

**Avaliação da Orizalina como indutor de alterações na ploidia de  
*Coffea canephora***

**Evaluation of Oryzalin as ploidy modification inducer for *Coffea  
canephora***

**Evaluación de la Orizalina como inductor de cambios en la ploidia de  
*Coffea canephora***

DOI:10.34117/bjdv10n9-011

Submitted: Aug 02<sup>th</sup>, 2024

Approved: Aug 23<sup>th</sup>, 2024

**Paula Cristina da Silva Angelo**

Doutora em Ciências Biológicas - Genética pela Universidade de São Paulo (USP)  
Instituição: Embrapa Café, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR -  
EMATER)

Endereço: Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: paula.angelo@embrapa.br

**Ana Paula Marques Ferreira**

Graduada em Agronomia pela Faculdade Unopar  
Instituição: Embrapa Café, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR -  
EMATER)

Endereço: Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: anapaulaagro99@outlook.com

**Luciana Harumi Shigueoka**

Doutora em Agronomia - Fitossanidade pela Universidade Estadual de Londrina  
Instituição: Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR - EMATER)

Endereço: Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: lucianashigueoka@gmail.com

**Tumoru Sera**

Doutor em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade de São  
Paulo (USP)

Instituição: Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR - EMATER)

Endereço: Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: tsera01@gmail.com

**Gustavo Hiroshi Sera**

Doutor em Agronomia – Fitotecnia pela Universidade Estadual de Londrina  
Instituição: Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR - EMATER)

Endereço: Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: gustavosera@idr.pr.gov.br

## RESUMO

Cruzamentos interespecíficos são utilizados em várias espécies para promover a introgressão de características que agregam valor agrônomo a plantas cultivadas. Um clone de *C. canephora* tetraploidizado foi um dos genitores da cultivar Icatu de *C. arabica*, uma das primeiras cultivares a apresentar resistência à ferrugem-alaranjada, quando a doença foi registrada no Brasil, há algumas décadas. A tetraploidização de *C. canephora*, comprovadamente resistente a várias populações do nematoide *M. paranaensis*, é uma etapa importante na obtenção de *C. arabica* com resistências múltiplas. Neste trabalho a orizalina em ágar suplementado com citocinina foi utilizada para tratar os meristemas apicais das plantas e empregamos o número de estômatos nas folhas e o diâmetro do núcleo como aferidores indiretos de ploidia. Dezenove plantas foram selecionadas no primeiro ciclo, e cinco plantas do segundo ciclo de seleção estão em observação, por apresentarem números de estômatos nas folhas significativamente menores do que as plantas não tratadas.

**Palavras-chave:** cafeeiro, compatibilidade reprodutiva, poliploidia, resistência a pragas, nematoide.

## ABSTRACT

Interspecific breeding is applied to promote the introduction of valuable agronomic traits in numerous cultivated plant species. A synthetic tetraploid was used as genitor to obtain the *C. arabica* cv. Icatu, one of the early varieties displaying resistance to the leaf rust, when this disease was firstly identified in Brazil, decades ago. Tetraploidization of *C. canephora* resistant to diverse populations of the nematode *M. paranaensis* is important to produce *C. arabica* expressing multiple resistances. In this work, oryzalin in cytokinin supplemented agar was used to treat the apical meristems, and stomata counts in addition to nuclei diameters were applied as ploidy indirect estimatives. Nineteen plants were selected in the first cycle, and five plants from the second selection cycle are under evaluation, because they displayed leaf stomata counts significantly lower than untreated plants.

**Keywords:** coffee plant, reproductive compatibility, polyploidy, resistance, nematode.

## RESUMEN

Los cruces interespecíficos se utilizan en varias especies para promover la introgresión de rasgos que añaden valor agronómico a las plantas cultivadas. Un clon tetraploidizado de *C. canephora* fue uno de los parentales del cultivar Icatu de *C. arabica*, uno de los primeros cultivares en mostrar resistencia a la roya naranja cuando la enfermedad fue registrada en Brasil hace algunas décadas. La tetraploidización de *C. canephora*, de probada resistencia a varias poblaciones del nematodo *M. paranaensis*, es un paso importante para la obtención de *C. arabica* con resistencias múltiples. En este trabajo, se utilizó orizalina en agar suplementada con citoquinina para tratar los meristemas apicales de las plantas y utilizamos el número de estomas de las hojas y el diámetro del núcleo como indicadores indirectos de ploidía. Diecinueve plantas fueron seleccionadas en el primer ciclo, y cinco plantas del segundo ciclo de selección están en observación por tener un número significativamente menor de estomas en las hojas que las plantas no tratadas.

**Palabras clave:** cafeto, compatibilidad reproductiva, poliploidía, resistencia a plagas, nematodo.

## 1 INTRODUÇÃO

O cruzamento interespecífico tem sido utilizado para a introgressão de resistência a pragas e doenças, entre outras características, em plantas cultivadas. Quando a espécie que é fonte dos genes de resistência apresenta ploidia diferente daquela que precisa recebê-los, é possível melhorar a compatibilidade reprodutiva entre as duas utilizando anti-mitóticos, para induzir a poliploidização daquela que apresenta a menor ploidia. Este processo tem sido utilizado para roseiras, macieiras, pessegueiros, bananeiras e mandioca (Hamill; Smith; Dodd, 1992; Feng *et al.*, 2016; Podwyszynska *et al.*, 2017; Schulze; Contreras, 2017; Mondin *et al.*, 2018).

Antimitóticos interferem na polimerização dos microtúbulos que constituem o fuso mitótico, ligando-se às subunidades proteicas que os constituem, e impedindo que se liguem umas às outras. Simplificando muito, o resultado da interferência dos antimitóticos no ciclo celular é que as membranas nuclear e celular reconstituem-se antes da conclusão das fases finais da mitose, gerando células com números anômalos de cromossomas, idealmente com o número de cromossomas duplicado. Dois dos produtos mais utilizados como antimitóticos são a colchicina e a orizalina, tendo a última maior afinidade por subunidades de microtúbulos de plantas, o que a torna menos tóxica para humanos (Dostál; Libusová, 2014) e dispensa a utilização de concentrações altas, como as que são utilizadas no trabalho com a colchicina (Quinaglia; Shigueoka; Angelo, 2023).

Em cafeeiros, cruzamentos interespecíficos foram utilizados com sucesso para introduzir, no germoplasma do tetraploide *C. arabica* ( $2n = 4x = 44$ ), a resistência ao bicho mineiro (Medina-Filho *et al.*, 1977) e à ferrugem (Mendes, 1947; Carvalho; Costa; Fazuoli, 1983), identificadas respectivamente nas espécies diploides ( $2n = 2x = 22$ ) *Coffea racemosa* e *C. canephora*. Nesse último caso, as plantas de *C. canephora* foram tetraploidizadas por aplicação de colchicina (Mendes, 1947), e os tetraploides estáveis foram cruzados e retrocruzados com *C. arabica* para gerar uma variedade resistente, denominada Icatu (Carvalho; Costa; Fazuoli, 1983), que ainda hoje é empregada em programas de melhoramento.

Plantas de *C. canephora* tetraploidizadas devem apresentar número de estômatos nas folhas similar ao número observado em *C. arabica*. Isto é, há uma correlação inversa entre o número de estômatos e o número de cromossomas nestas duas espécies do gênero *Coffea*, sendo que o diploide

*C. canephora* tem número de estômatos aproximadamente duas vezes maior que o observado para o tetraploide *C. arabica* (Mishra, 1997). Essas características tornam o número de estômatos nas folhas um bom aferidor indireto da ploidia de plantas tratadas experimentalmente com antimitóticos, e lhes garante o potencial de reduzir drasticamente o número de preparações citogenéticas necessárias para identificar tetraploides entre as centenas de plantas que são tratadas. Esse potencial foi testado também em bananeiras (van Duren *et al.*, 1996) e madioca (Mondin *et al.*, 2018), por exemplo.

No Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-EMATER (IDR-Paraná), em Londrina/PR, clones de *C. canephora* tiveram sua resistência a onze populações de *M. paranaensis* testada em experimentos de inoculação controlada dos parasitas de raízes (Shigueoka *et al.*, 2022). Ao longo dos últimos anos, tratamos diferentes tipos de explantes com colchicina e orizalina (Gasparini *et al.*, 2021a e b; Arantes *et al.* 2022a e 2022b; Angelo *et al.*, 2023; Quinaglia; Shigueoka; Angelo, 2023), para induzir a tetraploidização daqueles clones. O intuito foi de gerar plantas apresentando todos os genes de resistência em homozigose e acessíveis para introgressão em variedade de *C. arabica*, para produzir genótipos com resistência múltipla, e valor agregado ainda maior que cultivares resistentes como o IAPAR 106 (Sera *et al.*, 2020).

O texto a seguir descreve resultados dos experimentos de aplicação de orizalina em gemas apicais de estacas enraizadas de um dos clones de *C. canephora* resistente a nematoides, e os procedimentos utilizados para a seleção de plantas com número anômalo e reduzido de estômatos nas folhas, que, espera-se, tenham números anômalos e aumentados de cromossomas em tecidos gerados por gemas poliploidizadas, idealmente tetraploides.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Estacas de *Coffea canephora* clone IAPAR ET0703 T13 resistentes a várias populações do nematoide das raízes *Meloidogyne paranaensis* (Shigueoka *et al.*, 2022) foram enraizadas e mantidas em tubetes com 300 cm<sup>3</sup> de substrato para mudas e adubo de liberação lenta no viveiro telado do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR - EMATER (IDR - Paraná) - Unidade Londrina, onde recebem irrigação por aspersão e tratos culturais tradicionais. Em maio de 2023, quando as estacas apresentaram dois a três nós caulinares, as gemas apicais foram tratadas com orizalina em água suplementado com citocinina (benzilaminopurina a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>), e solidificado em

microtubos do tipo Eppendorf antes de serem transportados para o viveiro e aplicados sobre as gemas apicais das mudas. Este método é uma modificação daquele que foi descrito para estacas de pessegueiro (Schulze; Contreras, 2017), esta também planta lenhosa. Foram tratadas 25 estacas enraizadas (425-449) com  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  e 25 estacas enraizadas (400-424) com  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  de orizalina em ágar suplementado com citocinina. Quinze plantas (450-464) foram tratadas com ágar suplementado com citocinina sem adição de orizalina. Os microtubos foram deixados em contato com as gemas apicais das plantas por quatro dias, no mesmo viveiro telado onde ocorreu o enraizamento.

Nas semanas seguintes ao fim dos tratamentos, as plantas retomaram o crescimento vegetativo. Em setembro de 2023, foram transferidas para pacotes com capacidade para três litros de terra. Assim que geraram folhas com dimensões de 15 cm de comprimento x 8 cm de largura, procedeu-se a coleta de uma folha com estas dimensões por nó, até atingir três folhas dos ramos plagiotrópicos e três folhas dos ramos ortotrópicos de cada planta. As folhas coletadas foram utilizadas para produzir impressões do limbo abaxial em esmalte de unhas transparente. As impressões foram transferidas para fita adesiva transparente e coladas em lâminas de vidro para microscopia (van Duren *et al.*, 1996). Cinco imagens da seção medial de cada folha coletada/impressão em esmalte foram registradas, utilizando aumento de 400X (imagens medindo  $0,04 \text{ mm}^2$ ) de um microscópio óptico com câmera digital acoplada. Evitou-se fotografar os flancos de nervuras e as bordas das folhas. A seleção de plantas com número de estômatos reduzido foi realizada ao fim destas contagens. A princípio, plantas com número de estômatos reduzido à metade apresentariam número dobrado de cromossomas (Mishra, 1997).

Para as plantas selecionadas, foi registrado o número de estômatos em campos visuais mais abrangentes (imagens medindo  $0,6 \text{ mm}^2$ ), capturadas com aumento de 100X do mesmo microscópio. Com este aumento de 100X, foram registradas e avaliadas três imagens de cada folha coletada/impressão em esmalte, no mínimo. Realizou-se também a contagem de cloroplastos em células-guarda para algumas plantas. A epiderme abaxial das folhas foi pinçada e corada com lugol a 2%, em água, por cinco a 10 minutos. Os fragmentos de epiderme corados foram cobertos com glicerol e lamínulas de vidro e fotografados em aumento de 400X, para visualização dos cloroplastos evidenciados em função da reação do iodo com o amido. A princípio, plantas com número reduzido de estômatos apresentariam maior número de cloroplastos em células-guarda (Sreenivasan *et al.*, 1992; Mishra *et al.*, 2018). Além de contar estômatos em dois aumentos e contar

cloroplastos em células-guarda, o comprimento da abertura estomática (Mishra, 1997; Mondin *et al.*, 1998) nas impressões em esmalte e o diâmetro dos núcleos (Benett, 1987) em células epidérmicas coradas com carmin acético a 0,5% foram medidos. Todas estas medidas/variáveis são ambas aferidoras indiretas do número de cromossomas. Em julho de 2024, 14 plantas selecionadas foram transferidas para pacotes com capacidade para cinco litros e continuam em observação, no mesmo viveiro telado.

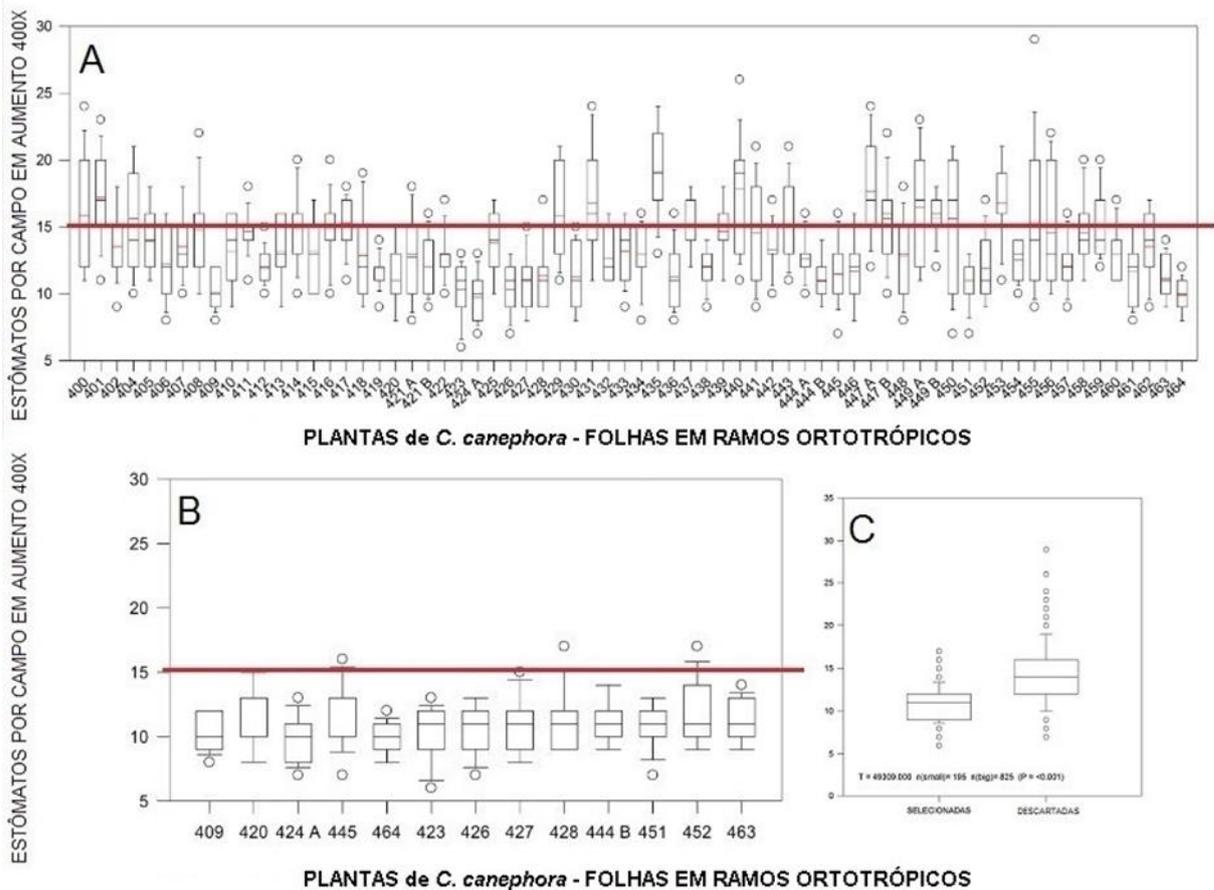
Em cafeeiros, não há relatos de experimentos similares na literatura especializada. Em outras espécies a indução de poliploidia tem frequência de sucesso muito reduzida (da ordem de 1 a 7% da quantidade de explantes tratados, Schulze; Contreras, 2017; Mondin *et al.*, 2018) e a relação entre concentração de anti-mitótico e poliploidização varia em função da espécie submetida ao tratamento, do antimitótico utilizado, do tipo e estágio de desenvolvimento do explante/tecido tratado, métodos de aplicação do antimitótico, etc. Por isso, há pouco sentido em organizar repetições em blocos, além do que o trabalho está sendo realizado em ambiente relativamente controlado, com irrigação regular, e luminosidade reduzida por tela sombrite, com plantas reunidas em uma única bancada/canteiro do mesmo viveiro telado e não estão sendo testadas ou ministradas diferentes condições ambientais ou tratamentos culturais às plantas. Cada planta foi considerada uma unidade experimental e os dados coletados foram submetidos à análise de variância *on ranks* (Kruskal Wallis) e ao teste de medianas de Dunn para dados que não atendem a distribuição normal (aplicativo Sigma Plot v. 11.2).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas descritas a seguir retomaram o crescimento das partes aéreas poucas semanas após o término dos tratamentos.

