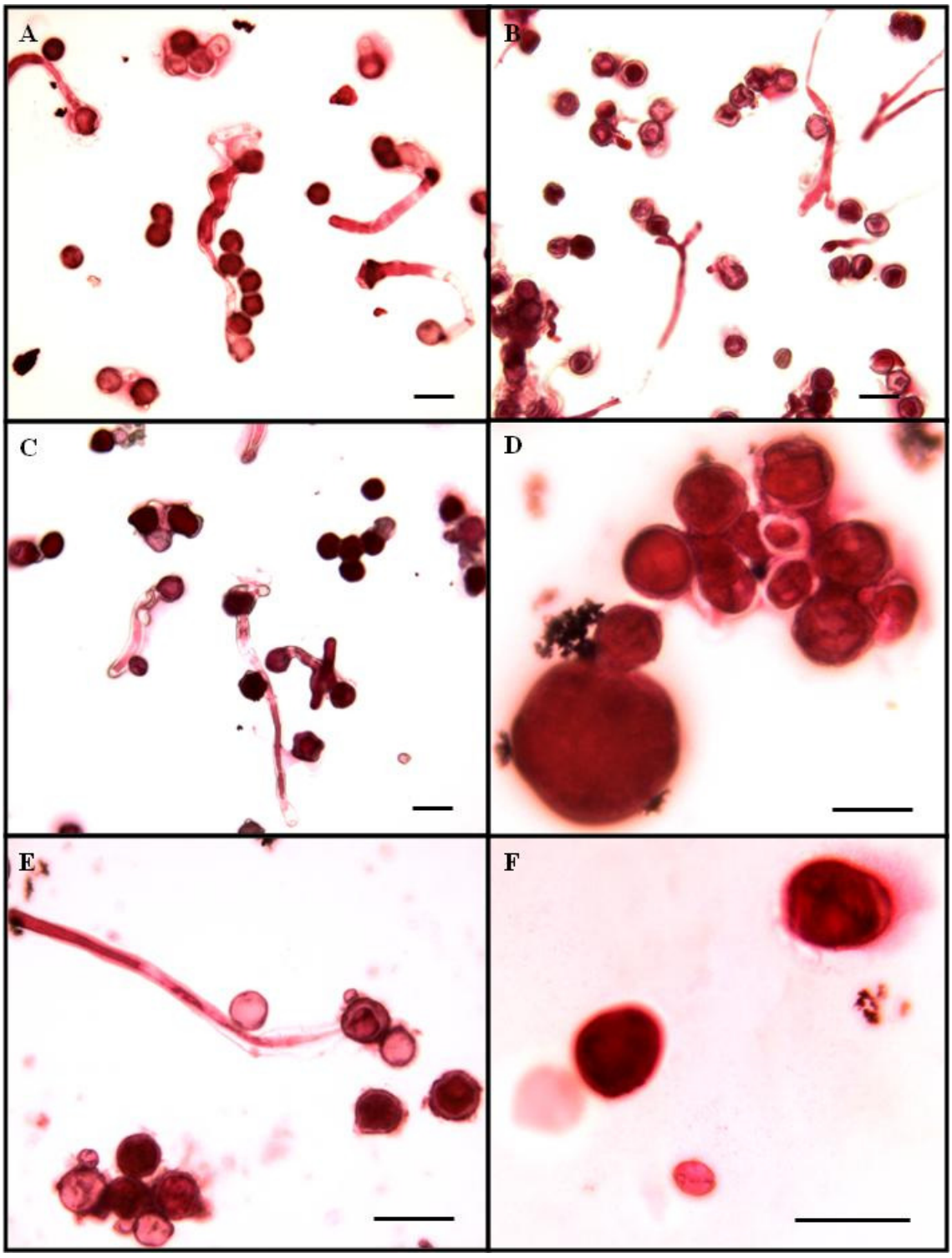


Figura 7 - Visão geral dos testes de germinação para os grãos de pólen das plantas parentais *C. arabica* cv Bourbon vermelho Co 667 e *C. canephora* cv Robusta Co254 e do híbrido arabusta F_1. A-B: Polens do parental *C.* arabi*ca*; C-D: Polens do parental *C. canephora*; E-F: Polens do híbrido F_1. Barra = 50 µm.

Para os testes de germinação, alguns testes foram realizados utilizando meios de cultura com composições e concentrações diferentes. E apesar da baixa germinação em todos eles, houve diferença quanto ao meio utilizado. O meio de germinação 6 foi utilizado para os testes de viabilidade já que apresentou o melhor percentual de germinação nos testes de meio de cultura (Tabela 10).

Nas avaliações de viabilidade do pólen por meio da germinação *in vitro* (VPG), consideram-se grãos viáveis aqueles cujo comprimento do tubo polínico emitido fossem igual ou superior ao diâmetro do pólen. Conforme apresentado no anexo 9, a VPG teve um valor máximo de 38,38% na planta 29 e mínimo de 3,40% na planta 98.

Tabela 10 - Porcentagem de polens germinados do híbrido arabusta F_2 em diferentes meios de germinação

Meios de germinação	Total de pólen	Total germinado	VPG (%)
Meio 1	1250	6	4,80
Meio 2	2250	5	2,22
Meio 3	2750	300	14,18
Meio 4	1800	0	0,00
Meio 5	1440	533	37,01
Meio 6	2000	657	38,80

As plantas 73, 74, 86 e 99 não tiveram o teste de germinação realizado pelo fato de não ter sido possível a obtenção de material, ou seja, botões florais na fase adequada de desenvolvimento. Os ramos com os botões jovens trazidos para o laboratório abortaram precocemente ou não formaram pólen em quantidade suficiente para os testes. Também devido às condições climáticas atípicas, como chuvas no período de inverno, nos dois anos em que foram feitos os experimentos da dissertação, a floração dos cafezais em geral foi irregular. Nesta, os botões das inflorescências não estavam uniformes, quanto ao desenvolvimento, devido ao excesso de umidade.

Além da porcentagem de polens viáveis, foi analisada também a diferença de tamanho do pólen, a presença de micronúcleos, quantidade de material citoplasmático no pólen e quantidade de calose. Essas características variaram de planta para planta, sendo necessário descrever cada planta individualmente.

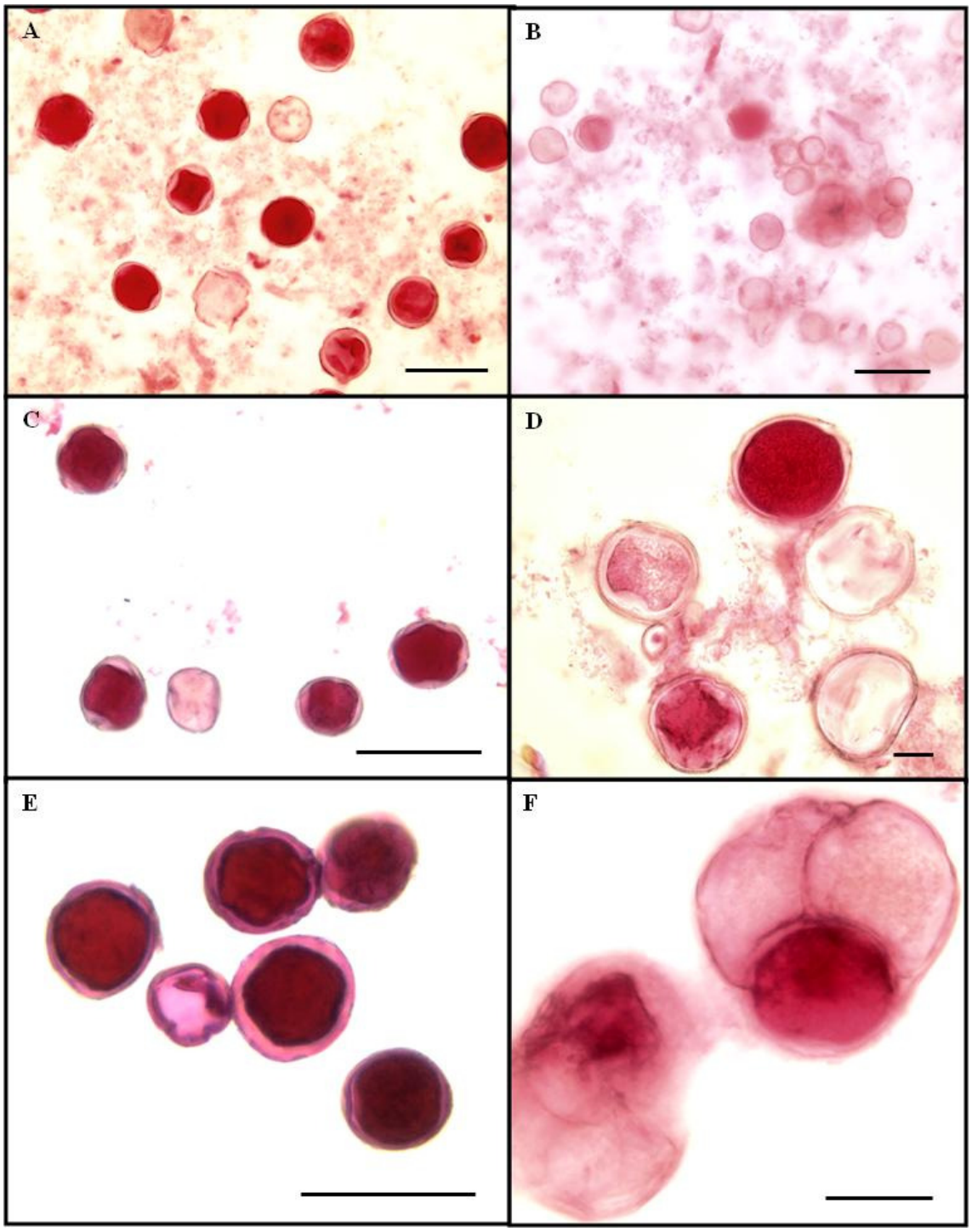


Figura 8 - Visão geral dos grãos de pólen das plantas da população F_2 de híbridos de arabusta de café submetidos ao teste de coloração com corante Alexander. A, B, C e D: Polens viáveis (coloridos) e polens inviáveis (sem coloração); E: Grãos com diferentes diâmetros; F: Tétrade mal formada. Barra = 50 µm.

Na planta 01 foram encontrados pouquíssimos grãos de pólen nas lâminas, os quais tinham um tamanho bastante regular. Muitos grãos de pólen apenas iniciaram a germinação sendo que os tubos cessaram o crescimento antes de atingirem o comprimento equivalente ao diâmetro do grão. Com base neste critério a taxa de emissão de tubos polínicos foi baixa e igual a 10,00% (Anexo IX). Na planta 07 havia uma grande quantidade de polens nas lâminas, os tubos emitidos eram translúcidos e sem conteúdo, alguns deles com dois tubos (Figura 9D) e, ao contrário da planta 01, os grãos tinham uma diferenciação de tamanho, com presença de micronúcleos (Figura 10B), e a VPG foi de 9,85%.

Igualmente, na planta 16 foi visto grande quantidade de polens, com diferença de tamanho e com micrócitos, além da presença de vários polens com tubos polínicos translúcidos sem conteúdo (Figura 10D). Porém, a porcentagem de germinação foi igual a 36,51%. Já na planta 17, as lâminas continham poucos polens, mas estes tinham diâmetros diversos e também uma grande quantidade de micronúcleos. Tubos polínicos sem conteúdo também foram observados. A taxa de germinação foi de 4,22%, como pode ser visto na tabela 6.

As lâminas da planta 23 possuíam relativamente maior quantidade de pólen, porém alguns grãos eram pouco coloridos ou até vazios, os quais não germinaram (Figura 10C). Além disso, visualizaram-se tubos polínicos vazios, translúcidos (sem coloração) e com pouco material; houve germinação de 7,70% dos polens. A planta 29 apresentou poucos grãos de pólen soltos nas lâminas, pois os mesmos estavam predominantemente em formação de cachos (Figura 9F). Observou-se também 61,62% de polens inviáveis e com diâmetros variados. Os grãos de pólen dessa planta apresentaram aspecto desidratado.

Observou-se pouca variação de tamanho entre os polens da planta 35 e alguns polens inviáveis eram de tamanho bem pequeno (Figura 10C). Encontraram-se também grãos de pólen agrupados no formato de cachos e grãos com tubos polínicos translúcidos, sem conteúdo. Contudo, no geral a taxa de germinação foi de 21,11%. A planta 38 mostrou grãos de pólen de tamanho uniforme, registrando-se poucos grãos de tamanho relativamente menor e uma VPG de 21,27%.

Para a planta 40, as lâminas continham poucos grãos de pólen tanto coloridos como sem coloração e ambos na mesma proporção. A germinação de tubos foi verificada em 7,48% dos polens e os tubos germinados eram comparativamente grandes (Figura 10B). Aparentemente, a parede do pólen da planta 40 era mais fina e os polens

estavam dispostos em pequenos grumos. Na planta 44 também foi observada diferença de tamanho nos grãos de pólen sendo que muitos estavam vazios, inviáveis, de tamanho menor que os demais e, com parede mais espessa. A taxa de germinação foi de 7,38%.

Na planta 45, os grãos de pólen apresentaram-se com tamanho regular e espalhados (Figura 10F). A germinação foi de 31,85% e foi registrada a presença de uma quantidade considerável tubos translúcidos e sem conteúdo (Figura 10D). As análises de pólen da planta 54 mostraram diferenças quanto ao tamanho dos grãos e a taxa de germinação foi de 16,86%, maior em comparação as outras 18 plantas (72%).

A planta 56 apresentou também uma diferença no tamanho dos grãos, ocorrendo a presença de muitos grãos inviáveis (Figura 10A), grão em formação de cachos, poucos tubos polínicos germinados e com comprimento maior que o diâmetro do grão e vários deles vazios. A taxa de germinação foi de 12,00%. A planta 57 também apresentou grãos de tamanhos extremos, alguns muito grandes e outros bem pequenos, destacando por esta diferença de tamanho de pólen (Figura 9C). A germinação foi de 7,78% e mostrou-se irregular quanto aos comprimentos dos tubos; registraram-se tubos polínicos com comprimentos variados.

No geral, os polens considerados normais e viáveis da planta 60 mostraram-se comparativamente pequenos sendo que os grãos considerados inviáveis (vazios/não coloridos), menores ainda. Foram contabilizados poucos polens germinados (6,67%) e alguns estavam agrupados em cachos (Figura 9E). A planta 63 apresentou polens vazios; os grãos cheios, viáveis e coloridos, tinham tamanho regular (Figura 10F). A taxa de germinação foi 28,54%, e sendo que os tubos alcançaram comprimentos comparativamente grandes em relação às demais plantas.

Nas lâminas das plantas 73 e 74 foi observada grande quantidade de polens vazios e alguns com coloração intermediária ou fraca. Os polens também se apresentaram com grandes diferenças de tamanho. A germinação dessas plantas não foi avaliada, devido às plantas terem murchado antes das flores se abrirem.

A planta 82 apresentou diferença de tamanho de pólen e a presença de muitos micrócitos (Figura 10A). Registrou-se uma baixa quantidade de polens germinados, sendo a taxa de germinação de 8,55%. O pólen da planta 86 não foi avaliado, pelo mesmo problema da plantas 73 e 74. Para a planta 89, observou-se pouca diferença no tamanho dos grãos de pólen, poucos tubos germinados (3,38%) e alguns grupos de grãos de pólen dispostos em cachos.

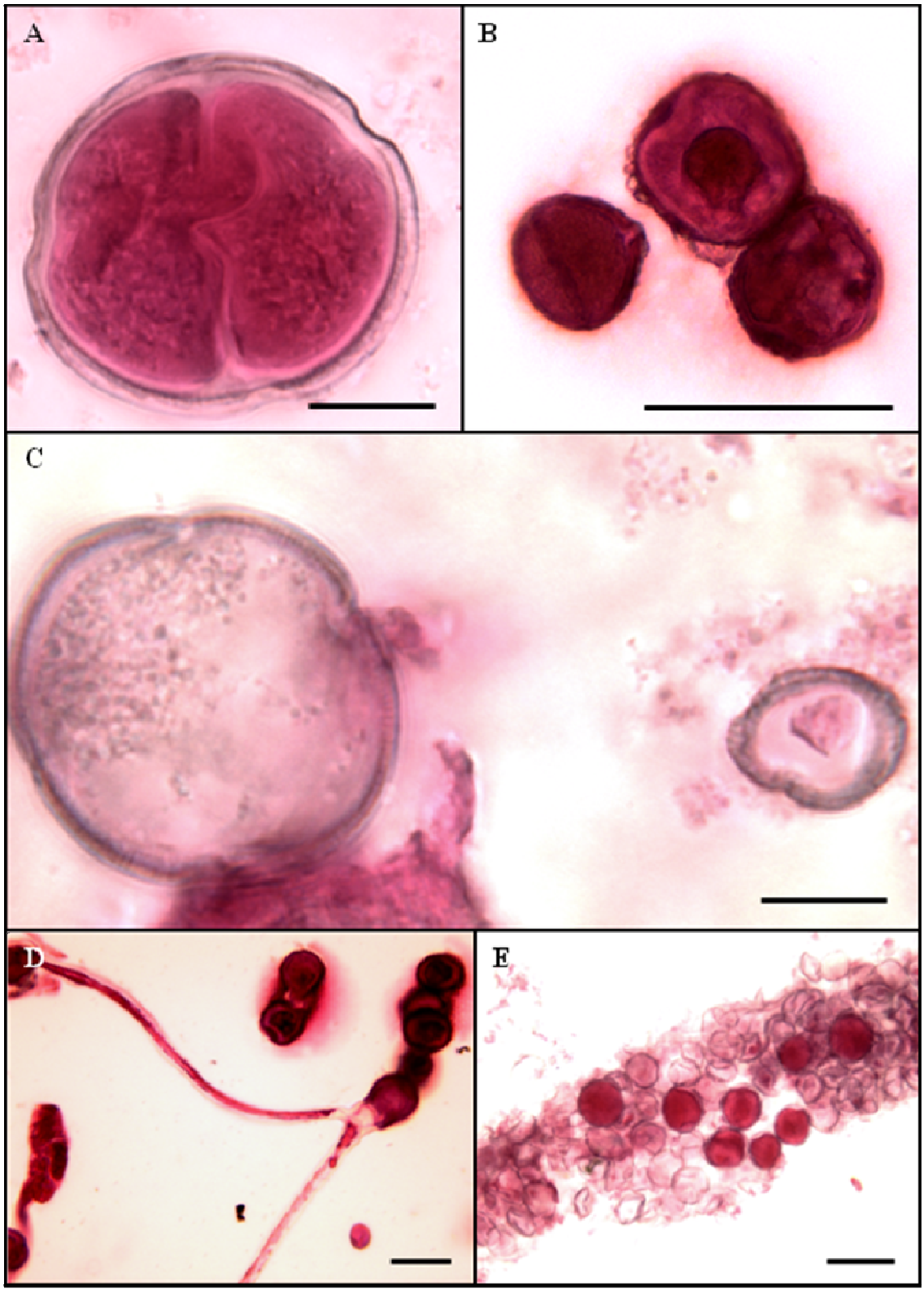


Figura 9 - Particularidades dos grãos de pólen das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café coloridos com Alexander. A: Dois grãos dentro de uma única capa de calose; B: Pólen com parede mais espessa; C: Diferença de tamanho entre polens inviáveis; D: Grão de pólen com dois tubos polínicos; E: Grãos de polens que permaneceram agrupados em cacho. Barra = 50 µm.

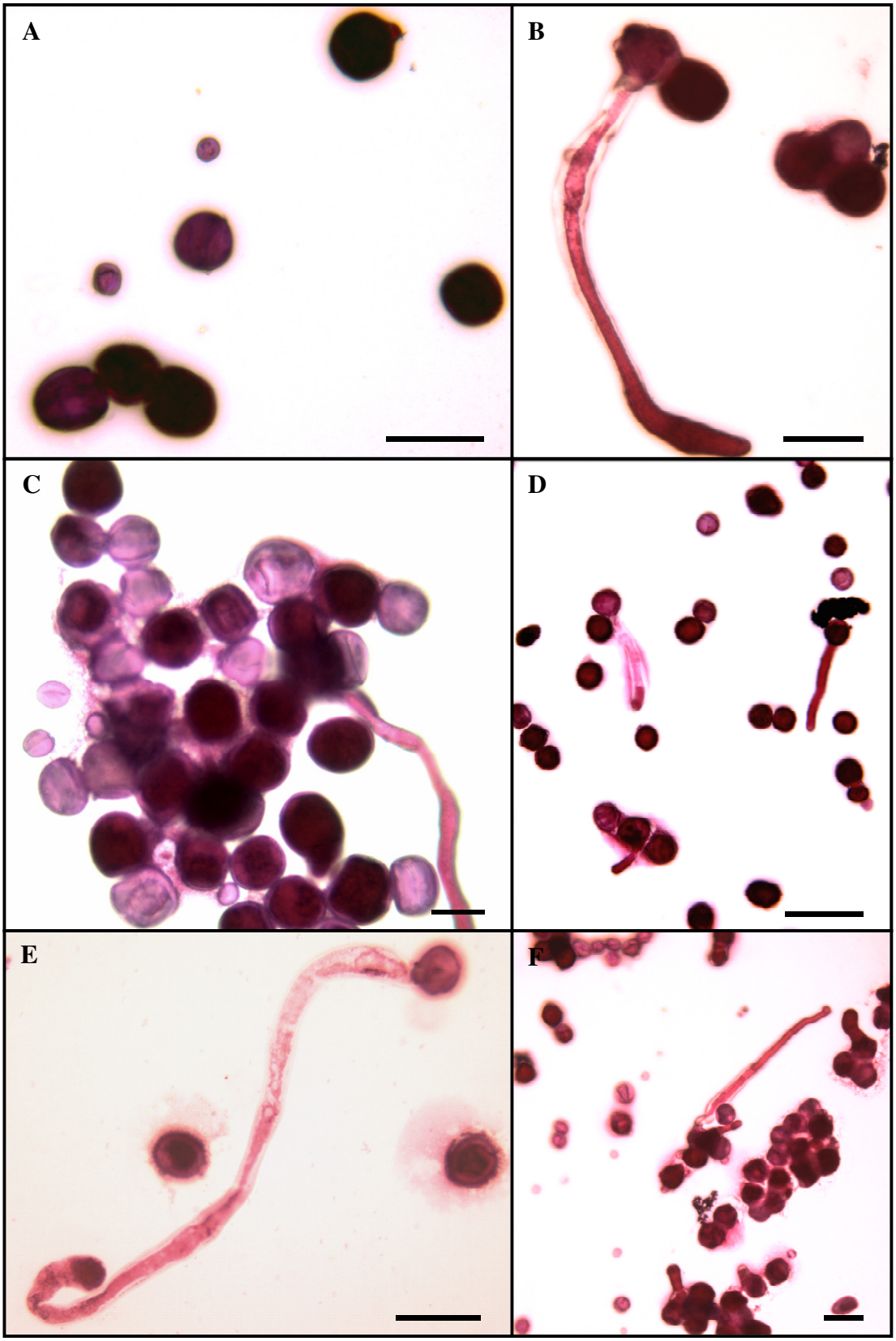


Figura 10 - Pólen das plantas F_2 de híbridos arabusta de café, coloração com corante Alexander. A C e F: Micrócitos misturados aos polens; B, E: Tubos polínicos normais com material genético; C: Diferença de viabilidade e tamanho de grãos de pólen; D: Tubos polínicos com e sem material genético. Barra = 50 µm.

A planta 94 apresentou uma diferença de tamanho de pólen, além de uma coloração intermediária. Os polens inviáveis eram de tamanho menor que os viáveis e encontrou-se além da presença de micrócitos bem pequenos, tubos translúcidos e sem conteúdo. A taxa de germinação foi igual a 15,90%. A planta 98 apresentou também polens com diferença de tamanho e uma coloração intermediária, além de muitos micronúcleos. Poucos polens germinaram (3,40%), mas os viáveis germinaram bem, apesar da presença de alguns tubos translúcidos.

As lâminas da planta 99 tinham poucos polens coloridos, mas que tinham formato e tamanhos regulares. A germinação não foi avaliada. Houve variação no tamanho dos polens da planta 102 que apresentou muitos grãos vazios e poucos germinados (15,00%). Já a planta 117 possuía polens de tamanhos uniformes. Com a germinação em meio de cultura, observaram-se tubos polínicos muito grandes (15,00%) e a presença de até dois tubos polínicos em um só pólen (Figura 9D).

A planta 124 mostrou um tamanho de pólen aproximadamente regular e com poucos micronúcleos. A germinação foi razoável em comparação com outras plantas (9,63%), mas os polens realmente viáveis germinaram bastante. Na planta 143, a porcentagem de pólen germinando foi de 16,19%, encontrando-se polens de tamanhos diferentes, como nas plantas 56 e 82, por exemplo, com micrócitos bem pequenos (Figura 10C), muitos polens vazios e polens com tubos translúcidos, além de polens abortados.

Nas lâminas da planta 152 notaram-se polens com coloração intermediária, muitos polens vazios, com tamanhos diferentes, além de tubos com pouco material genético, o que pode ter ocasionado a baixa taxa de germinação (7,26%).

4.3 Correlações

O coeficiente de correlação pelo teste de Pearson entre a porcentagem de células em divisão meiótica anormais e tétrades anormais foi de 0,47 a 1% de significância (Anexo X).

A porcentagem de células em divisão meiótica (CDM) com anomalias e a taxa de viabilidade obtida por coloração (VPC) não apresentou correlação a 5% de significância pelo teste de Pearson (r = -0,23). Quando foi avaliado o grau de associação entre a porcentagem de células em divisão meiótica (CDM) com anomalias e VPG, não foi observado também correlação entre essas variáveis (r = -0,23) (Anexos XI e XII).

O coeficiente de correlação pelo teste de Pearson foi de -0,34 a 5% de significância, indicando uma correlação moderada entre a porcentagem de tétrades anormais e viabilidade obtida por coloração. A tendência de correlação negativa indica que quanto maior a porcentagem de tétrades anormais, menor a VPC (Anexo XIII).

Não houve correlação entre a porcentagem de tétrades anormais e VPG, mas mesmo assim, o gráfico apresentou uma tendência de correlação negativa, ou seja, quanto maior a porcentagem de tétrades anormais, menor a VPG (Anexo XIV).

O coeficiente de correlação pelo teste de Pearson a 1% de significância entre VPC e VCG foi de 0,48, relatando que essas variáveis apresentam dependência entre si e como a correlação foi positiva, quanto maior a VPC, maior a VPG (Anexo XV).

A correlação entre viabilidade polínica pelos diferentes testes e produtividade de frutos não foi significativa (Anexos XVI e XVII). Ou seja, a viabilidade do pólen das plantas da população F_2 não tem relação com a produtividade das plantas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Meiose

O estudo do comportamento meiótico já foi realizado em várias espécies, sobretudo em espécies e plantas híbridas de café (MENDES, 1950; MEDINA, 1952; MEDINA & RIJO, 1969; MEDINA, 1963; MÔNACO & MEDINA, 1965; REDDY & NARAYAN, 1981; OWUOR, 1985; BOAVENTURA & CRUZ, 1987; BOAVENTURA, 1990). No entanto, apesar desses vários trabalhos, dados sobre comportamento meiótico em híbridos arabusta F_2 de café jamais haviam sido relatados, sendo, portanto inéditos os que aqui estão sendo apresentados e discutidos.

Neste caso particular da população de genótipos de híbridos arabusta F_2 de café, preservados para uma possível utilização em programas de cruzamento, devido a sua diversidade genética, as informações sobre o comportamento meiótico são parte importante na escolha e orientação de estratégias para o melhor uso dessas plantas.

Esta primeira descrição dos perfis meióticos, de uma amostra de 30 plantas, dessa população com 167 híbridos arabusta F_2 de café, longe de ser definitiva, pretendeu dar início a uma série de análises citogenéticas que serão realizadas em amostras mais amplas.

As análises do comportamento meiótico das espécies parentais e também do híbrido F_1 foram usadas como parâmetros comparativos na avaliação do grau de normalidade e/ou anormalidade dos híbridos F_2, ou seja, a descrição dos perfis das plantas F_2 foi baseada na comparação dos resultados das análises meióticas dos parentais e do híbrido F_1, pois o esperado é um aumento no índice de anormalidades dos parentais para as progênies híbridas, sempre em todos os casos, com variações.

MEDINA (1950) registrou pareamento com 22 bivalentes na metáfase I da microsporogênese das variedades *semperflorens* e Caturra de *C. arabica.* Os resultados das análises meióticas do parental *C. arabica* aqui realizados também mostraram o menor índice de anormalidades, pois apenas 31,10% das células analisadas apresentaram anormalidades e uma meiose relativamente regular, em termos de pareamento, já que o número de bivalentes por célula foi igual a 21,77±0,57 para um máximo esperado de 22 bivalentes (Tabela 3).