Nas contagens de estômatos em imagens registradas com aumento de 400X observou-se grande variabilidade (Figs. 1 e 2), para as duas doses de antimitótico, embora tenham sido cultivadas na mesma mesa e canteiro, lado a lado, no viveiro telado e tenham recebido os mesmos tratamentos culturais.

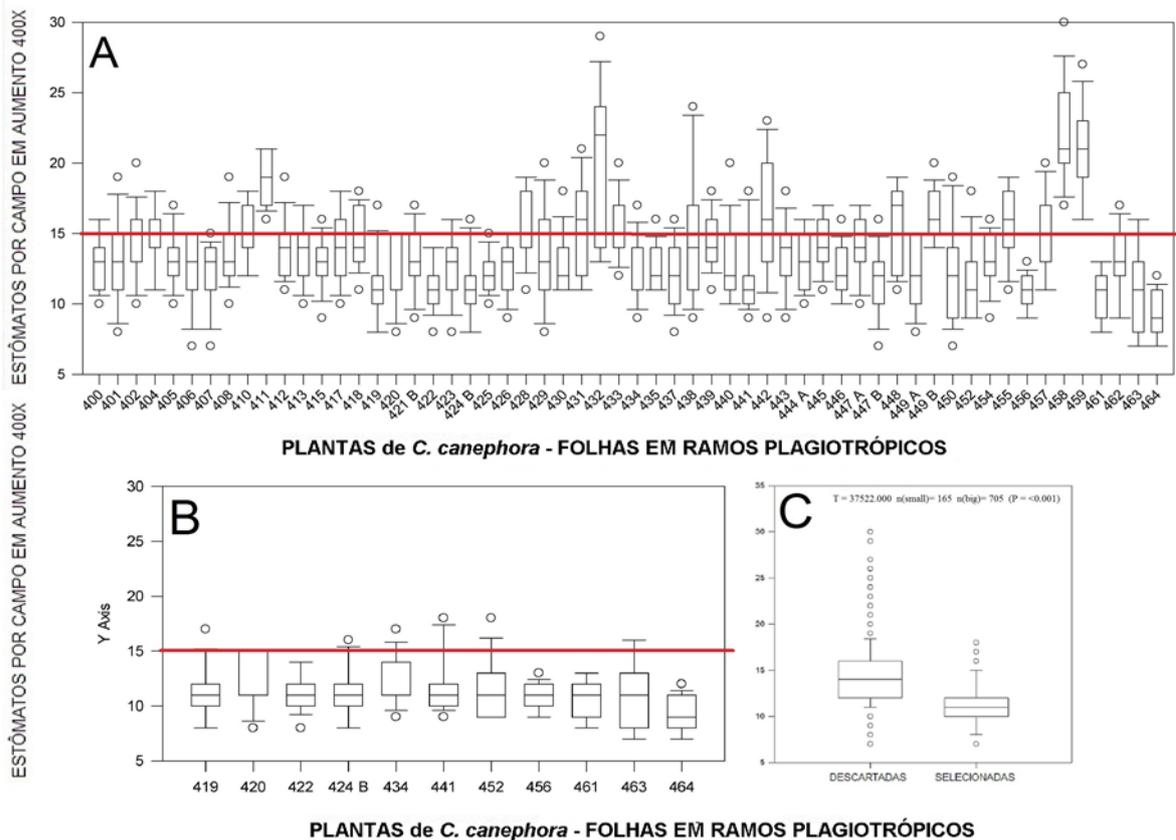
Figura 1. Resultados de análises de variância *on ranks* para o número de estômatos observado na superfície abaxial defolhas coletadas de ramos ortotrópicos de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis*, após tratamento das gemas apicais das plantas com orizalina. Cada planta é representada pela análise dos dados coletados em 15 imagens com 0,04 mm<sup>2</sup>. As linhas vermelhas contínuas em A e B representam a mediana do número de estômatos observados em folhas de *C. canephora* IAPAR ET0703 T13 não tratadas, com as mesmas dimensões e coletadas no mesmo viveiro telado onde são cultivadas as plantas tratadas com orizalina. As linhas pretas dentro dos boxes são as medianas e as barras horizontais superiores representam o limite superior (IC = 95%) das contagens realizadas para cada planta ou conjunto de plantas.



C. Resultado do Teste de Dunn para plantas selecionadas (B) x descartadas (a maioria das plantas em A).  
Fonte: Elaborado pelos autores

Devido à variabilidade, decidiu-se por utilizar um critério de eliminação drástico, preservando apenas as plantas em que 90-95% das imagens registradas para o limbo de folhas em ramos ortotrópicos (Fig. 1) e/ou plagiotrópicos (Fig. 2) apresentaram número de estômatos menor do que as medianas (linhas vermelhas nas Figs. 1 e 2) das imagens tomadas e avaliadas para folhas de plantas do mesmo clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora*, nativas, não tratadas, mantidas no mesmo ambiente. A pouca amplitude em torno das próprias medianas (Figs. 1b e 2b) também foi valorizada no momento da seleção das plantas.

Figura 2. Resultados de análises de variância *on ranks* para o número de estômatos observado na superfície abaxial de folhas coletadas de ramos plagiotrópicos de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis*, após tratamento das gemas apicais das plantas com orizalina. Cada planta é representada pela análise dos dados coletados em 15 imagens com 0,04mm<sup>2</sup>. As linhas vermelhas contínuas em A e B representam a mediana do número de estômatos observados em folhas de *C. canephora* IAPAR ET0703 T13 não tratadas, com as mesmas dimensões e coletadas no mesmo viveiro telado onde são cultivadas as plantas tratadas com orizalina. As linhas pretas dentro dos *boxes* são as medianas e as barras horizontais superiores representam o limite superior (IC = 95%) das contagens realizadas para cada planta ou conjunto de plantas. C. Resultado do Teste de Dunn para plantas selecionadas (B) x descartadas (a maioria das plantas em A).



Fonte: Elaborado pelos autores

Para folhas de ramos ortotrópicos, o critério descrito acima criou dois grupos de plantas significativamente ( $P \leq 0,001$ ) diferentes entre si (Fig. 1c). No entanto, devido à amplitude pequena dos dados, a diferença foi muito sutil, e as medianas foram 11 e 14 estômatos por imagem com 0,04mm<sup>2</sup>, para plantas selecionadas (Fig. 1b, 13 plantas) e descartadas (quase todas as outras plantas na Fig. 1a), respectivamente.

Decidiu-se por avaliar os dados registrados para folhas coletadas de ramos plagiotrópicos (Fig. 2) separadamente daquelas dos ortotrópicos (Fig. 1) porque observou-se diferença entre os dois tipos de amostras, tanto que boa parte das plantas na Fig. 2b foi selecionada por anomalias nos ramos plagiotrópicos mas não nos ortotrópicos. No entanto, para folhas de ramos plagiotrópicos, mais uma vez, o critério aplicado para a seleção foi efetivo em criar grupos de plantas significativamente ( $P \leq 0,001$ ) diferentes

entre si (Fig. 2c), com medianas surpreendentemente similares àquelas observadas para ramos ortotrópicos (Fig. 1c). Medianas de 11 e 14 estômatos por imagem de 0,04 mm<sup>2</sup>, para plantas selecionadas (Fig. 2b, 11 plantas) e descartadas (quase todas as outras plantas na Fig. 2a), respectivamente, foram encontradas.

Quatro das 13 plantas selecionadas pelo número reduzido de estômatos em folhas de ramos ortotrópicos examinados ao aumento de 400X foram tratadas com 80 mg.L<sup>-1</sup> de orizalina em ágar suplementado com citocinina, mas a diferença entre os tratamentos não foi significativa (Teste Z para proporções e taxas:  $z = 6,386 \times 10^{-017}$ ;  $P = 1,000$ ). Para os ramos plagiotrópicos, também foram selecionadas plantas tratadas com as duas concentrações, em número quase igual. Três entre 19 plantas (Fig. 1b + Fig. 2b) selecionadas apresentaram número reduzido de estômatos em folhas dos dois tipos de ramos, e também foram tratadas com 40 (planta 444) ou 80 mg.L<sup>-1</sup> (plantas 420 e 424) de orizalina em ágar suplementado com citocinina. Portanto, as concentrações testadas do antimetabólico produziram efeitos similares, e diferenças estatísticas não foram identificadas. Este resultado justifica e ilustra a decisão de trabalhar com plantas individuais, em comparações do tipo 'todas x todas', em lugar de criar blocos de repetições para cada concentração de orizalina.

Plantas tratadas com ágar suplementado com citocinina sem adição de orizalina também apresentaram redução no número de estômatos. Reguladores de crescimento, mais provavelmente auxinas, estão implicados na formação e distribuição de estômatos, na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* e em milho (Torii, 2023). A citocinina, antagonista da auxina em alguns processos metabólicos, adicionada ao ágar pode ter alterado a taxa de diferenciação de meristemóides (resmanescentes das células meristemáticas que entraram em diferenciação para gerar as folhas) que formaram estômatos nas folhas ou induzido alterações na taxa de divisões celulares nos meristemas. No primeiro caso, teríamos falsos positivos, com número de estômatos alterado, mas sem alterações cromossômicas. Falso positivos representados por folhas recém-diferenciadas que tivessem contato com a citocinina, estariam, muito provavelmente, ausentes de folhas geradas por meristemas apicais alocados vários nós acima daqueles que receberam o pulso de citocinina ou citocinina + orizalina em ágar, durante os tratamentos de quatro dias. Para evitar a interferência desse tipo de ocorrência, foram coletadas folhas de três nós caulinares, muitos meses após o fim dos tratamentos. No segundo caso, meristemas em contato com a citocinina teriam sofrido alterações cromossômicas em ausência de antimetabólico. Meristemas apicais estão sob constante interferência de diferentes

reguladores de crescimento, o que os conduz à manutenção do estado meristemático e/ou à diferenciação de folhas e flores, por exemplo. Alterações de ploidia em células de meristema são registradas em condições naturais (Evert, 2006) e é bastante plausível que tenham sido estimuladas pela presença da citocinina. Poliploides obtidos por ação da citocinina teriam a mesma utilidade daqueles gerados por ação de citocinina + orizalina, desde que fossem tetraploides estáveis.

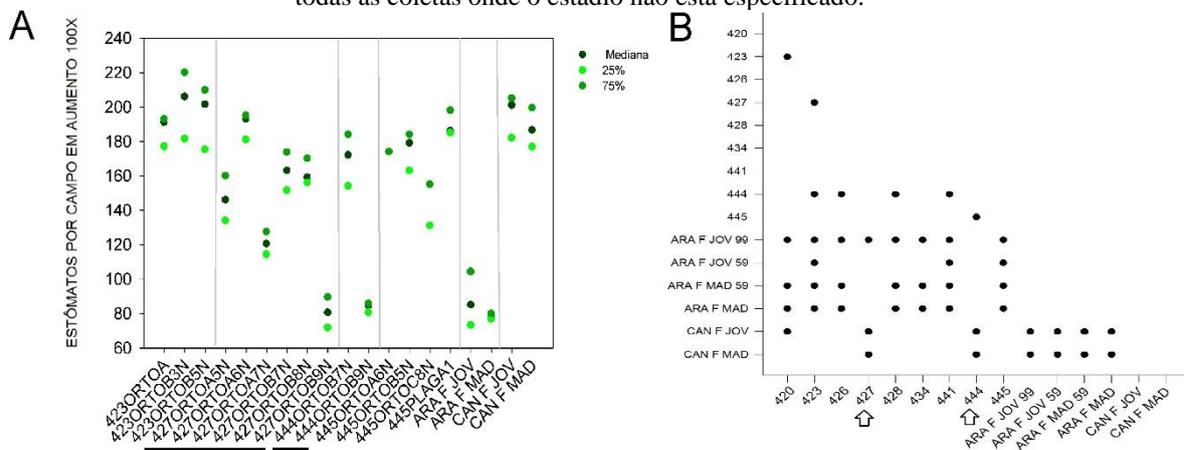
Em ambiente controlado, para folhas no mesmo estágio de desenvolvimento, o número de estômatos é, geralmente, estável, independentemente da altura da inserção de cada folha na planta (Gay e Hurd, 1974). As coletas de folhas para os procedimentos aqui descritos foram realizadas utilizando um gabarito de tamanho. Independente da espécie, a distribuição espacial dos estômatos ou das células meristemóides que gerarão estômatos maduros é, em grande parte, determinada nos estádios juvenis das folhas, antes mesmo que estejam completamente expostas, fora das brácteas de proteção das gemas. O que ocorre nos estádios seguintes do crescimento é a multiplicação de células epidérmicas comuns, para que, ao final, exista pelo menos uma célula epidérmica comum entre dois estômatos (Gay; Hurd, 1974; Torii, 2023). Esse processo pode ser descrito como 'diluição' dos estômatos na epiderme, e acompanha a expansão das folhas. Em muitas dicotiledôneas, nos estádios intermediários, a formação de novos estômatos fica concentrada na base das folhas, e cessa em folhas completamente expandidas (Torii, 2023). Para o presente trabalho, coletou-se todas as folhas com as mesmas dimensões, e considerou-se que estavam no mesmo estágio de desenvolvimento.