As análises da planta parental *C. canephora* apresentaram um índice de anormalidade um pouco maior (38,33%), mas ainda dentro de um parâmetro relativamente estável (Tabela 4).

Já nas análises da meiose do híbrido F_1 foi registrado um alto índice de anormalidade (81,39%), demonstrando ser esta uma planta pouco estável meioticamente (Tabela 4).

Para as plantas da população F_2, anormalidades no comportamento meiótico são esperadas, pois além de tratar-se de plantas híbridas, são também plantas poliplóides. Assim, no caso das plantas dos híbridos F_2 analisadas verificaram-se de fato altos índices de irregularidades na meiose e índices variados dos diferentes tipos de anomalias para cada uma das plantas (Tabelas 7 e 9).

A menor porcentagem de células em divisão com anormalidades no processo meiótico foi registrada na planta 94 (51,1%), ou seja, essa planta apresentou a meiose com menor índice de anomalias em relação às outras plantas da amostragem da população. Por outro lado, a maior porcentagem de células em divisão anormais foi encontrada na planta 143 (93,3%), ou seja, essa planta apresentou o maior índice de anomalias meióticas em relação às demais plantas.

Analisando-se os resultados para as plantas híbridas da F_2, notou-se que a porcentagem de retardatários, em diferentes fases da meiose, provavelmente tenha contribuído consideravelmente na porcentagem total de anormalidade nessas plantas. Pois como foi observado nas análises das plantas da população F_2, em geral, as plantas

que possuíam um elevado número de células com cromossomos retardatários em diferentes fases da meiose, apresentaram conseqüentemente uma maior porcentagem de células com meiose anormal.

A planta 94 apresentou uma baixa porcentagem de retardatários na meiose I, resultando em uma meiose II com menor freqüência de retardatários, e uma baixa porcentagem de células anormais. Considerando o mesmo raciocínio, a planta 143 apresentou uma alta porcentagem de retardatários na meiose I, o que pode ter levado a uma meiose II com maior freqüência de retardatários e a uma porcentagem de células em divisão com anormalidades mais elevada.

Comparando os valores obtidos para as plantas amostradas da população F_2 com as plantas parentais e o híbrido F_1, nota-se que a planta 94, apesar de ter apresentado a menor porcentagem de células anormais da população (51,1%), mostrou uma freqüência maior de anomalias do que as plantas parentais *C. arabica* e *C. canephora*, que registraram porcentagens respectivamente iguais a 31,10% e 38,33% de células em divisão anormais. Isso indica que a planta 94 pode ser considerada menos estável, em relação ao comportamento meiótico, do que as espécies parentais. Já a planta 143 apresentou uma porcentagem de anormalidade (93,3%) maior do que o híbrido F_1 arabusta (81,39%), o que indica que essa planta apresenta, comparativamente, uma meiose mais irregular que o híbrido F_1.

As avaliações do número cromossômico das plantas da população F_2 de híbridos arabusta de café demonstraram uma variação do número de cromossomos de 2n=40 a 2n=48, tanto entre as plantas quanto dentro das plantas (Tabela 6), apesar de o número diplóide esperado ser de 44 cromossomos. No híbrido F_1 também foi observado um número variável de cromossomos nas células em divisão meiótica analisadas (2n=40 a 2n=46) (Tabela 1).

BOAVENTURA & CRUZ (1987), estudando o mesmo híbrido arabusta F_1, constataram também um número inconstante de cromossomos nas células em divisão meiótica, número este variável de 2n=42 a 2n=46.

A presença de bivalentes pode ser considerada como um índice de estabilidade meiótica, pois indica a ocorrência de pareamento regular, afinidade genômica e, conseqüentemente, estabilidade genética. Dessa forma, optou-se em estabelecer a média do número de bivalentes por célula por planta, a qual foi bastante variável entre as plantas F_2.

A planta 23 apresentou a média mais elevada de bivalentes por célula (19,50±1,25) indicando a ocorrência de pareamento cromossômico mais estável dentre as plantas da população. Em contrapartida, a média de bivalentes mais baixa foi registrada na planta 124 (15,10±3,23), o que indica que essa planta provavelmente tenha um comportamento menos estável em relação ao pareamento cromossômico em metáfase I.

Comparando-se as médias de bivalentes por célula da planta 23 com as médias de bivalentes por célula, contabilizadas para *C. arabica* (21,77±0,57), para *C. canephora* (20,03±0, 1,69) e para o híbrido F_1 (18,97±2,31), pode-se considerar que a planta 23 apresentou um número de bivalentes, comparativamente maior do que o híbrido F_1 e semelhante ao parental *C. canephora.* Já a planta 124 apresentou um número de bivalentes menor que o registrado para o híbrido F_1. Considerando-se a população F_2 analisada, observou-se que apenas 13,79% das plantas tiveram média de bivalentes maior ou igual ao híbrido arabusta F_1.

Diversos tipos de anomalias foram registrados nas plantas híbridas F_2, dentre elas a presença de monovalentes (Figura 3B e 3C), que foi freqüentemente encontrada em todas as plantas da amostra da população dos híbridos arabusta F_2. As causas da presença de monovalentes podem ser diversas, tais como a baixa freqüência de quiasmas, terminação precoce dos quiasmas ou a presença de genes assinápticos ou dessinápticos em prófase I (GOTTSCHALK & KAUL, 1980a).

Em estudo com híbridos interespecíficos entre *C. canephora* e *C. eugenioides*, LOUARN (1976) relatou que os monovalentes observados em metáfase I seriam resultantes de uma falta de pareamento (assinapse) ou de ausência de quiasmas (de sinapse). Já em um estudo com o híbrido entre *C. arabica* e *C. canephora*, GRASSIAS (1977) atribuiu a alta freqüência de monovalentes à ocorrência de separações precoces de bivalentes e tetravalentes.

Na análise dos híbridos arabusta F_2 verificou-se que a planta 63 apresentou a menor média de monovalentes por célula (2,80±1,77), isso indica que essa planta apresentou a menor quantidade de monovalentes por célula em relação às outras plantas da população. A maior média de monovalentes por célula foi registrada na planta 98 (7,07±2,36), indicando que essa planta apresentou a maior quantidade de monovalentes por célula, comparando-se ao o restante da população. Dessa forma notou-se que as plantas 07, 16, 17, 38, 40, 45, 54, 56, 73, 89, 94, 98, 99 e 143 apresentavam monovalentes em número variado, em 100% de suas células. Por outro lado, a planta 86

apresentou a menor porcentagem de células com monovalentes (75%), o que indica que essa planta possui o menor índice de células com monovalentes da população amostrada.

A presença de monovalente em metáfase I foi registrada também para os parentais e o híbrido arabusta F_1. O parental *C. arabica* mostrou uma média de 0,13±0,51 monovalentes por célula e uma porcentagem de 6,67% de células em metáfase I com monovalentes. Para *C. canephora* foi registrada uma média de 0,80±1,13 monovalentes por célula e uma porcentagem de 36,67% de células com monovalentes. Já para o híbrido F_1 a média de monovalentes por célula foi igual a 0,80±2,77 e a porcentagem de células com monovalente igual a 86,67%. Pode-se observar que os valores referentes à presença de monovalentes nas plantas híbridas F_2 são comparativamente maiores que os valores encontrados, tanto em média de monovalentes por célula quanto em porcentagem de células com monovalentes, para as plantas parentais e para o híbrido F_1, porém, somente 27,59% da população F_2 amostrada teve valor médio de monovalente igual ou superior à F_1. A provável causa da presença de monovalentes na amostra da população estudada pode ser a baixa freqüência de quiasmas, associada provavelmente a distúrbios no pareamento, uma vez que os bivalentes na forma de bastão, observados em quantidade, apresentam apenas um quiasma. Outra causa poderia ser atribuída a terminalização precoce de quiasmas.

Outra anomalia encontrada em metáfase I foi a presença de multivalentes (trivalentes, tetravalentes e polivalentes). Em relação aos de trivalentes (Figura 3D), a presença destes não foi encontrada nas plantas 94 e 99. Já a planta 60 apresentou a maior média de trivalentes por célula (0,63±0,76) e também a maior porcentagem de células com trivalentes (46,67%), esses resultados demonstraram que a presença de trivalentes foi mais freqüente na planta 60. Assim como as plantas 94 e 99, as plantas parentais e o híbrido F_1 não apresentaram trivalentes em metáfase I, o que indica que a presença de trivalente é uma anomalia peculiar da população F_2 quando comparada com plantas das quais se originaram. Quando se compara a população F_2 analisada com os parentais e como o híbrido arabusta F_1, observa-se que a ocorrência de trivalentes é restrita apenas a F_2.

A presença de tetravalentes (Figura 3A) foi observada com relativa freqüência. Entre as plantas da população F_2, a planta 23 se destacou com a menor média de tetravalentes por célula (0,10±0,40), assim como, com a menor porcentagem de células com tetravalentes (6,67%). Isso indica que a planta 23 teve a menor freqüência de

tetravalentes da população F_2. Por outro lado, as plantas 44 e 60 tiveram a maior média de tetravalentes por célula (1,17±0,79) indicando que essas plantas tiveram a maior quantidade de tetravalentes por célula. A planta 16 apresentou a maior porcentagem de células com tetravalentes (83,33%) (Tabela 9), ou seja, a maior freqüência de tetravalentes em relação à população F_2.

A análise comparativa inicial da população F_2 com o híbrido arabusta F_1 revelou que 96,55% das plantas F_2 apresentaram valores médios de tetravalentes superiores ou iguais ao do híbrido arabusta F_1.

Ao se comparar a presença de tetravalentes com os parentais, nota-se que a planta 23, apesar de ter apresentado a menor freqüência de tetravalentes, ainda apresentou uma média maior que *C. arabi*ca (0,07±0,25) e *C. canephora* (0,07±0,79). Porém em relação à porcentagem de células com tetravalentes, a planta 23 apresentou uma porcentagem igual a *C. arabica* (6,67%), mas bem menor que *C. canephora* (53,33%). Em contrapartida, as plantas 44 e 60 apresentaram uma média maior que o híbrido F_1 (0,70±0,41), assim como a planta 16 que demonstrou também uma freqüência de tetravalentes maior do que a híbrido F_1 (20%).

STEBBINS (1972) relatou que a presença de tetravalentes especificamente, pode ser explicada por uma heterozigosidade decorrente de translocações cromossômicas. No caso dos indivíduos desta população, como a presença de tetravalentes foi observada com certa freqüência deduz-se que provavelmente a ocorrência de tetravalentes se deve ao pareamento de cromossomos homeólogos, uma vez que as espécies parentais apresentam complementos cromossômicos com grande semelhança.

Ainda em metáfase I, polivalentes (Figura 3B e 3D) também foram encontrados em 72,41% dos híbridos F_2 analisados. A maior média de polivalentes por célula (0,97±1,31) foi registrada na planta 152, o que indica a maior quantidade de polivalentes por células. No entanto, a planta 56 apresentou 43,33% de células com polivalentes, indicando que essa planta apresentou a maior freqüência de polivalentes dentre a população F_2. Nas plantas parentais não foram notados polivalentes presentes na metáfase I, tampouco para as plantas 16, 23, 29, 39, 40, 45, 89 e 143 da população F_2. Contrariamente, o híbrido F_1 apresentou uma média igual 0,03±0,18 de polivalentes por célula, o que levou a uma porcentagem de 3,33% das células com polivalentes. Assim pode-se dizer que as plantas 56 e 152 apresentaram, respectivamente, uma porcentagem e uma média, consideravelmente maiores que as do híbrido F_1.

ADAMOWSKI (2008) descreveu que a alta freqüência de multivalentes indica homologia entre os genomas, mostrando que as espécies são relacionadas e sugerindo que a introgressão de genes específicos de uma espécie para outra pode ser esperada por meio de recombinação genética. No caso destas plantas híbridas, as taxas de multivalentes encontradas foram condizentes com os percentuais de bivalentes registrados, pois a maior parte dos cromossomos pareou na forma de bivalentes. Porém, a presença de multivalentes na F_2 híbrida de café foi inferior ao esperado, uma vez que as espécies parentais do híbrido arabusta analisado nesse trabalho são de certa forma, similares (HERRERA et al., 2007), o que poderia levar à formação de multivalentes em metáfase I. A ausência deste tipo de formação pode ser devida possivelmente a algum mecanismo de controle genético que impede o pareamento entre cromossomos homeólogos em café (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998) assim como ocorre provavelmente em alguns poliplóides como o trigo, o que é fundamental para a estabilidade reprodutiva.

OWOUR (1985) estudando a meiose de um híbrido arabusta F_1 encontrou uma freqüência de associação cromossômica de $6,1\pm0,8_{I}$; $17,4\pm0,4_{II}$; $0,8\pm0,1_{III}$ e $0,2\pm0,2_{IV}$. Pode-se notar que estes valores de médias de monovalentes, bivalentes, trivalentes e tetravalentes foram inferiores aos registrados no híbrido F_1 e estão contidos no intervalo entre os valores máximos e mínimos da população F_2 estudada nesse trabalho.

No trabalho realizado com o híbrido arabusta F_1, BOAVENTURA & CRUZ (1987) obtiveram médias iguais a $6,98_{I}$; $15,29_{II}$; $1,09_{III}$ e $0,85_{IV}$. Essas médias diferiram das apresentadas no presente trabalho para o híbrido F_1, o que pode ser atribuído, provavelmente, a algum erro em algum passo durante o processo de pareamento, devido a fatores ambientais e/ou genéticos os quais podem ter acarretado as diferentes freqüências de anomalias na metáfase I.

A segregação precoce de cromossomos para os pólos das células (Figura 3B) foi também registrada nas plantas F_2 de híbridos arabusta de café, tanto em metáfase I como em metáfase II. Em metáfase I, a planta 143 mostrou a menor porcentagem de células com essa anomalia (23,33%) indicando que essa planta apresentou a menor freqüência de segregação precoce dos cromossomos para os pólos na população F_2 em metáfase I. Quando há uma comparação desta amostra F_2 com as plantas parentais, nota-se que a planta 143 apresentou uma porcentagem igual a *C. arabica* (23,33%) e maior que *C. canephora* (6,67%), o que indica que em relação a essa anomalia, a planta 143 é mais semelhante ao parental *C. arabica*. Por outro lado, as plantas 89 e 98

apresentaram segregação precoce em 70% de suas células, o que demonstra que essas plantas apresentaram a maior freqüência dessa anomalia em relação ao restante das plantas amostradas da população. Comparativamente, as plantas 89 e 98 apresentaram porcentagens bem maiores que o híbrido F_1, que registrou 23,33% de segregação precoce dos cromossomos na metáfase I.