As imagens fotografadas para contagem de estômatos foram tomadas do terço medial das folhas, evitando as nervuras e bordas. No entanto, quando as folhas recém-diferenciadas são expostas ao ambiente, há ainda alguma plasticidade quanto à distribuição dos estômatos, o que atende às necessidades de adaptação ao ambiente. Assim, o coeficiente de variação para contagens de estômatos em 12 acessos de *Coffea* expostos à estações seca e úmida, e diferentes níveis de sombreamento foi 16,83% (Küfa; Burkhardt, 2011), e se aproxima da diferença entre medianas de plantas selecionadas e plantas descartadas nas contagens em aumento de 400X (Figs. 1c e 2c). Já que as plantas estão no viveiro telado há mais de um ano, considerou-se a possibilidade da interferência das diferenças sazonais, apesar de não estar perceptível em todas as plantas, porque dificultaria a seleção.

De qualquer forma, decidiu-se, para plantas selecionadas, realizar contagens de estômatos em registros fotográficos tomados sob aumento de 100X, com área de 0,6 mm<sup>2</sup>,

mais abrangentes e menos sujeitos a variações pontuais, para melhorar a chance de identificar os tetraploides estáveis, em um segundo ciclo de avaliações. A amplitude dos dados tomados nessas últimas condições é bem maior e evidencia com mais clareza inclusive as diferenças entre plantas não tratadas com antimitótico. Diferenças entre *C. canephora* (CAN, Fig. 3a), com medianas em torno de 200 estômatos nas imagens com 0,6 mm<sup>2</sup>, *C. arabica* (ARA, Fig. 3a) com cerca de 90 estômatos por imagem, são mais explícitas. No entanto, para plantas tratadas com orizalina, as diferenças continuam sutis.

Figura 3. Estômatos em folhas de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis* submetidas a um segundo ciclo de avaliações. As plantas foram a princípio selecionadas por apresentarem número reduzido de estômatos na superfície abaxial das folhas em exames sob aumento de 400X. No segundo ciclo de avaliações, os estômatos foram contados em imagens registradas utilizando aumento 100X. Em A, estão representadas as medianas e o primeiro e terceiro quartis das contagens para folhas coletadas de diversos nós de ramos ortotrópicos (ORTO) ou plagiotrópicos (PLAG) das plantas. O número do nó está indicado pelos algarismos que antecedem as letras N, iniciando da base. A variabilidade observada para nós e ramos das mesmas plantas foi surpreendentemente alta. Em B, o resultado do teste de Dunn para os dados apresentados em A. Cada ponto no gráfico de comparações múltiplas indica que a diferença entre os testandos posicionados nos eixos horizontal x vertical são significativas ( $P \leq 0,05$ ). As plantas 427 e 444 apesar da variabilidade observada entre folhas de ramos e nós diferentes em A, são significativamente diferentes de folhas jovens (CAN F JOV) ou maduras (CAN F MAD) de *C. canephora* IAPAR ET0703 T13 não tratada com o antimitótico e não diferem de folhas jovens ou maduras de *C. arabica* cv. IAPAR 59, de folhas jovens de *C. arabica* cv. IAPAR 99 ou da amostra composta por folhas maduras de *C. arabica* independente da cultivar (ARA F MAD). F JOV = 10 cm x 6 cm de comprimento x largura, e F MAD = folhas expandidas, com 15 x 8 cm de comprimento x largura, tamanho do gabarito utilizado para todas as coletas onde o estágio não está especificado.



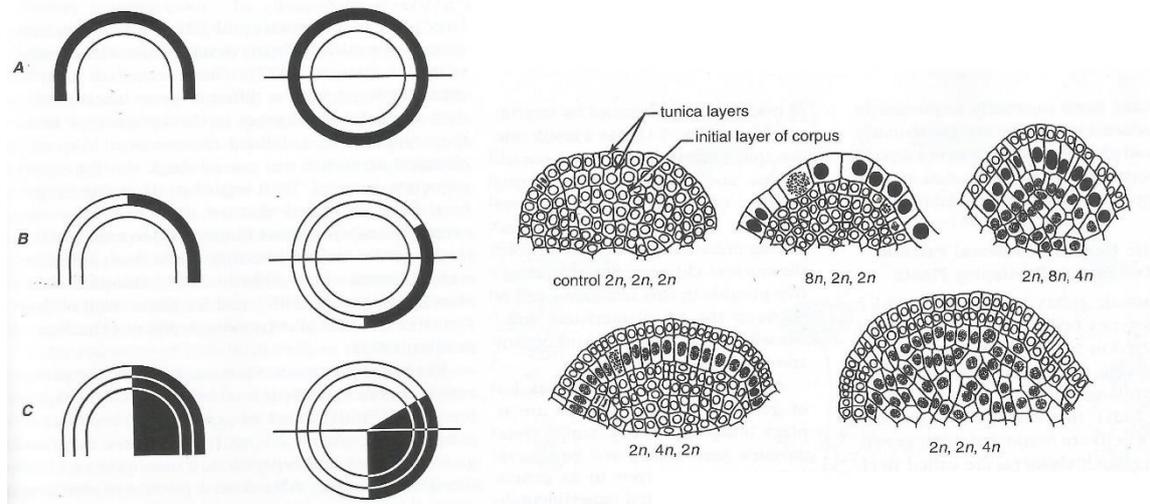
PLANTAS TRATADAS COM ANTIMITÓTICO E CONTROLES NATIVOS  
Fonte: Elaborado pelos autores

No segundo ciclo de seleção, as plantas 423, 441 e 445, foram descartadas porque não diferem de *C. canephora* em folhas jovens ou expandidas até o tamanho do gabarito (15 x 8 cm) e diferem de todas as cultivares de *C. arabica*, quanto ao número de estômatos em imagens com 0,6 mm<sup>2</sup> (Fig. 3b). As plantas 420, 426, 428 e 434, não diferem de *C. canephora* e diferem da maioria das variedades de *C. arabica*. E as plantas 427 e 444 são

estatisticamente diferentes de *C. canephora* não tratado e não diferem de *C. arabica* não tratado, com uma exceção (setas na Fig. 3b). No entanto, para estas duas últimas plantas, as contagens obtidas para folhas inseridas em diferentes nós dos ramos ortotrópicos foram surpreendentemente pouco uniformes (Fig. 3a, ramos e nós das plantas 427 e 444), o que é de difícil explicação.

As diferenças entre ramos de uma mesma planta tratada podem ser devidas à amplitude do efeito da orizalina e da citocinina nas células meristemáticas e às porções dos meristemas apicais que absorveram o antimitótico durante os quatro dias de tratamento, e que possam ter sofrido alterações de ploidia. Meristemas axilares localizados imediatamente abaixo dos apicais, por vezes por distâncias microscópicas, também podem ter absorvido o antimitótico e a citocinina. Há uma grande quantidade de arranjos possíveis para células meristemáticas com ploidias alteradas em meristemas nativos (Evert, 2006; Fig. 4) ou tratados com antimitóticos.

Figura 4. À esquerda, representações esquemáticas de meristemas com alterações de ploidia (partes pintadas em cor preta) em arranjos periclinais (A e B) e anticlinais (C). À direita, células com ploidias diferentes ( $2n$ ,  $4n$ ,  $8n$ ) em diversas citoquimeras ou mixoploides de *Datura*.



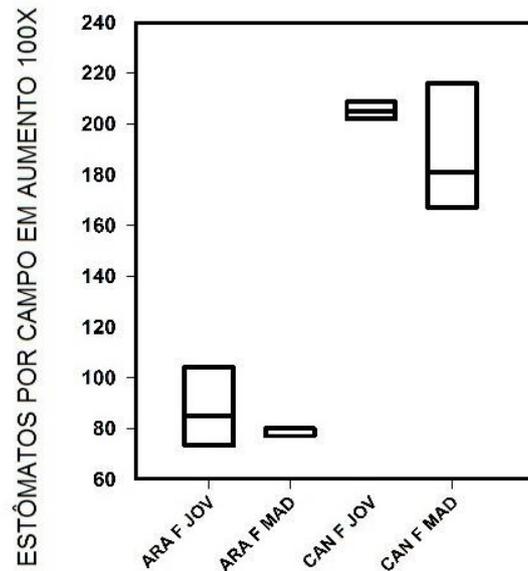
Fonte: Adaptado de EVERT, R. F. Meristems and Differentiation, 2006.

As consequências da diferenciação de citoquimeras podem ser plantas apresentando ploidias diferentes em diferentes folhas ou ramos, ou seja, poliploides instáveis. No entanto, é plausível considerar que quanto maior a proporção de células com ploidias alteradas nos meristemas, maiores as probabilidades de obtenção de órgãos vegetativos poliploidizados. Idealmente, maior a probabilidade de obtenção de plantas em que todos os órgãos/células produzidos após os tratamentos com os antimitóticos estejam tetraploidizados (tetraploides estáveis,  $2n = 4x = 44$ ) e aptos a gerarem gametas

( $n = 2x = 22$ ) compatíveis com os gametas de *C. arabica*. Para eliminar mixoploides (plantas com diversas ploidias) e artefatos com alterações nas células do limbo de folhas recém diferenciadas mas não no número de cromossomas, foram coletadas folhas inseridas em três nós caulinares de cada tipo de ramo, e ainda assim houve muita variabilidade.

Para a planta 427, por exemplo, folhas coletadas dos nós mais apicais dos dois ramos ortotrópicos, em junho/julho de 2024, apresentaram medianas iguais a 120,5 e 80,05 estômatos em  $0,6 \text{ mm}^2$  (Fig. 3a, 427ORTOA7N e 427ORTOB9N). Para investigar a estabilidade do que parecia ser um tetraploide, principalmente o ramo ortotrópico designado como B (ORTOB), folhas inseridas nos nós subapicais foram coletadas para exame. Esperava-se obter contagens de estômatos iguais ou menores aos cerca de 80 contados para a folha do nó apical, porque em nós subapicais as folhas são necessariamente mais maduras (Fig. 5), mesmo quando apresentam as dimensões do gabarito. Isto não verificou-se. Ao revés da teoria, as folhas mais velhas, dos nós subapicais (Fig. 3a, 427ORTOA5-6N e 427ORTOB7-8N) apresentaram números de estômatos altos, desde 120 até 190. Esses resultados não seguem padrões que possam ser correlacionados com estádios de desenvolvimento, a menos que o cafeeiro precise de um modelo diferente para diferenciação de estômatos, em que a metade ou mais deles amadureça em folhas expandidas. Ainda assim, para a plantas 427, não foram identificados meristemoides na folha do nó apical, recém-expandida (mediana de 80,5 estômatos para 427ORTOB9N, Figs. 3a e 6a) que pudessem gerar estômatos maduros adicionais em número suficiente para atingir a contagem da folha do oitavo nó caulinar (mediana de 160 estômatos para 427ORTOB8N, Fig. 3a) em alguns dias, enquanto a folha envelhecia. Narrativa similar se aplica ao exame da planta 444.

Figura 5. Estômatos em folhas de cafeeiros nativos e tratados com orizalina, crescendo no mesmo viveiro telado. O número de estômatos em imagens registradas utilizando o aumento de 100X do microscópio (imagem medindo 0,6 mm<sup>2</sup>) foi contado para folhas jovens (F JOV) e maduras (F MAD) do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis*, para folhas jovens e maduras de *C. arabica*. Observou-se que folhas maduras de plantas nativas, não tratadas com o antimetabólito, tendem a ter número menor de estômatos do que folhas jovens, não completamente expandidas, como descreve a literatura especializada para outras espécies. F JOV = 10 cm x 6 cm de comprimento x largura, e F MAD = folhas expandidas, com 15 x 8 cm de comprimento x largura, tamanho do gabarito utilizado para todas as coletas onde o estágio não está especificado.

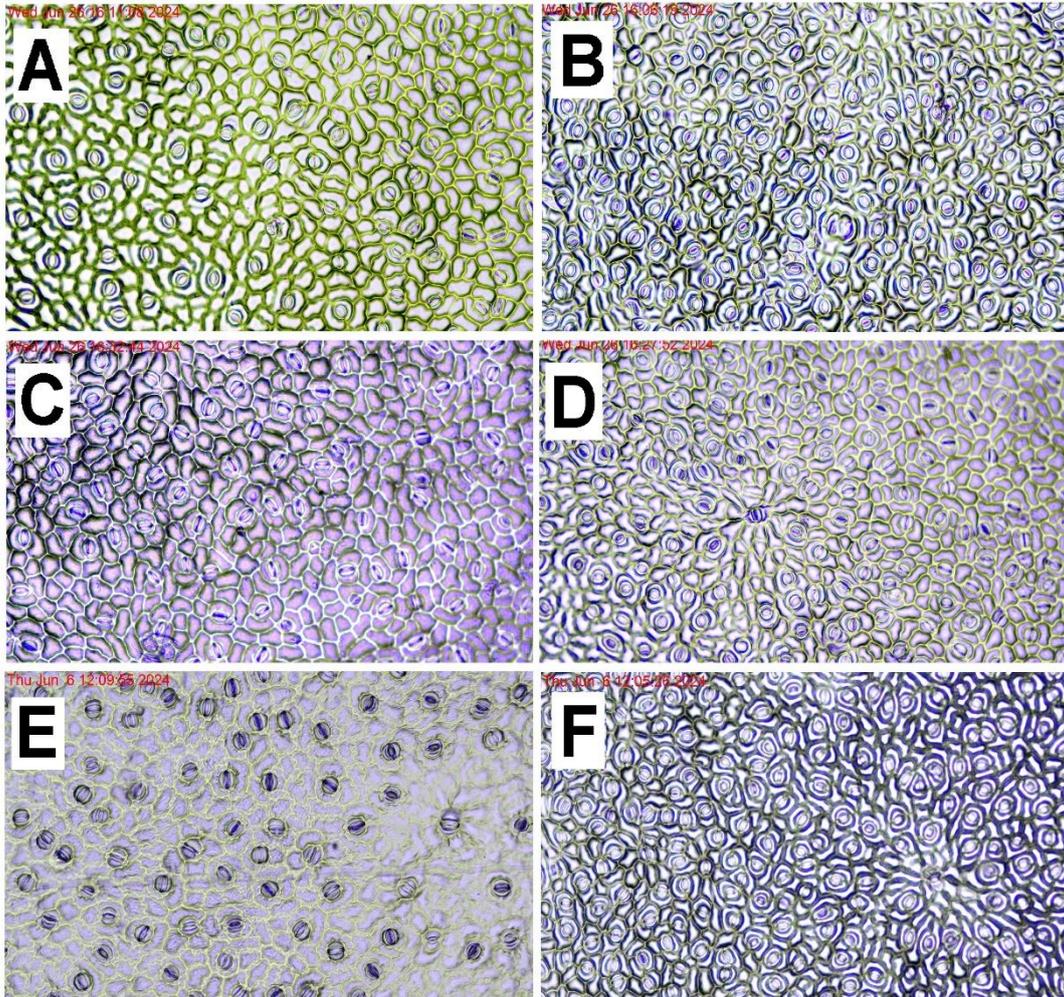


Fonte: Elaborado pelos autores

As imagens são auto-explicativas e, sem necessidade de contagens, observa-se que há menos estômatos em folhas dos nós apicais (Fig. 3a, 427ORTOA7N e 427ORTOB9N) das plantas 427 e 444 (Fig. 6a e 6c), que são semelhantes a folhas de *C. arabica* para esta característica (Fig. 6e), do que em folhas de nós subapicais das mesmas plantas (Fig. 6b e 6d). Folhas de nós subapicais assemelham-se, quanto ao número de estômatos, às folhas de mesmas dimensões tomadas de plantas do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis* que não receberam tratamento algum, mas cresceram no mesmo viveiro telado (Fig. 6f). Na Fig. 6, vale a pena observar ainda que as células epidérmicas comuns do limbo abaxial de *C. arabica* são dendríticas, com paredes celulares muito irregulares, enquanto as células epidérmicas das folhas de

*C. canephora*, tratadas ou não com antimetabólitos, são regulares e bastante mais retas. As folhas dos nós apicais das plantas 427 e 444 (Fig. 6a e 6c) apresentam características das duas espécies, ou seja, frequência baixa de estômatos grandes, em meio a células epidérmicas comuns com paredes retas, o que é condição rara e indicadora de serem possíveis tetraploides. Resta concluir sobre tanta instabilidade, em nós tão distantes daqueles que foram originalmente tratados com a citocinina e a orizalina.