A segregação precoce dos cromossomos também foi observada em metáfase II (Figura 3F), no entanto, as plantas 74 e 73 apresentaram a menor (33,33%) e maior (83,33%) porcentagem, respectivamente. O que indica que a planta 74 teve a menor freqüência de segregação precoce em metáfase II da população e que na planta 73 registrou-se maior freqüência da população. Comparando-se com os parentais, verifica-se que a planta 74 apresentou uma porcentagem menor de segregação precoce tanto em relação a *C. arabica* (50%) quanto a *C. canephora* (40%). A planta 73 também apresentou uma porcentagem um pouco mais baixa, mas semelhante à registrada para o híbrido arabusta F_1 (80%), indicando que essa planta é semelhante ao híbrido F_1 em relação à segregação precoce dos cromossomos para os pólos em metáfase II.

PAGLIARINI (2000), em estudos com diferentes espécies de importância econômica, explicou a ocorrência da segregação precoce dos cromossomos para os pólos, salientando que os monovalentes presentes na metáfase I não permanecem alinhados na placa equatorial e tendem a migrar precocemente para os pólos.

Observou-se que as anomalias encontradas em metáfase I das plantas F_2 ocasionaram outras irregularidades durante o processo meiótico. Nas duas divisões meióticas, mais precisamente em anáfase I e II e telófase I e II foi freqüente a presença de cromossomos retardatários (Figura 4), o que pode indicar a ocorrência de segregação irregular dos cromossomos, apesar de não ter sido contabilizado o número de cromossomos nos pólos das células.

Na anáfase I, a planta 74 teve a menor porcentagem de células com retardatários (26,67%), indicando que essa planta teve a menor freqüência observada na população F_2. Já nas plantas 73 e 99 foi registrada a maior porcentagem (86,67%), o que indica que essas duas plantas tiveram as maiores freqüências registradas para os híbridos F_2 estudados. Comparativamente, pode-se dizer que a planta 74 apresentou uma porcentagem menor que *C. arabica* (33,33%), porém igual a *C. canephora* (26,67%) e que as plantas 73 e 99, tiveram as maiores porcentagens (86,67%), porém um pouco mais elevadas que as do híbrido F_1 (80%), o que mostra que essas plantas apresentaram mais retardatários em anáfase I que o híbrido arabusta F_1.

KRUG & MENDES (1940) anotaram 54% das células com retardatários ao estudar o híbrido interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*. Estes autores demonstraram que os univalentes, sem se dividir, passaram para os pólos logo no início da anáfase, distribuindo-se, aparentemente, ao acaso e tendo seu movimento retardado.

BOAVENTURA & CRUZ (1987) em observações na anáfase I do híbrido arabusta F_1, anotaram 28,2% das células com cromossomos retardatários, mostrando uma grande diferença em relação ao híbrido F_1 analisado neste trabalho. Essas diferenças podem ter sido causadas por três fatores, pela amostragem realizada, pela diferença das plantas utilizadas ou por implicações de ordem genética geradas por fatores ambientais.

As porcentagens de células com retardatários encontradas pelos autores (KRUG & MENDES, 1940; BOAVENTURA & CRUZ, 1987) estão contidas no intervalo de valores apresentado pela população de híbridos F_2.

Na telófase I, a planta 94 teve a menor porcentagem de células com retardatários de retardatários (36,67%) e a planta 73 a maior porcentagem (90%). Isso indica que a planta 94 teve a maior freqüência de retardatários em telófase I entre as plantas da população F_2 e a planta 73 a maior freqüência em relação a essa população. A planta 94 pode ainda ser comparada com as plantas parentais, uma vez que a planta 94 apresentou uma porcentagem maior que *C. arabica* (26,67%), igual a *C. canephora* (36,67%) e inferior o híbrido F_1 (70,00%), demonstrando que em relação a presença de retardatários em telófase I, a planta 94 é semelhante a *C. canephora* e que essa planta é mais regular em relação a essa anormalidade do que o híbrido arabusta F_1. Já que a planta 73, quando comparada com os parentais e com o híbrido arabusta F_1, mostra-se bem mais irregular do que estes.

Já na anáfase II as plantas 07 e 63, apresentaram as menores porcentagens (56,67%), enquanto que a planta 73 teve novamente 90% das células analisadas com retardatários presentes. Isso indica que as plantas, 07 e 63, tiveram as menores freqüências de retardatários na anáfase II e a planta 73 teve a maior freqüência. Comparando-se as plantas 07 e 63 com os parentais e com o F_1 arabusta, nota-se que as plantas apresentaram valores de freqüência maiores do que dos dois parentais, os quais tiveram valores iguais a 36,67%, porém menores de que o F_1 arabusta (80%). Isso faz com que as plantas 07 e 63 sejam mais irregulares em relação a essa anomalia que *C. arabica* e *C. canephora* e menos irregulares em relação ao F_1 arabusta. A planta 73 que

apresentou a maior porcentagem de retardatários em anáfase II, quando comparada ao híbrido F_1, (80%), sendo, portanto mais irregular que este.

Em telófase II, a planta 07 teve a menor porcentagem (23,33%), evidenciando que essa planta apresentou a menor freqüência de retardatários entre as plantas da população F_2. Ao comparar essa planta com os parentais, observa-se que a porcentagem encontrada ficou entre as registradas para *C. arabica* (13,33%) e para *C. canephora* (36,67%). A planta 82 por outro lado, apresentou a maior porcentagem (86,67%), demonstrando que essa planta teve a maior freqüência de retardatários entre as plantas da população F_2. Comparando a planta 82 com o híbrido F_1, observa-se que a planta 82 teve uma porcentagem menor que o híbrido F_1 (91,67%), indicando que o híbrido F_1 é mais irregular em comparação a população F_2 em relação à presença de retardatários em telófase II.

A presença de cromossomos retardatários tem sido descrita também em outras espécies como *Glycine max* (BIONE et al., 2000); *Brachiaria brizantha* (MENDES-BONATO et al., 2002); *Carica* papaya (BAJPAI & SINGH, 2006); *Boehmeria nivea* (PIEROZZI, 2008) e em outros híbridos (BARBOSA et al., 2006) e (ADAMOWSKI et al., 2008).

A formação de cromossomos retardatários pode ocorrer a partir dos cromossomos monovalentes que não permaneceram alinhados na placa equatorial e migraram de forma precoce para os pólos, e em alguns casos, podem formar retardatários nas outras fases da meiose e não serem incluídos nos núcleos em formação. Aqueles monovalentes que apresentarem segregação tardia formarão micronúcleos, e se as anormalidades persistirem na meiose II há a formação de micrósporos anormais (SYBENGA, 1992; PAGLIARINI, 2000).

Outra maneira de haver formação de retardatários é quando multivalentes em metáfase I promovem, durante a anáfase I, uma disjunção desigual no número de cromossomos para os dois pólos, devido à dificuldade de separação dos cromossomos. Isso conseqüentemente vai ocasionar cromossomos retardatários que poderão ficar retidos no citoplasma sem serem incluídos em nenhum dos núcleos filhos ou serem incluídos em qualquer desses núcleos aleatoriamente (BOAVENTURA & CRUZ, 1987).

A presença de cromossomos em ascensão precoce na metáfase I ou de cromossomos retardatários na anáfase I pode levar a formação de micronúcleos na telófase (PAGLIARINI, 2000). Entretanto na população F_2 não foram observados

micronúcleos formados e sim cromossomos retardatários que estavam retidos no citoplasma.

Uma particularidade encontrada entre as plantas da população F_2 foi a segregação de bivalentes para os pólos (Figura 5B e 5C) nas plantas 01, 23, 54, 74, 89 e 102.

KRUG & MENDES (1940) também registraram esse tipo de anomalia para o híbrido arabusta F_1, e explicaram que alguns bivalentes se atrasam de tal forma que não chegam a se incluir nos núcleos filhos resultantes dessa primeira divisão, e algumas vezes, ambos os constituintes de um mesmo grupo bivalente passam para um mesmo pólo, formando, mais tarde, micronúcleos na telófase.

Outra particularidade encontrada na anáfase I da meiose das plantas da população F_2 foi a ocorrência de pontes cromatídicas (Figura 5E) nas plantas 29, 45 e 94. Esse tipo de anomalia não foi registrada para as plantas parentais ou para o híbrido F_1. No entanto BOAVENTURA & CRUZ (1987) registraram essa anomalia na meiose do híbrido F_1 por elas analisado.

A hipótese para explicar a ocorrência de pontes é baseada na segregação irregular dos monovalentes. Os cromossomos monovalentes segregantes durante a divisão podem sofrer interações entre os seus cinetócoros e formar pontes (VEGA & FELDMAN, 1998).

Outra anormalidade registrada na divisão II da meiose foi a ocorrência rara de cromossomos aderentes ("stickness") (Figura 4D) nas plantas 1 e 63. Esses tipos de cromossomos aderentes são caracterizados pela intensa aglomeração de cromossomos durante a anáfase. Esse fenômeno pode envolver poucos cromossomos ou todos os cromossomos do complemento, em casos severos, a impossibilidade da separação dos cromossomos acarreta a formação de núcleos picnóticos (fortemente coloridos) (MENDES-BONATO et al., 2001).

Essa anomalia pode ser causada por fatores genéticos ou ambientais (CONSOLARO & PAGLIARINI, 1996; SHEIDAI et al*.,* 2003). Embora vários estudos meióticos tenham se reportado à presença de cromossomos aderentes, a base bioquímica e a causa principal desse problema são ainda desconhecidas. GAUDEN (1987) levantou uma hipótese que essa anomalia pode ser causada pela função defeituosa de um ou dois tipos de proteínas não histônicas envolvidas na organização dos cromossomos.

As irregularidades até agora discutidas para as plantas de café aqui estudadas também foram encontradas em estudos feitos com outros híbridos de café, tais como

nos híbridos entre *C. racemosa* e *C. arabica* (MEDINA, 1963) e *C. arabica* e *C. kapakata* (MONACO & MEDINA, 1965); *C. arabica* e *C. canephora* (KRUG & MENDES, 1940); *C. dewevrei* e *C. eugenioides,* e *C. liberica* e *C.eugenioides* (REDDY & NARAYAN, 1981); *C. arabica* e *C.canephora* (4x) (OWUOR, 1985; BOAVENTURA & CRUZ, 1987).

Todas essas anomalias levando à segregação irregular dos cromossomos e a um alto índice de irregularidades no fim da meiose podem afetar os produtos finais da meiose. Podem se formar nesse caso, núcleos com número de cromossomos tal, que se forem viáveis promoverão a formação de gametas aneuplóides. A presença de irregularidades foi freqüentemente associada com a redução do vigor e fertilidade em plantas híbridas (REIS et al., 2008).

Em decorrência das várias irregularidades observadas na meiose do material, as tétrades também se mostraram bastante anormais. Díades foram encontradas na população F_2 nas plantas 44, 63 e 124 (Figura 6D). Tríades também foram vistas em muitas plantas, e apesar da baixa porcentagem, a planta 44 apresentou a maior porcentagem (30%) (Figura 6B). Relativamente, políades foram encontradas em um menor número de plantas (Figura 6E) e a porcentagem mais elevada foi na planta 07 (3,33%). As plantas parentais apresentaram baixas porcentagens de anormalidades nas tétrades, sendo inferiores às plantas da população F_2, o que indica que as plantas F_2 são mais anormais em relação aos produtos meióticos que os parentais.

A presença de micrócitos (Figura 6F) foi a anomalia das tétrades mais freqüente, sendo encontrada em todas as plantas. A porcentagem de tétrades com micrócitos variou de 26,67% na planta 99 a 90% na planta 73. A planta 99, apesar de ter a maior porcentagem de micrócitos, teve ainda um valor mais elevado que *C. arabica* (1,67%) e *C. canephora* (7,50%). Já a planta 73 apresentou uma porcentagem de micrócitos superior ao híbrido F_1, que teve uma porcentagem de 73,33%.

Em relação ao índice meiótico registrado para as plantas da população F_2 de café, a planta 99 apresentou o maior índice meiótico (70,00 %), indicando que esta planta apresentou a maior taxa de tétrades normais e a planta 73 o menor índice meiótico (5,00%), o que indica que esta planta apresentou a menor taxa de tétrades normais entre as plantas da população F_2 (Tabela 6). Como foi registrado também para a planta 99 a maior porcentagem de micrócitos e para a planta 73 a menor porcentagem de micrócitos, pode-se dizer que os valores dos índices meióticos são devidos à porcentagem de micrócitos encontrados nas análises dos produtos da microsporogênese.

Na meiose das angiospermas, o citoplasma se divide no fim da segunda divisão e ao mesmo tempo em dicotiledôneas, formando-se tétrades (PEIRSON et al., 1996). No entanto, no híbrido arabusta, as tétrades são quase sempre anormais, contendo mais de quatro micrósporos.

Quando há falha na citocinese em somente uma das divisões da meiose, é então formada uma díade. Já quando a falha ocorre nas duas divisões pode haver a formação de díades e tríades. As tríades são formadas quando a citocinese ocorre em somente uma das células da díade (RISSO-PASCOTTO et al., 2003).

Micrócitos são formados como conseqüência do comportamento irregular de alguns dos cromossomos, porém a viabilidade desses micrócitos, entretanto, é duvidosa (KRUG & MENDES, 1940). Em certas células os micrócitos também podem ser formados por micronúcleos que se aproximam da parede da célula e durante a citocinese se mantêm isolados das demais células (RISSO-PASCOTTO et al., 2003).

5.2 Viabilidade polínica

A viabilidade polínica é considerada uma medida da fertilidade da parte masculina das plantas sendo determinada pela utilização de várias técnicas. Na citogenética essa medida é bastante empregada no monitoramento de pólen, quanto a sua fertilidade, para assim tornar possível e mais seguro o cruzamento entre genótipos de importância econômica (SOUZA et al., 2002). Quando é testada a capacidade do pólen germinar é possível acompanhar de forma realista o estado dos gametas masculinos quanto à quantidade de grãos de pólen potencialmente viáveis.

5.2.1 Plantas parentais

As plantas parentais também tiveram a viabilidade do pólen avaliada para, também neste aspecto, poderem servir de parâmetro comparativo para as análises das plantas da população F_2.