Figura 6. Estômatos em folhas de cafeeiros nativos e tratados com orizalina, crescendo no mesmo viveiro telado. A-B:folhas dos nós apical (427ORTOB9N) e subapical (427ORTOB7N) do ramo ortotrópico B da planta 427 do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* resistente a *M. paranaensis*. C-D: folhas dos nós apical (444ORTOB9N) e subapical (444ORTOB7N) da planta 444, ambas tratadas com 40 mg.L<sup>-1</sup> de orizalina em ágar suplementado com citocinina. E: folha de *C. arabica* cv. IAPAR 59 nativa. F: folha do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* nativa,não tratada. Observar a parede celular de *C. arabica* que é dendrítica. Todas as imagens foram tomadas de impressões em esmalte de unhas, utilizando aumento de 100X, em microscópio óptico.

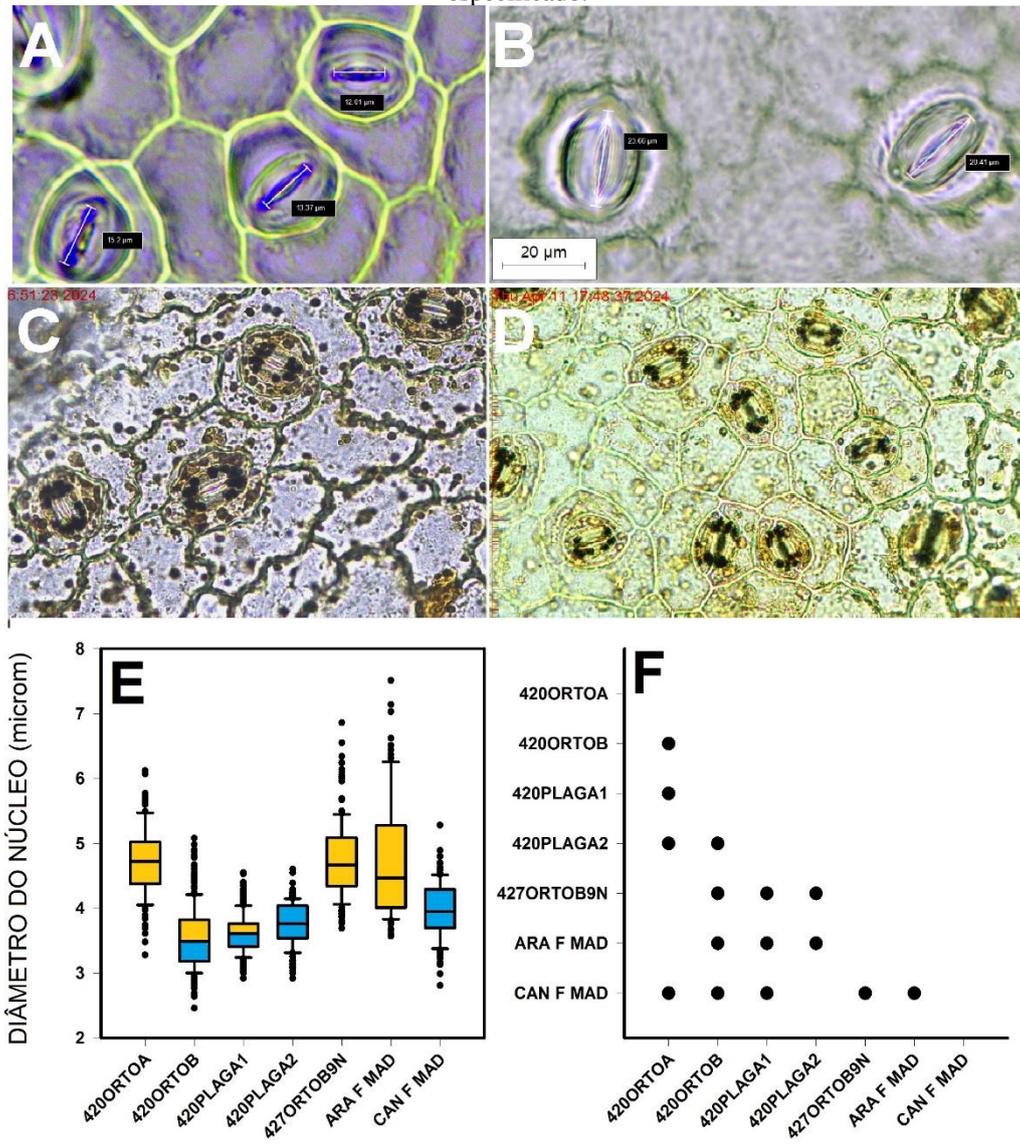


Fonte: Elaborado pelos autores

Seguimos a investigação utilizando outros aferidores indiretos da ploidia, como o comprimento da abertura estomática (Figs. 7a-b), o número de cloroplastos em células guarda (Figs. 7c-d) e o diâmetro dos núcleos em células epidérmicas (Fig. 7e-f). Entre estas três variáveis, o número de cloroplastos é a que oferece mais dificuldade de acesso, principalmente porque é preciso destacar a epiderme abaxial das folhas, mas também porque os cloroplastos tem se apresentado muito sobrepostos e tem sido difícil realizar contagens confiáveis. O diâmetro dos núcleos tem complementado a contagem de estômatos, mas não perfeitamente. Teoricamente, o tamanho dos núcleos é maior quando há mais cromossomas contidos dentro dele (Benett, 1987). Assim, em alguns ramos das

plantas 420 e 427 (Fig. 7e-f, 420ORTOA e 427ORTOB9N), as folhas apresentam núcleos com diâmetros similares aos de *C. arabica* (Fig. 7e-f, ARA F MAD, *boxes* em cor laranja) e maiores do que os de IAPAR ET0703 T13 não tratado (Fig. 7e-f, CAN F MAD, *boxes* em cor azul). Essas duas plantas 420 e 427 também diferem de *C. canephora* não tratado quanto ao número de estômatos, contados em imagens com áreas de 0,04 mm<sup>2</sup> e 0,6 mm<sup>2</sup> (Figs. 1b e 3b).

Figura 7. Estômatos em folhas de cafeeiros nativos e tratados com orizalina, crescendo no mesmo viveiro telado. Medidas das aberturas estomáticas em A: folha do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* nativa, não tratada. Observar que a parede das células epidérmicas comuns de *C. canephora* é reta. B: folha de *C. arabica* cv. IAPAR 59 nativa. Observar que a parede das células epidérmicas comuns de *C. arabica* é dendrítica. Cloroplastos corados com lugol a 2% (estruturas mais ou menos esférica coradas em preto) nas células guarda dos estômatos em C, folha de *C. arabica* cv. IAPAR 59 nativa, não tratada e D, folha do clone IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* não tratada. E: resultado da análise de variância *on ranks* dos diâmetros de núcleos corados com carmim acético a 0,5%, em folhas dos ramos de IAPAR ET0703 T13 de *C. canephora* tratadas e não tratadas (CAN F MAD) com orizalina e de *C. arabica* cv. IAPAR 59 (ARA F MAD) não tratada. F: as medianas em E foram testadas quanto à existência de diferenças significativas utilizando o teste de contraste de medianas de Dunn. Cada ponto no gráfico de comparações múltiplas de medianas indica que a diferença entre os testandos posicionados nos eixos horizontal x vertical é significativa ( $P \leq 0,05$ ). F MAD = folhas expandidas, com 15 x 8 cm de comprimento x largura, tamanho do gabarito utilizado para todas as coletas onde o estágio não está especificado.



Fonte: Elaborado pelos autores

Em julho de 2024 as plantas foram transferidas para pacotes com capacidade para 5 quilos de substrato, e vão adquirir reservas para desenvolver tecidos novos, durante os próximos meses. Pretendemos clonar ramos anômalos, examinar os clones contando

estômatos. Passando por todas as etapas de seleção por aferidores indiretos, alguns clones serão destinados às preparações citogenéticas, porque estas preparações serão destrutivas de meristemas caulinares.

#### 4 CONCLUSÕES

A orizalina a 40 ou 80 mg.L<sup>-1</sup> em ágar suplementado com citocinina em tratamentos com duração de quatro dias consecutivos pode induzir redução no número de estômatos na superfície abaxial das folhas, e aumento do diâmetro dos núcleos das mesmas plantas de *C. canephora*, características que podem ser usadas como aferidores indiretos de ploidia, indicadores que são do aumento no número de cromossomos. No entanto, para verificar se as anomalias resultantes destes tratamentos são estáveis e uniformes, é preciso cultivar as plantas por tempo suficiente para coletar folhas expandidas inseridas em vários ramos e nós, até que os valores anômalos registrados estabilizem ou quimerismo se confirme.

#### AGRADECIMENTOS

Embrapa Café, pelo financiamento dos experimentos, que são parte da SI 10.18.20.035.00.05 e pela Bolsa para Graduados concedida a Ana Paula Marques Ferreira. A José Alves Azevedo, Alceu Fenandes e Júlio Tenório de Oliveira pelo apoio para ministrar tratamentos culturais às plantas.

## REFERÊNCIAS

ANGELO, P. C. S.; PEREIRA, L. F. P.; SERA, G. H.; SERA, T. Coffee microspore cultivation to attain doubled-haploid plantlets. *Acta Horticulturae*, v. 1359, p.123- 130, 2023.

ARANTES, T.; ANGELO, P. C. S.; SERA, G. H. Tetraploidia para melhorar a compatibilidade reprodutiva de cafeeiros resistentes a nematoides. *In: XXX Seminário do Programa de Iniciação Científica e XII Seminário do Programa em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - 2022*, 2022, Londrina - PR. Resumos do XXX Seminário do Programa de Iniciação Científica e XII Seminário do Programa em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - 2022. Londrina - PR: IDR-Paraná, 2022a. p.36

ARANTES, T.; TAKAGUI, F. H., SERA, G. H.; ANGELO, P. C. S. Estimativa da ploidia em café usando análise estomática é confiável? *In: II Workshop de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina*, 2022, Londrina - PR. Anais do II Workshop de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. Londrina - PR: Universidade Estadual de Londrina - UEL, 2022b.

BENNET, M. D. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist*, v. 106, p. 177-200, 1987.

CARVALHO, A.; COSTA, W. A.; FAZUOLI, L. C. Auto-incompatibilidade, produtividade, ocorrência de sementes do tipo moca e mudas anormais no Café Icatu. *Revista Científica do Instituto Agrônomo*. Campinas, v. 42, n. 14, p. 157-169, 1983.

DÓSTAL, V.; LIBUSOVÁ, L. Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma*, v. 251, n. 5, p. 991–1005, 2014.

EVERT, R. F. Meristems and Differentiation. *In: Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body - Their Structure, Function, and Development*. Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2006. pp. 103-131.

FENG, H.; WANG, M.; CONG, R.; DAI, S. Colchicine-and trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa multiflora* Thunb. var. *inermis* and *Rosa roxburghii* f. *normalis*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Nova York, v. 97, p. 279-287, 2016.

GASPARINI, A. K. S.; ANGELO, P. C. S.; SERA, G. H. Indução de poliploidia para desenvolver novos genótipos de cafeeiro resistentes a nematoides. *In: XXIX Seminário do Programa de Iniciação Científica e XI Seminário do Programa em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - 2021*, 2021, Londrina - PR. Resumos do XXIX Seminário do Programa de Iniciação Científica e XI Seminário do Programa em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - 2021. Londrina - PR: IDR-Paraná, 2021a. p.50.

GASPARINI, A. K. S.; CINTRA, L. A.; CARDUCCI, F. C.; SHIGUEOKA, L. H.; SERA, G. H.; SERA, T.; ANGELO, P. C. S.. Indução in vivo de poliploidia em *Coffea canephora* resistente a nematoides. *In: 73ª Reunião Anual da SBPC*, 2021. Anais da

73a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, 2021b. p.RESUMO 3110.

KUFA, T.; BURKHARDT, J. Stomatal Characteristics in Arabica Coffee Germplasm Accessions under Contrasting Environments at Jimma, Southwestern Ethiopia. **International Journal of Botany**, Ethiopia, v. 7, p. 63-72, 2011.

MEDINA-FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; MEDINA, D. M. Germoplasma de *Coffea racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, v. 36, p. XLIII-XLVI, 1977.

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

MISHRA, M. K. Stomatal characteristics at different cloudy levels in *Coffea* L. **Annals of Botany**, India, v. 80, p. 689-692, 1997.

MONDIN, M.; SILVA, P. A. K. X. M.; LATADO, R. R.; FILHO, F. A. A. M. *In vitro* induction and regeneration of tetraploids and mixoploids of two cassava cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa, v. 18, p. 176-183, 2018.

PODWYSZYNSKA, M.; SOWIK, I.; MACHLANSKA, A.; KRUCZYNSKA, D.; DYKI, B. *In vitro* tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. **Scientia Horticulturae**, Polônia, v. 226, p. 379-388, 2017.

GAY, R. G.; HURD, A. P. The influence of light on stomatal density in tomato. **New Phytologist**, v75, p. 37-46, 1975.

HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Australia, v.40, p. 887-896, 1992.

QUINAGLIA, J. P. M.; SHIGUEOKA, L. H.; ANGELO, P. C. S. Reação de embriões zigóticos imaturos de *Coffea canephora* aos antimitóticos orizalina e colchicina. In: **XXXI Seminário do Programa de Iniciação Científica do IDR-Paraná - 2023**, 2023, Londrina. Anais do XXXI Seminário do Programa de Iniciação Científica do IDR-Paraná. Londrina - Paraná: IDR-Paraná, 2023. p.36

SCHULZE, J. A.; CONTRERAS, R. N. *In vivo* chromosome doubling of *Prunus lusitanica* and preliminary morphological observations. **HortScience**, Oregon, v. 52, p. 332-337, 2017.

SERA, G. H.; MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SHIGUEOKA, L. H.; SILVA, S. A.; SERA, T. IPR 106: new Arabica coffee cultivar, resistant to some *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognitanematode* populations of Paraná. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa, v. 20, e305520317, 2020.

SHIGUEOKA, L. H.; FONSECA, I. C. B.; SERA, G. H.; SERA, T.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F.; MACHADO, A. C. Z. Virulence and reproductive fitness of

*Meloidogyne paranaensis* field populations in coffee genotypes. **Plant Disease**, Londrina, v. 106, p. 2618-2624, 2022.

SREENIVASAN, M. S.; PRAKASH, M. K.; MISHRA, M. K. Evaluation of some indirect ploidy indicators in *Coffea*. **Café Cacao Thé**, v. XXXVI, p. 199-205, 1992.

TORII, K. U. Stomatal development in the context of epidermal tissues. **Annals of Botany**, v. 128, p. 137-148, 2021. van DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, v. 88, p.25-34, 1996.