O parental *C. arabica* pelo teste de viabilidade por coloração, apresentou uma porcentagem de polens viáveis de 84,21%. Esse valor foi um pouco inferior ao registrado por OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981), que apresentaram 97,4% de polens viáveis pelo teste de coloração com carmim acético.

A porcentagem para *C. arabica* por meio do teste de viabilidade polínica por germinação foi igual a 38,6%, indicando a porcentagem dos grãos de pólen avaliados que emitiram tudo polínico. A possível causa dos valores de VPC e VPG foi a baixa

porcentagem de anomalias meióticas registrada para *C. arabica*, que apresentou 31,10% das células em divisão com algum tipo de irregularidade meiótica. Mas apesar disto a taxa de germinação para o pólen de *C. arabica* apresentou o valor mais alto encontrado dentre todas as plantas avaliadas no presente trabalho.

Esse resultado foi muito diferente do alcançado por KRUG & MENDES (1940) que conseguiram fazer com que 90% dos grãos de pólen do tetraplóide *C. arabica* germinassem. Assim como no trabalho de OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) que obtiveram uma porcentagem de polens viáveis igual a 72,0%, por meio do teste de germinação com uma solução de sacarose 10%. A diferença dos resultados pode ser devido à diferença dos meios de germinação utilizados.

A viabilidade em *C. canephora* Co254 também foi avaliada por meio dos testes de coloração e germinação. Pelo teste de coloração registrou-se uma porcentagem de 62,86% de polens viáveis, a qual também diferiu de resultados apresentados anteriormente em outros trabalhos.

Analisando-se esses trabalhos verifica-se também que foram encontrados valores contrastantes de viabilidade polínica por coloração. OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) analisando a viabilidade de pólen de *C. canephora* (4x), por coloração com carmim, registraram uma porcentagem de 94,4% de polens viáveis; já BOVENTURA (1990), utilizando o mesmo método observou apenas 21,0% de grãos viáveis.

A microsporogênese em *C. canephora* diplóide com 22 cromossomos foi estudada por MENDES (1950), que concluiu que a produção de polens era normal, uma vez que foi alta a porcentagem de células-mãe de pólen que se dividiram normalmente. Contudo, BURNHAN (1962) demonstrou que a fertilidade do pólen é muito reduzida em autotetraplóides, quando comparada à espécie diplóide original.

Assim, a viabilidade encontrada neste trabalho para *C. canephora* foi intermediária às viabilidades registradas por OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) e BOVENTURA (1990), porém, no nosso estudo, o mais esperado seriam porcentagens mais baixas de viabilidade, uma vez que a planta de *C. canephora* estudada tem o número de cromossomos duplicado.

Pelo teste de germinação *in vitro*, foi registrado para *C. canephora* duplicado uma porcentagem de 12,27%. Valor esse que também foi mais baixo do que o encontrado por outros autores.

CONAGIN & MENDES (1961) analisando a viabilidade polínica por meio de germinação *in vitro*, em três espécies de café (*C. canephora, C. congensis e C.*

dewevrei), observou que a melhor lâmina de *C. canephora* mostrou 55,2% de grãos germinados. Enquanto no trabalho de OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) observa-se uma viabilidade polínica através de teste de germinação igual a 64,0%.

Para *C. canephora*, assim como *C. arabica*, a causa provável da discrepância entre os valores de VPC e VPG foram as irregularidades meióticas, mais precisamente a porcentagem total de células em divisão anormais na meiose que foi igual a 38,33% em *C. canephora* e 31,10% em *C. arabica*.

Além dos testes de viabilidade, foi feita também a análise detalhada dos polens das plantas parentais. Essa análise evidenciou que os polens do parental receptor (*C. arabica*) são bastante uniformes em relação ao tamanho e aspecto. Porém, *C. canephora* demonstrou uma diferença de tamanho de pólen. Foram encontrados, polens grandes e pequenos. Essas diferenças em tamanho podem implicar em diferentes quantidades de material genético. Também BOAVENTURA (1990) mostrou grãos de pólen com tamanhos diferentes do normal para *C. canephora*, evidenciando também inviabilidade.

Normalmente, a variação do tamanho e a diminuição da fertilidade do pólen são decorrentes das anormalidades meióticas que promovem uma separação irregular e uma distribuição desigual de cromossomos para os diferentes pólos, sendo que a fertilidade se reduz à metade nos tetraplóides induzidos, se comparados aos diplóides (DAS et al., 1970).

5.2.2 Híbrido arabusta F_1

Quando foi avaliada a viabilidade polínica por coloração (VPC) do híbrido arabusta F_1, o resultado foi de 53,70%. Essa porcentagem é um pouco menor do que a relatada por OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981), para a viabilidade polínica por coloração do mesmo híbrido arabusta F_1, pois o mesmo encontrou 62,4% de polens viáveis. Porém o índice por nós obtido é superior ao de BOAVENTURA & CRUZ (1987) no estudo realizado também com o híbrido arabusta de café F_1, que foi de 30,7%.

Quanto ao teste de germinação *in vitro,* a VPG foi de 6,25%, indicando que 6,25% dos polens do híbrido arabusta F_1 germinaram (Tabela 5).

Esse resultado assemelha-se aos obtidos por OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) que analisaram o híbrido arabusta F_1 e apresentaram um porcentual de 7,9% para viabilidade polínica por germinação em meio de cultura com 10% de sacarose.

As diferenças encontradas neste trabalho e no trabalho de BOAVENTURA & CRUZ (1987) podem ser, provavelmente, devido aos diferentes métodos utilizados nos

testes, como por exemplo, tipo de corante empregado, ou às condições de acondicionamento do material, ou a diferenças climáticas no momento da coleta, bem como, ao estádio da flor utilizado para o teste.

Além disso, testes de coloração não são totalmente confiáveis, podendo superestimar os valores de viabilidade (TECHIO, 2002). Embora a germinação *in vitro,* forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo,* podendo ocorrer interações entre a composição do meio de cultura e os diferentes materiais vegetais. Entretanto, é possível concordar com MENDES (1994), no que se refere à técnica de germinação *in vitro*, como aquela que apresenta resultados mais próximos aos que, provavelmente, ocorrem *in vivo.*

A presença de irregularidades foi freqüentemente associada com a redução da fertilidade em plantas híbridas Assim como apresentado para os parentais, o híbrido F_1 apresentou uma alta porcentagem total de células em divisão anormais (81,39%), o que provavelmente acarretou nas porcentagens de VPC e VPG, ou seja, a alta porcentagem de células anormais foi a possível causa da baixa viabilidade polínica.

A análise mais detalhada dos polens do híbrido arabusta F_1 mostrou uma grande diferença em relação ao tamanho de pólen, neste ponto em concordância também com o trabalho de BOAVENTURA & CRUZ (1987). Essa diferença de tamanho resulta muito provavelmente da alta porcentagem de irregularidades encontradas na análise da meiose

Diferenças de tamanho dos grãos de pólen e a inviabilidade polínica podem ocorrer devido a falhas no comportamento meiótico resultando em gametas com cromossomos desbalanceados durante a microgametogênese (EADY, et.al, 1995).

5.2.3 População F_2

Na análise da viabilidade do pólen nas plantas da população de híbridos arabusta F_2, é possível fazer uma comparação com as plantas parentais e também com o híbrido F_1, uma vez que para a planta parental *C. arabica* foram obtidos os valores mais altos de viabilidade; para *C. canephora* valores intermediários e para o híbrido arabusta F_1 os valores mais baixos de viabilidade.

No teste da viabilidade polínica por coloração (VPC), a menor porcentagem de polens viáveis foi registrada na planta 74 (26,24%), essa porcentagem foi inferior a encontrada para o híbrido F_1 (53,70%). O teste de coloração indicou então que a planta 74 possui polens menos viáveis que o híbrido arabusta F_1. Por outro lado, a planta 45 obteve a maior viabilidade polínica por coloração (79,16%) entre as plantas da

população F_2, indicando a maior porcentagem de polens viáveis dentro da população. Como no parental *C. arabica* foi registrada uma porcentagem igual a 84,21% e o parental *C. canephora* teve uma porcentagem de 62,86% de polens viáveis, a viabilidade da planta 45 ficou entre as dos dois parentais, característica híbrida. Isso demonstra que os polens da planta 45 não são tão viáveis quanto *C. arabica*, mas são mais viáveis que o parental *C. canephora* tetraplóide.

De acordo com teste (VPG), foi registrada para a planta 98 a mais baixa viabilidade (3,40%), indicando que os polens dessa planta demonstraram o menor poder de germinação entre as plantas analisadas, enquanto que para a planta 29 foi obtido o valor mais alto (38,38%), o que indica que os polens da planta 29 obtiveram o maior poder de germinação entre as plantas da população F_2.

Ao comparar o resultado da planta 29 com as plantas *C. arabica* e *C. canephora*, que registraram uma porcentagem de viabilidade de 38,6% e 12,27% respectivamente, percebe-se que o valor encontrado para planta 29 é menor, mas bem próximo ao encontrado para *C. arabica* e mais elevado que para *C. canephora*, o que indica que os polens da planta 29 têm um poder de germinação semelhante aos polens de *C. arabica*, porém maior do que os polens de *C. canephora* e maior também do que o híbrido arabusta F_1 (6,25%).

Já o resultado de (VPG) para a planta 98, que apresentou a menor viabilidade por germinação (3,4%), pôde ser comparado com o resultado da viabilidade registrada pelo híbrido F_1 (6,25%). A planta 98, portanto apresentou uma porcentagem muito baixa e por isso, pode-se dizer que os polens dessa planta possuem um poder de germinação inferior ao híbrido F_1.

De acordo com SCORZA & SHERMAN (1995) plantas com razoável fertilidade devem apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubo bem desenvolvido, caso contrário, as plantas não apresentam capacidade de germinação de qualidade para que possam ser utilizadas em programas de melhoramento ou conservação em bancos de germoplasma.

Porém este fator pode estar relacionado à solução nutritiva utilizada e também ao amadurecimento irregular dos grãos de pólen, ou ainda ao manuseio não adequado dos grãos, ou a outro tipo de exigência dos grãos de pólen.

O meio de germinação usado nas análises é diferente dos meios anteriormente utilizados para as espécies de café, porém, foi escolhido por ter apresentado a melhor taxa de germinação em relação aos outros cinco meios utilizados com composições e

concentrações diferentes. O meio 6 (BETTIOL-NETO et al, 2009) tem uma adição de ácido bórico, além de outros micronutrientes, e a adição de boro ao meio de cultura mostra respostas variáveis conforme a espécie. O seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (ASKIN et al., 1990). Assim pode-se supor que provavelmente os grãos de pólen de cada planta da população F_2, por se tratar de genótipos diferentes, podem ter reagido de uma maneira diferente ao meio de crescimento.

A baixa porcentagem de germinação do pólen em híbridos é esperada, porém deve-se ter em mente que o pólen é uma estrutura bastante lábil e susceptível. A falta de umidade nos botões pode impedir, por exemplo, que os polens se soltem com facilidade das anteras. O tempo necessário que os polens precisam ser mantidos em laboratório até que as análises sejam realizadas, pode também influenciar negativamente, baixando a taxa de germinação. De acordo com SOUZA et al. (2002) à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização, após a abertura do botão floral.

É certo que a maior parte dos problemas de fertilidade é devido aos distúrbios do pareamento e às anormalidades meióticas (DAS et al, 1970). As irregularidades ocorridas durante o processo de divisão meiótica, relatadas nesse trabalho, geraram gametas desbalanceados, comprometendo, conseqüentemente, a viabilidade do pólen.

A análise detalhada dos polens mostrou características diferentes quanto à viabilidade para cada uma das plantas da amostra da população F_2. Esse fato tem implicações com os diferentes tipos e taxas de anormalidades observadas no comportamento meiótico dessas plantas dos híbridos F_2.

Assim podemos afirmar que nestes híbridos F_2 os distúrbios da meiose acarretaram problemas de fertilidade polínica.

5.3 Correlação

A existência de uma correlação significativa (0,47 a 1% de significância pelo teste de Pearson) entre a porcentagem de células em divisão meiótica anormais e tétrades anormais indicou que uma das causas das porcentagens de tétrades anormais são as anomalias meióticas. Como a correlação foi positiva, quanto maior for a porcentagem de células em divisão anormais das plantas analisadas, maior será a porcentagem de tétrades anormais.

As correlações entre a porcentagem de células em divisão anormais e a taxa de viabilidade obtida por coloração (VPC) e entre a taxa (VPG) obtida por germinação, não foram significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Pearson. Esse resultado indica que não houve dependência entre a viabilidade polínica e a porcentagem total de células em divisão anormais, para as plantas analisadas. Possivelmente não houve correlação devido à grande variação das taxas de viabilidade polínica entre as plantas analisadas.

Entre a porcentagem de tétrades anormais e VPC, a correlação resultante foi significativa (-0,34 a 5% de significância pelo teste de Pearson), demonstrando que a VPC pode ser relacionada com a porcentagem de tétrades anormais, assim como a porcentagem de células em divisão anormais. Como foi ressaltado anteriormente, a causa provável das porcentagens de tétrades anormais e de viabilidade polínica, seriam as anomalias meióticas, podendo-se afirmar que a taxa de viabilidade (VPC) é decorrente das tétrades anormais. A correlação encontrada foi negativa, indicando que quanto maior a porcentagem de tétrades anormais das plantas, menor a VPC destas.

Não houve correlação entre a porcentagem de tétrades anormais e VPG, indicando que essas variáveis não são dependentes, mas o ocorrido pode ser devido ao baixo número de repetições (lâminas) avaliadas.

A correlação entre VPC e VCG foi significativa (0,48 a 1% de significância pelo teste de Pearson), mostrando que se pode aferir a fertilidade de uma planta não somente pelo teste de germinação, mas também através do teste de coloração dos polens. A correlação positiva indica que quanto maior a VPC das plantas analisadas, maior a VPG.

A viabilidade polínica avaliada pelos diferentes testes e a produtividade de frutos não apresentou correlação significativa, ou seja, a viabilidade do pólen das plantas da população F_2 não apresentou dependência com a produtividade das plantas. Isso pode ser atribuído à baixa produtividade de frutos pelas plantas analisadas no presente trabalho.

OWUOR & VAN DER VOSSEN (1981) registraram correlações significativas e positivas entre os diferentes testes de viabilidade de pólen, fertilidade e produtividade, sugerindo que as estimativas de fertilidade poderiam ser feitas utilizando-se os testes de viabilidade polínica por coloração e germinação, o que é vantajoso para seleção de plantas férteis em programas de hibridizações interespecíficas em café, uma vez que podem ser determinadas logo no início do período de floração. Esses mesmos autores

indicaram ainda uma correlação significativa, porém baixa, entre os diferentes testes de viabilidade e produtividade, o que foi atribuído a baixa produtividade das plantas híbridas.

6 CONCLUSÕES

- As plantas da população F_2 de híbridos arabusta apresentam altos índices de irregularidades meióticas.
- As plantas F_2 apresentam diferenças quanto aos tipos de anomalias e a mais freqüente é a ocorrência de monovalentes em metáfase I.
- A planta 94 é a mais regular e a planta 143 a mais irregular quanto ao comportamento meiótico.
- A planta 99 apresentou o maior índice meiótico e a planta 73 o menor índice.
- A viabilidade polínica evidencia diferenças marcantes na fertilidade e estabilidade genética das plantas híbridas F_2 amostradas.
- A presença de irregularidades na meiose está relacionada com a redução da viabilidade polínica nas plantas híbridas F_2.
- As plantas 29 e 45 podem ser usadas como doadoras de pólen em cruzamentos direcionados, devido às maiores porcentagens de polens viáveis.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as plantas híbridas da população F_2 tenham apresentado diferenças quanto às anomalias meióticas e também quanto à viabilidade polínica, podem ser aproveitadas para diferentes finalidades. Por exemplo, as plantas que apresentaram maior taxa de viabilidade polínica, como as plantas 29 e 45, podem ser utilizadas como plantas doadoras de pólen em cruzamentos em programas de melhoramento onde haja interesse por alguma característica funcional ou morfológica. Já as plantas com baixíssima viabilidade polínica, como a planta 98, podem ser utilizadas como plantas receptoras de pólen, ou seja, tipo macho-estéreis.

A partir deste estudo, as plantas híbridas F_2 incluídas na amostra poderão ser utilizadas para estudos de segregação de genes de características de interesse, por meio

do mapeamento físico realizado através de técnicas citomoleculares. Estas informações poderão, por sua vez, complementar informações de mapeamento genômico de café.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; BATISTA, L.A.R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sex Plant Reprodution**, v.11, p.272-276, 1998.

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae:Paniceaea). **Journal of Genetics**, Bangabore, v.87, n.1, p. 33-38, 2008.

AGUIAR, T.E.A.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M.P. GALLO, P.B.; FAZUOLI, L.C. Caracterização de cultivares de C*offea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p.179-192, 2004.

ALEXANDER, M. P. A vesatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Berkeley, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, Dergise, v. 27, n. 03, p.105-116, 1990.

BAJPAI, A.; SINGH, A.K. Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.: Spontaneous Chromosome Instability and Elimination in Important cvs. in North Indian Conditions. **Cytologia**, Tokyo, v.71, p. 131-136, 2006.

BARBOSA, L.V.; MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. P.; VIEIRA, M. L. C. et al. Cytological behavior of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. flavicarpa+*P.cincinnata*. **Plant Breeding**, Berlini, p.1-6, 2006.

BARBOSA, L.V.; VIEIRA M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. flavicarpa Degener + *P. amethystina* Mikan, **Euphytica**, Wagenengen, v. 98, n.1-2, p. 121-127, 1997.

BETTENCOURT, A.J. **Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'**. Circular, 23, Campinas: Instituto Agronômico, 1973. 20p.

BETTIOL-NETO, J.E.; DEL NERO, M.; KAVATI, K.; PINTO-MAGLIO, C.A.F. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.4, p.825-837, 2009.

BIONE, N.C.P.; PAGLIARINI, M.S.; TOLEDO, J.F.F. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. **Genetic and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, n.3, p. 623-631, 2000.

BOAVENTURA, Y.M.S.; CRUZ, N.D. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. *Bourbon* X *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden) que originou o café Icatu. **Turrialba**, San Jose, v.37, p.171-178, 1987.

BOAVENTURA, Y.M.S. Microsporogênese de *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner com número duplicado de cromossomos. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n.2, p. 193-204, 1990.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 4.ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 523p.

BRIDSON, D.M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, Kew, v. 49, p. 331-342, 1994.

BURNHAN, C.R. **Discussions in cytogenetics**. Minneapolis, Burges Publishing Company, 1962, 375p.

CAPOT, J. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Les hybrides "Arabusta". **Café Cacao Thé**, Paris, v. 16, n. 1, p. 3-18, 1972.

CARVALHO, A.; FERWERDA, F.P.; FRAHRN-LELIVELD, J.A.; MEDINA, D.M.; MENDES, A.J.T.; MÔNACO, L.C. Coffee: *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre ex Frohner. In: **Outlines of perennial crop breeding in the tropics**. Eds. Ferwerda, F. P. & Wit, F., Wagenningen, H. Veenman & Zonen, 1969. 511p.

CHAPMAM, C.G.D.; KIMBER, G. Developments in the meiotic analysis of hybrids. II. Amended models for tetraploids. **Heredity**, v. 68, p. 105-113, 1992.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**. CLIFFORD, M.N., WILSON, K.C. (eds), London: Croom Helm, 1985, p.13–14.

CHINNAPPA, C.C. Interspecific hybrids of *Coffea canephora* and *C. liberica.* **Genetica**, v. 41, n. 1, 1970.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (ed.). **Coffee Agronomy**. London: Elsevier, 1988, 334p.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3cafe_09.pdf. Acesso em 30 de novembro de 2009.

CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*; auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v.20, p.787-804, 1961.

CONGER, A. Culture of pollen tubes for chromosomal analysis at the pollen tube division. **Stain Technology**, v. 28, p.289-293, 1953.

CONSOLARO, M.A.L; PAGLIARINI, M.S. Spontaneous chromosome stickiness in microsporocytes of *Centella asiática* (L) Urban (Umbelliferae). **Cytologia**, Tokyo, v.61, p.57-61, 1996.

DAS, B.C.; PRASAD, D.N. & SIKDAR, A.K. Colchicine induced tetraploids of mulberry. **Caryologia**, Firenze, v.2, n.3, p.283-293, 1970.

DUNDAS, I.S.; BRITTEN, E. J.; BYTH, D. E.; GORDON, G. H. Meiotic behavior of hybrids of pigeonpea and two Australian native Atylosia species, **The Journal of Heredity**, v.78, n.4, p. 261-265, 1987.

EADY, C; LINDSEY, E.K; TWELL, D. The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. **The Plant Cell**, v. 7, n.1, p.65-74, 1995.

ELISA, A.A.P. Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto. 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras.

FABER, F.C. Morphologish – Physiologische untersunchunger on Bluten *Coffea*-arten. **Ann Jard. Bot**. **Bludenz**., v.25, p. 59-160, 1912.

FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H.P.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLA, M.B.; LIMA, M.M.A. de; CARVALHO, A. **Cultivares de Café,** Campinas: Instituto Agronômico, 1999.

FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H.P.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B.; GALLO, P.B. **Cultivares de café IAC apropriadas para o plantio adensado.** Campinas: Instituto Agronômico, 2000. 5p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Disponível em: http://apps.fao.org. Acesso em: 30 de novembro de 2009.

GAULDEN, M.E. Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome aberraions. **Mutagenesis**, Oxford, v.2, p. 357-365, 1987.

GOTTSCHALK, W.; KAUL, M.L.H. Asynapsis and desynapsis in flowering plants. I. Asynapsis. **Nucleus**, Calcutta, v.23, p.1-15, 1980a.

GRASSIAS, M.; KAMMACHER, P. Observation sur la conjugaison chomosomique da *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 19, p. 177-190, 1975.

GRASSIAS, M. Analyse des differentes méthodes d'estimation de la fertilité chez les hybrids 'arabusta' et la relation avec leur comportement méiotique. **Colloque ASIC**, p.553-560, 1977.

GRIFFITS, A. J. F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **Introdução à Genética**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743p.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 142p.

HERRERA, J.C.; COMBES, M. C.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A.; LASHERMES, P. Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C.*

arabica × *C. canephora)*. **Theoretical and Applied Genetics**. v.104, n.4, p.661-668, 2002.

HERRERA, J.C.; D'HONT, A; LASHERMES, P. Use of fluorecence *in situ* hybridization as tool for introgression analysis and chromosome identification in *Coffea* (*Coffea arabica* L.) **Genome**, v.50, p.619-626, 2007.

JOHNSON, B.L. Identification of the apparent B-genome donor of wheat. **Canadian Journal Genetics and Cytology,** v.17, n.1. p. 21–39, 1975.

KAMMACHER, P. & CAPOT, J. Sur les caryologiques entre *Coffea Arabica* et *C. canephora*. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 16, p. 289-293, 1972.

KRUG, C.A.; CARVALHO, A. The genetics of Coffea. **Advantage Genetic**, v. 4, p.127-158, 1951.

KRUG, C.A.; MENDES, A.I.T. Cytological observations in *Coffea*-IV. **J. Genet**, v. 39, p.189-203, 1940.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; THOUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F. & CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 261, p.259-266, 1999.

LINDE-LAURSEN , I.B.; BOTHMER, R. V. Aberrant meiotic divisions in a *Hordeum lechleri* x *H. vulgare* hybrid**. Hereditas**, v. 118, p. 145-153, 1993.

LOUARN, J. Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *Coffea eugenioides* Moore.**Café Cacao Thé**, Paris, v. 20, n.1, p. 33-52, p.1976.

MAHÉ, L.; COMBES, M. ; LASHERMES, P. Comparison between a coffee single copy chromosomal region and Arabidopsis duplicated counterparts evidenced high level synteny between the coffee genome and the ancestral *Arabidopsis* genome. **Plant Molecular Biology**, v.64, p. 699-711, 2007.

MEDINA, D.M. Caracterização de híbridos interespecíficos de *Coffea*. 1972. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luís de Queiróz-USP, Piracibaba.

MEDINA, D.M. Microsporogênese em um híbrido triplóide de *Coffea racemosa* Lour. x *C. arabica* L. **Bragantia**, Campinas, v.22, n. 24, p. 299-318, 1963.

MEDINA, D.M. Observações citológicos em Coffea XV – Microsporogênese em *Coffea arabica* L var. rugosa K.M.S. **Bragantia**, v.10, n.3, p. 61-66, 1950.

MEDINA, D.M. Observações citológicas em *Coffea*. XIX– Microsporogênese em *C. dewevrei*. **Bragantia**, v. 12, p. 153-162, 1952.

MEDINA, D.M.; RIJO, L. Microsporogênese em *C. stenophylla* G. Don. E *C. salvatrix* Swynn et Phil. **Bragantia**, Campinas, v. 28, p.307-322, 1969.

MENDES, A. J. T. Observações citológicas em Coffea. XI. Métodos de tratamento pela colchicina. **Bragantia**, Campinas, v.7, n. 9-10, p.221-230, 1947.

MENDES, A.J.T. Observações citológicas em Coffea. XV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, Campinas, v.10, n.3, p.70-87, 1950.

MENDES, A.J.T. **Relatório da Secção de Citologia**, Instituto Agronômico de Campinas – IAC. p. 235-249, 1944.

MENDES, A.J.T. & BACCHI, O. Observações citológicas em Coffea. V. Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. **Jornal de Agronomia**, v.3, n.3, p. 183-206, 1940.

MENDES, C.H.T. Observações citológicas em *Coffea:* XIV. Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, Campinas, v.10, n.4, p.97-104, 1950.

MENDES, C.H.T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. **Bragantia**, v. 9, p. 35-41, 1949.

MENDES-BONATO, A. B., PAGLIARINI, M. S., VALLE, C, B., OLIVEIRA PENTEADO, M.I. A Severe Case of Chromosome Stickness in Pollen Mother Cells of *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf (Gramineae). **Cytologia**, Tokyo, **v.**66, n**.**3, p. 287-291, 2001.

MENDES-BONATO, A. B; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: paniceae). **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.50, n.5, p. 831-837, 2007.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.; OLIVEIRA PENTEADO, M.I. Chromossome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 419-425, 2002.

MENDES-BONATO, A. B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 711-714, 2006.

MÔNACO, L.C.; MEDINA, D.M. Hibridações entre *Coffea arabica* e *C. kapakata*: anáise citológica de um híbrido triplóide**. Bragantia,** Campinas, v.24, n. 17, p.191-201, 1965.

OWUOR, J.B.O. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr.:ll. Meiosis in F_1 hybrids and backcrosses to *C. arabica.* **Euphtytica**, Wageningen, v.34, n.2, p.355-360, 1985.

OWUOR, J.B.O.; VAN DER VOSSEN, H.A.M. Interspecific hybridization between *Coffea Arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr. I. Fertility in F_1 hybrids and backcrosses to C. arabica. **Euphytica**, Wageningen, v. 30, p. 861-866, 1981.

PAIVA, E. A. A. Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto. 2006. 53p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras.

PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 23, n. 4, p.997-1002, 2000.

PEIRSON, B.N.; OWEN, H.A. FELDMAM, K.A.; MAKAROFF, C.A. Characterization of three mal-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibiting alterations in meiosis. **Sex Plant Reprodution**, Tokyo, v.9, p.1-16, 1996.

PIEROZZI, N.; BARONI, R. M.; BENATTI, R. Cytological investigations of the microsporogenesis in male-sterile ramie (*Boehmeria nivea* Gaud.) and its offspring. **Cytologia**, Tokyo, v. 73, p. 21-31, 2008.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 5 ed. Piracicaba: Nobel, 1973, 423p.

PINTO-MAGLIO, C. A. F. Cytogenetics of coffee. **Braz. J. Plant Physiol**., v.18, n.1, p.37-44, 2006.

PINTO-MAGLIO, C.A.F. & CRUZ, N.D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. nucleolar chomosomes. **Caryologia**, Firenze, v.40, n.1-2, p.7-23, 1987.

PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N.D. Pachytene chomosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, Firenze, v.51, n.1, p.19-35, 1998.

RAINA, S.N.; MUKAY, Y.; YAMAMOTO, M. *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 1204-1209, 1998.

REDDY, A.G.S.M.; NARAYAN, K.N. Meiosis in hybrids between tree coffees (*C. liberica, C. dewevrei*) and Nandi coffee (*C.eugenioides*). **Genetica**, v. 55, p.123-127, 1981.

REIS, C.A.O.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL´AGNOL, M. Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 212-218, 2008.

RIESEBERG, L.H.; BAIRD, S.J.; GARDNER, K.A. Hybridization, introgression, and linkage evoluiton. **Plant Molecular Biology**. v. 42, n.1, p.205-224, 2000.

RISSO-PASCOTTO, C. PAGLIARINI, M.S. VALLE, C.B.; MENDES-BONATO, A.B. Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineaea). **Plant Breeding**, Berlin, v.122, p.136-140, 2003.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae), **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n. 1-2, p. 155-159, 2005.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding.** New York: John & Sons, 1995, p.325-440.

SHEIDAI, M.; NOORMOHAMADI, M.; KASHANI, N.; AHMADI, M. Cytogenetic study of some rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars and their hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 56, p. 387-397, 2003.

SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 119p.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics.** 2. Ed. Boca Raton: CRC press, 2002. 463p.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciênc. agrotec**., Lavras. v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London, 1972. 216p.

SYBENGA, J. Cytogenetics in Plant Breeding. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics.** Springer-Verlag, Berlin, 1992.

SYBENGA, J. Preferential pairing estimates from multivalent frequencies in tetraploids. **Genome**, v.37, n.6, p.1045-1055, 1994.

TECHIO, V. H. Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. 2002. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras.

TECHIO, V.H. et al. Meiosis in elephant grass (Pennisetum purpureum), pearl millet (Pennisetum glaucum) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.

TECHIO, V.H; DAVIDE, L.C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, v. 20, n.4, p. 7-18, 2007.

VEGA J. M.; FELDMAN, M. Effect of the pairing gene ph1 and premeiotic colchicine treatment on intraand interchromosome pairing of isochromosomes in common wheat. **Genetics**, v. 150, p.1199–1208, 1998.

VISHVESHWARA, S. A preliminary report on meiotic irregularities in diploids and diploid interspecific hybrids in coffee. **Caryologia**, Firenze, v. 16, n.2, p. 535-539, 1963.

VISHVESHWARA, S. & CHINNAPPA, C.C. Induced auto-tetraploid in *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Current Science***,* Bangalore, v.34, n.3, p. 90-92, 1965.

WRIGLEY,G. **Coffee**. London UK: Longman Scientific and Technical, 1988. 639 p.

9 ANEXOS

Anexo I: Freqüência do número de bivalentes, univalentes, trivalentes, tetravalentes e polivalentes na fase de metáfase I

Geração	Plantas	Metáfase I				
		Univalente	**Trivalente**	**Tetravalente**	**Polivalente**	**Migração precoce**
				%		
F_2	**1**	93,33	6,67	20,00	3,33	40,00
	7	100,00	10,00	46,67	3,33	56,67
	16	100,00	3,33	83,33	13,33	50,00
	17	100,00	3,33	33,33	3,33	56,67
	23	90,00	3,33	6,67	0,00	63,33
	29	96,67	13,33	16,67	0,00	63,33
	35	*	*	*	*	*
	38	100,00	10,00	40,00	10,00	25,00
	39	96,67	16,67	33,33	0,00	63,33
	40	100,00	3,33	36,67	0,00	63,33
	44	80,00	23,33	80,00	26,67	46,67
	45	100,00	3,33	30,00	0,00	40,00
	54	100,00	10,00	63,33	13,33	60,00
	56	100,00	16,67	46,67	43,33	46,67
	57	96,67	23,33	46,67	6,67	40,00
	60	96,67	46,67	73,33	40,00	63,33
	63	86,67	6,67	36,67	13,33	26,67
	73	100,00	13,33	23,33	20,00	36,67
	74	96,67	16,67	80,00	16,67	50,00
	82	76,67	6,67	53,33	16,67	36,67
	86	75,00	10,00	75,00	25,00	40,00
	89	100,00	3,33	36,67	0,00	70,00
	94	100,00	0,00	50,00	10,00	40,00
	98	100,00	3,33	36,67	0,00	70,00
	99	93,33	0,00	40,00	3,33	33,33
	102	90,00	10,00	50,00	13,33	63,33
	117	100,00	20,00	43,33	20,00	33,33
	124	80,00	35,00	65,00	25,00	40,00
	143	100,00	10,00	30,00	0,00	23,33
	152	96,67	6,67	40,00	3,33	50,00
F_1	**H2460**	86,67	0,00	20,00	3,33	23,33
P_1	**Co 667**	6,67	0,00	6,67	0,00	23,33
P_2	**Co 254**	36,67	0,00	53,33	0,00	6,67

Anexo II: Freqüência do número de células normais e retardatários na fase de anáfase I.

Geração	Plantas	Anáfase I		
		Células normais	Retardatários	Ponte
		%		
	1	63,33	36,67	0,00
	7	33,33	66,67	0,00
	16	50,00	50,00	0,00
	17	40,00	60,00	0,00
	23	36,67	63,33	0,00
	29	26,67	73,33	0,00
	35	40,00	60,00	0,00
	38	20,00	80,00	0,00
	39	43,33	56,67	0,00
	40	50,00	50,00	0,00
	44	66,67	33,33	0,00
	45	20,00	76,67	3,33
	54	43,33	56,67	0,00
	56	33,33	66,67	0,00
F_2	**57**	46,67	53,33	0,00
	60	53,33	46,67	0,00
	63	33,33	66,67	0,00
	73	13,33	86,67	0,00
	74	73,33	26,67	0,00
	82	46,67	53,33	0,00
	86	66,67	33,33	0,00
	89	40,00	60,00	0,00
	94	26,67	70,00	3,33
	98	26,67	73,33	0,00
	99	13,33	86,67	0,00
	102	23,33	76,67	0,00
	117	20,00	80,00	0,00
	124	30,00	70,00	0,00
	143	20,00	80,00	0,00
	152	26,67	73,33	0,00
F_1	**H2460**	20,00	80,00	0,00
P_1	**Co 667**	66,67	33,33	0,00
P_2	**Co 254**	73,33	26,67	0,00

Anexo III: Freqüência do número de células normais e retardatários em telófase I.

Geração	Plantas	Telófase I	
		Células normais	Retardatários
		%	
F_2	**1**	53,33	46,67
	7	56,67	43,33
	16	40,00	60,00
	17	26,67	73,33
	23	33,33	66,67
	29	16,67	83,33
	35	20,00	80,00
	38	53,33	46,67
	39	36,67	63,33
	40	40,00	60,00
	44	46,67	53,33
	45	23,33	76,67
	54	43,33	56,67
	56	23,33	76,67
	57	33,33	66,67
	60	36,67	63,33
	63	40,00	60,00
	73	10,00	90,00
	74	46,67	53,33
	82	23,33	76,67
	86	30,00	70,00
	89	56,67	43,33
	94	63,33	36,67
	98	60,00	40,00
	99	40,00	60,00
	102	30,00	70,00
	117	20,00	80,00
	124	46,67	53,33
	143	20,00	80,00
	152	26,67	73,33
F_1	**H2460**	30,00	70,00
P_1	**Co 667**	73,33	26,67
P_2	**Co 254**	63,33	36,67

Anexo IV: Freqüência do número de células normais e migração precoce na fase de metáfase II

Geração	Plantas	Metáfase II	
		Células normais	Migração precoce
		%	
F_2	**1**	40,00	60,00
	7	36,67	63,33
	16	50,00	50,00
	17	40,00	60,00
	23	23,33	76,67
	29	50,00	50,00
	35	40,00	60,00
	38	50,00	50,00
	39	40,00	60,00
	40	43,33	56,67
	44	46,67	53,33
	45	56,67	43,33
	54	50,00	50,00
	56	43,33	56,67
	57	43,33	56,67
	60	43,33	56,67
	63	33,33	66,67
	73	16,67	83,33
	74	66,67	33,33
	82	33,33	66,67
	86	36,67	63,33
	89	23,33	76,67
	94	60,00	40,00
	98	36,67	63,33
	99	40,00	60,00
	102	33,33	66,67
	117	36,67	63,33
	124	53,33	46,67
	143	36,67	63,33
	152	50,00	50,00
F_1	**H2460**	20,00	80,00
P_1	**Co 667**	50,00	50,00
P_2	**Co 254**	60,00	40,00

Anexo V: Freqüência do número de células normais e retardatários na fase de anáfase II.

Geração	Plantas	Anáfase II	
		Células normais	Retardatários
		%	
	1	33,33	66,67
	7	43,33	56,67
	16	33,33	66,67
	17	20,00	80,00
	23	16,67	83,33
	29	40,00	60,00
	35	23,33	76,67
	38	23,33	76,67
	39	30,00	70,00
	40	36,67	63,33
	44	36,67	63,33
	45	26,67	73,33
	54	30,00	70,00
F_2	**56**	23,33	76,67
	57	33,33	66,67
	60	33,33	66,67
	63	43,33	56,67
	73	10,00	90,00
	74	30,00	70,00
	82	13,33	86,67
	86	36,67	63,33
	89	30,00	70,00
	94	40,00	60,00
	98	30,00	70,00
	99	23,33	76,67
	102	20,00	80,00
	117	23,33	76,67
	124	40,00	60,00
	143	16,67	83,33
	152	36,67	63,33
F_1	**H2460**	20,00	80,00
P_1	**Co 667**	63,33	36,67
P_2	**Co 254**	63,33	36,67

Anexo VI: Freqüência do número de células normais e retardatários em telófase II.

Geração	Plantas	Telófase II	
		Células normais	Retardatários
		%	
F_2	**1**	36,67	63,33
	7	76,67	23,33
	16	40,00	60,00
	17	23,33	76,67
	23	50,00	50,00
	29	26,67	73,33
	35	26,67	73,33
	38	50,00	50,00
	39	30,00	70,00
	40	26,67	73,33
	44	33,33	66,67
	45	56,67	43,33
	54	53,33	46,67
	56	23,33	76,67
	57	36,67	63,33
	60	36,67	63,33
	63	33,33	66,67
	73	20,00	80,00
	74	46,67	53,33
	82	13,33	86,67
	86	40,00	60,00
	89	46,67	53,33
	94	70,00	30,00
	98	50,00	50,00
	99	26,67	73,33
	102	30,00	70,00
	117	30,00	70,00
	124	50,00	50,00
	143	23,33	76,67
	152	36,67	63,33
F_1	**H2460**	8,33	91,67
P_1	**Co 667**	86,67	13,33
P_2	**Co 254**	63,33	36,67

Anexo VII: Freqüência em porcentagem (%) do número de tétrades normais, díades, tríades, políades e micronúcleos na fase de tétrade

Geração	Plantas	Tétrades				
		Normal	Díade	Tríade	Políade	Micronúcleo
		%				
F_2	**1**	45,00	0,00	0,00	1,67	53,33
	7	53,33	0,00	0,00	3,33	45,00
	16	36,67	0,00	23,33	10,00	56,67
	17	20,00	0,00	0,00	0,00	80,00
	23	38,33	0,00	0,00	0,00	65,00
	29	30,00	0,00	8,33	1,67	63,33
	35	55,00	0,00	0,00	0,00	45,00
	38	48,33	0,00	0,00	0,00	51,67
	39	60,00	0,00	0,00	1,67	38,33
	40	48,33	0,00	3,33	0,00	50,00
	44	23,33	5,00	30,00	1,67	56,67
	45	43,33	0,00	3,33	3,33	51,67
	54	15,00	0,00	0,00	1,67	83,33
	56	11,67	0,00	1,67	0,00	86,67
	57	28,33	0,00	3,33	0,00	71,67
	60	36,67	0,00	1,67	0,00	63,33
	63	50,00	1,67	1,67	6,67	43,33
	73	8,33	0,00	5,00	0,00	90,00
	74	58,33	0,00	0,00	0,00	41,67
	82	11,67	0,00	0,00	0,00	88,33
	86	41,67	0,00	0,00	0,00	58,33
	89	30,00	0,00	3,33	0,00	68,33
	94	46,67	0,00	1,67	0,00	51,67
	98	53,33	0,00	0,00	1,67	46,67
	99	70,00	0,00	3,33	0,00	26,67
	102	16,67	0,00	3,33	0,00	80,00
	117	35,00	0,00	0,00	0,00	65,00
	124	43,33	3,33	18,33	0,00	41,67
	143	65,00	0,00	5,00	0,00	30,00
	152	31,67	0,00	0,00	0,00	68,33
F_1	H2460	25,00	0,00	0,83	0,00	73,33
P_1	Co 667	85,00	1,67	4,17	0,00	1,67
P_2	Co 254	76,67	0,00	1,67	2,50	7,50

Anexo VIII: Viabilidade por coloração

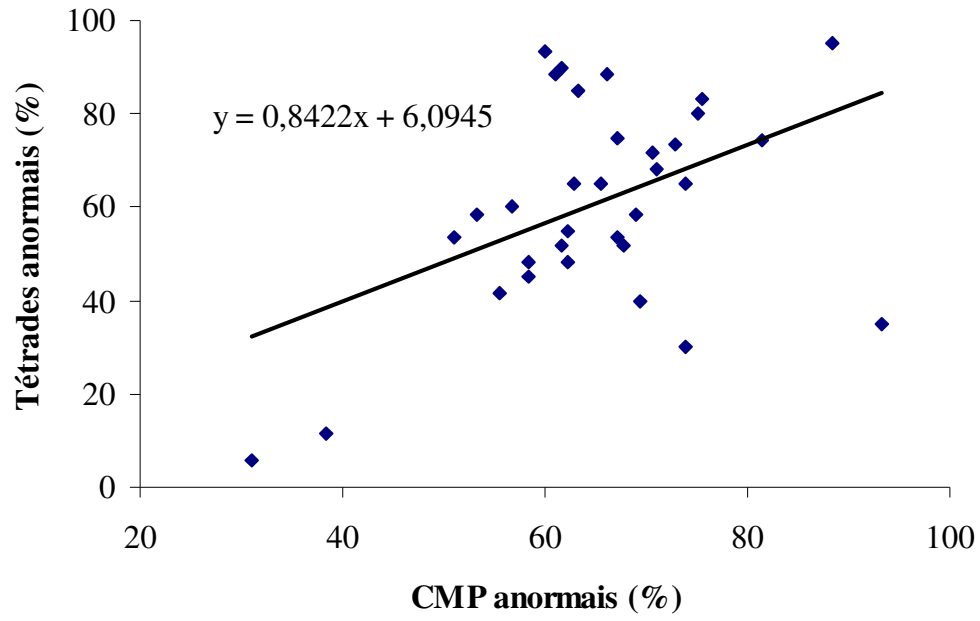
Geração	Planta	Média de polens coloridos	Média de polens incolores	VPC %
	01	284,25	75,75	78,96
	07	423,75	119,75	77,97
	16	116,75	39,00	74,96
	17	270,00	220,50	55,04
	23	269,75	206,50	56,64
	29	115,00	122,75	48,37
	35	449,25	206,25	68,53
	38	214,00	97,00	68,81
	39	154,50	93,75	62,23
	40	179,75	92,50	66,02
	44	142,50	130,25	52,24
	45	298,25	78,50	79,16
	54	197,50	155,50	55,95
	56	115,50	166,25	40,99
	57	153,75	193,75	44,24
F_2	**60**	117,00	292,50	28,57
	63	310,00	107,50	74,25
	73	164,50	126,50	56,53
	74	88,50	248,75	26,24
	82	139,50	154,00	47,53
	86	*	*	*
	89	251,25	228,75	52,34
	94	227,25	86,25	72,49
	98	157,50	168,00	48,39
	99	160,50	198,25	44,74
	102	171,50	213,50	44,54
	117	151,50	66,25	69,57
	124	236,00	97,25	70,82
	137	101,00	119,25	45,86
	143	176,50	73,25	70,67
	152	150,00	151,50	49,75
F_1	**H2460**	248,25	214,00	53,70
	Co 667	369,25	69,25	84,21
P_1 (BV)	**15 (BV)**	271,25	36,00	88,28
	30 (BV)	325,25	32,50	90,91
P_2 (R)	**Co 254**	251,75	148,75	62,86

* Planta não avaliada

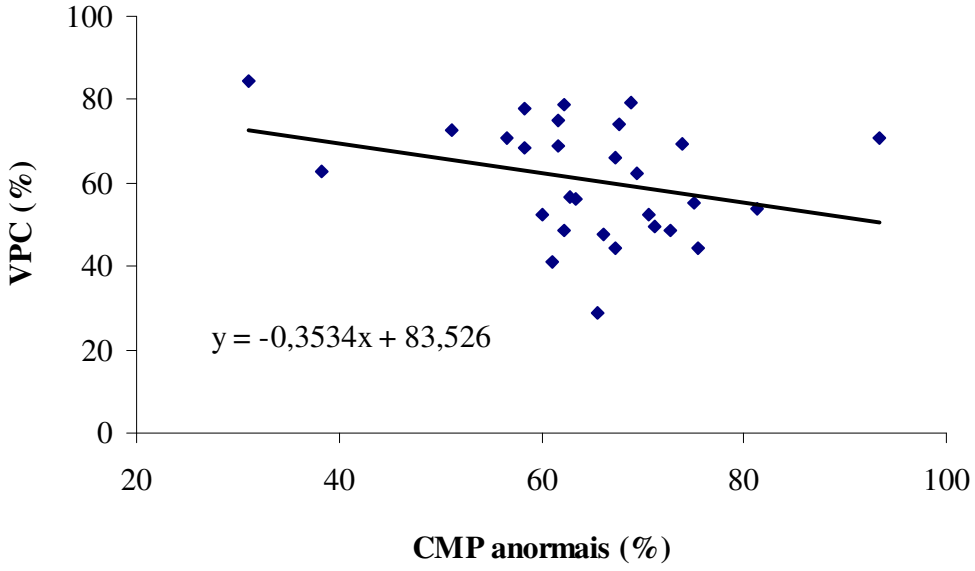
Anexo IX: Viabilidade por germinação

Geração	Planta	Média de polens por lâmina	Média de polens germinados	VPG %
F_2	**01**	70	7	10,00
	07	1650	13	9,85
	16	1460	533	36,51
	17	225	10	4,22
	23	1280	99	7,70
	29	370	142	38,38
	35	1130	239	21,11
	38	1535	327	21,27
	39	1225	263	21,43
	40	575	43	7,48
	44	840	62	7,38
	45	1815	578	31,85
	54	1750	295	16,86
	56	575	69	12,00
	57	720	56	7,78
	60	940	64	6,76
	63	1750	500	28,54
	73	*	*	*
	74	*	*	*
	82	1000	86	8,55
	86	*	*	*
	89	1305	50	3,83
	94	1000	159	15,90
	98	1825	62	3,40
	99	*	*	*
	102	780	117	15,00
	117	2350	252	10,70
	124	2000	193	9,63
	143	1995	323	16,19
	152	1750	127	7,26
F1	**H2460**	600	38	6,25
P1 (BV)	**Co 667**	4050	1336	38,6
P2 (R)	**Co 254**	4500	304	12,27

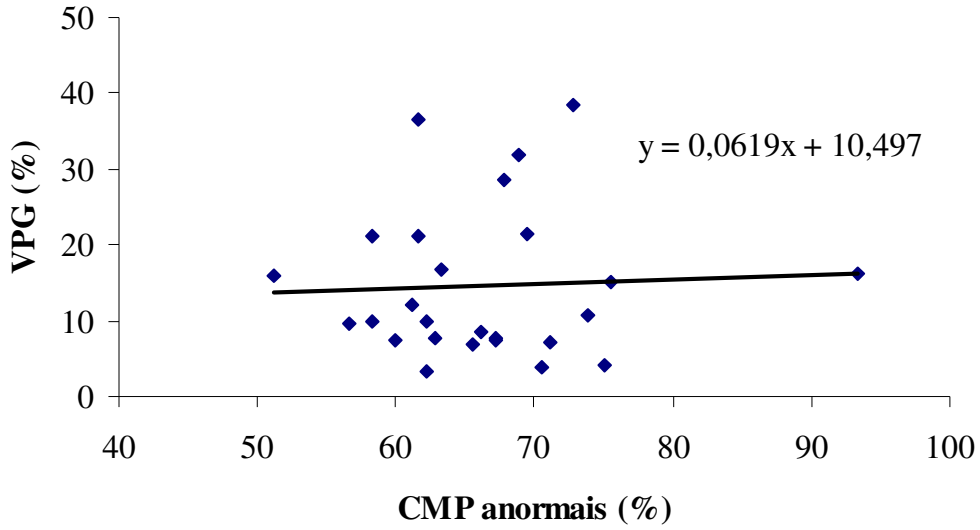
* Planta não avaliada



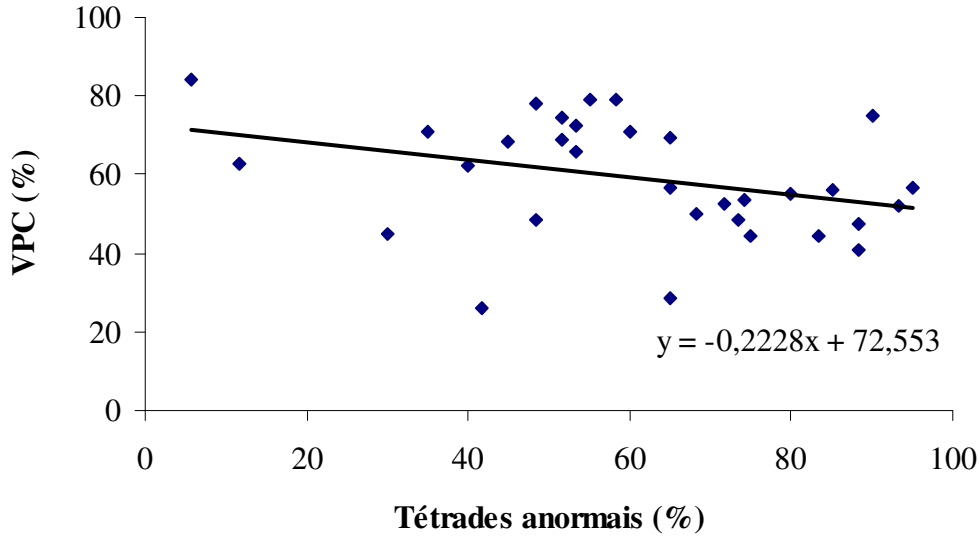
Anexo X: Células em divisão anormais x tétrades anormais. Correlação=0,47 a 1% de significância.



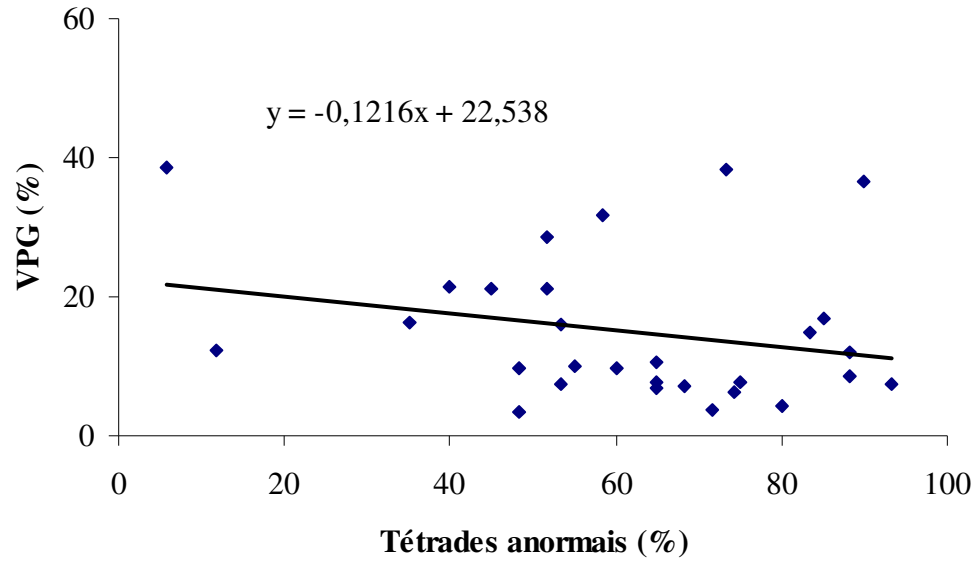
Anexo XI: Células em divisão anormais x VPC. Não houve correlação.



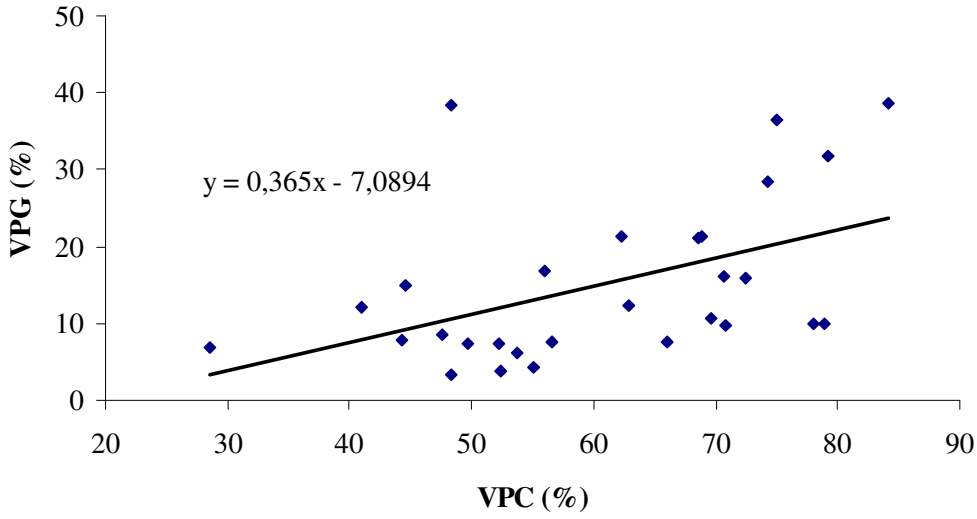
Anexo XII: Células em divisão anormais x VPG. Não houve correlação.



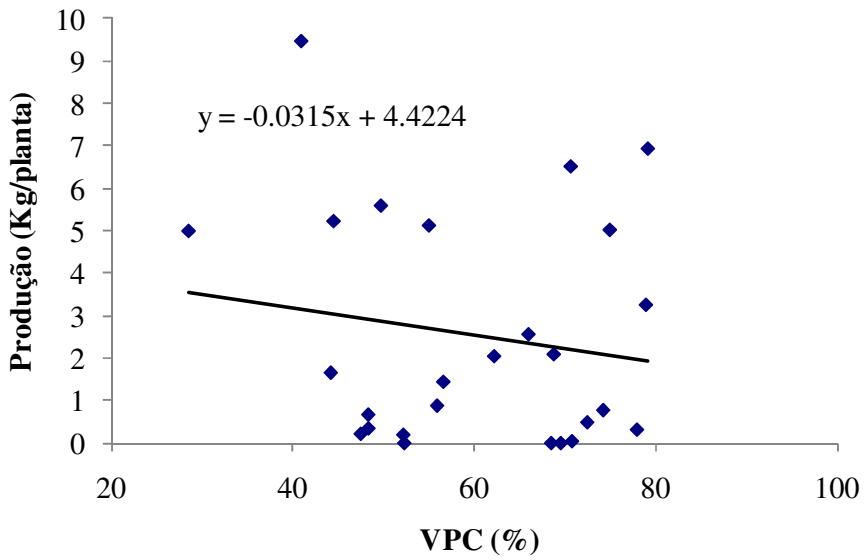
Anexo XIII: Tétrades anormais x VPC. Correlação= -0,34 a 5% de significância.



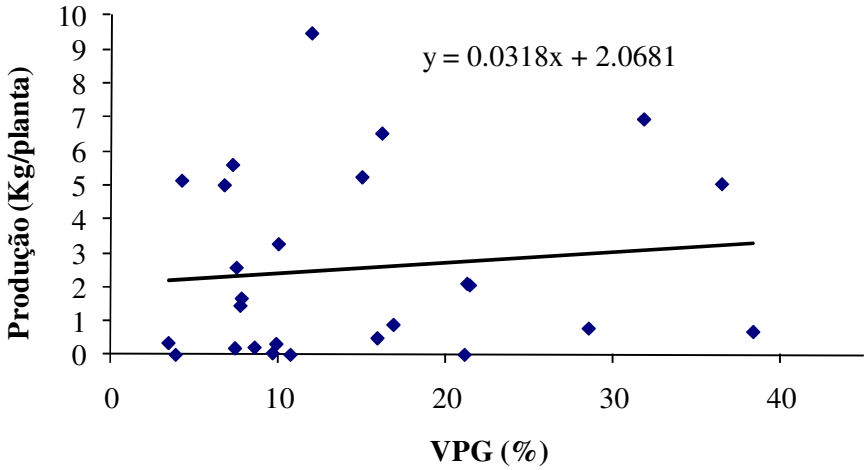
Anexo XIV: Tétrades anormais x VPG. Não houve correlação.



Anexo XV: VPC x VCG. Correlação= 0,48 a 1% de significância.



Anexo XVI: VPC x Produção. Não houve correlação.



Anexo XVII: VPG x Produção. Não houve correlação.