

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XV-MICROSPOROGÊNESE EM *COFFEA ARABICA* L. (1)

A. J. T. MENDES

Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1-INTRODUÇÃO

O estudo dos detalhes da microsporogênese das principais espécies de *Coffea* cresce em importância à medida que se procura elucidar a composição dos híbridos interespecíficos e das várias formas de café, com número duplicado de cromossômios.

Quase nada se encontra na literatura sobre as particularidades da microsporogênese de *Coffea*. Em vista disso, resolveu-se realizar, na Secção de Citologia, uma série de observações sobre o assunto, nas principais espécies comerciais de café, quais sejam: *Coffea arabica* L. (1), *Coffea canephora* Pierre ex Frœhner (2) e *Coffea Dewevrei* De Wild. et Th. Dur.

Neste trabalho são apresentados apenas os dados referentes à microsporogênese da espécie *C. arabica*, a mais conhecida do ponto de vista genético, e a de maior importância econômica.

2-MATERIAL E MÉTODO

Para a realização desses estudos foi escolhida a variedade *semperflorens* (*Coffea arabica* L. var. *semperflorens* K. M. C.). Esta variedade tem a particularidade de florescer várias vezes no ano, permitindo a colheita de material em várias épocas. Algumas observações foram também realizadas na variedade *caturra*, da mesma espécie (*Coffea arabica* L. var. *caturra* K. M. C.).

Os botões foram colhidos durante os meses de abril e maio de 1948 e 1949, em fixador constituído por uma mistura de álcool absoluto (3 partes) e ácido acético (1 parte). Algumas vezes foi usado um fixador contendo clorofórmio, e com a seguinte constituição: álcool absoluto 6 partes, ácido acético 3 partes e clorofórmio 1 parte. O material foi conservado em refrigerador durante cerca de dois meses, enquanto duraram os exames, verificando-se a sua melhor conservação nesse ambiente frio do que no ambiente normal de laboratório. As lâminas foram preparadas pelo método do carmim acético. Para o estudo do tubo polínico e da gametogênese, o pólen foi semeado em lâminas preparadas com ágar a 0,5% e sacarose a 10% em câmara úmida. Quando a germinação do pólen se apresentava regular, o que ocorre depois de algumas horas, as lâminas eram coloridas com carmim acético, permitindo observação bastante satisfatória das diversas fases.

(1) Trabalho apresentado à Primeira Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em Campinas, de 1 a 15 de outubro de 1949.

3-MARCHA DA MICROSPOROGÊNESE

Os microsporocitos, nos botões novos, em lâminas preparadas pelo carmin acético, mostram-se intimamente agrupados, colorindo-se com dificuldade. Durante dias seguidos, o material apresenta-se dessa maneira. Em certo momento, porém, que provávelmente coincide com uma combinação favorável de umidade e calor, os botões tomam um rápido desenvolvimento. Os microsporocitos desprendem-se, então, com maior facilidade, apresentando, bem evidente, um nucléolo grande, dentro de um núcleo claro, em contraste com um citoplasma escuro. Os filamentos cromáticos colorem-se fracamente, percebendo-se, no entanto, que se espalham por todo o núcleo. A partir de um momento, em que êles se enovelam ao lado do nucléolo para depois se espalharem de novo, a coloração é mais intensa. Ao se abrir o enovelamento (fig. 1-A), os cromossômios se apresentam como longo colar de contas irregulares, com secções mais finas e pouco coloridas, que ficam despercebidas no citoplasma. Êste confunde-se com o carioplasma, colorindo-se fracamente. O nucléolo, ao qual se vêm ligar alguns dos cromossômios, descolore-se gradualmente, apresentando muitas vèzes vários vacúolos mais claros. À medida que os cromossômios se desenrolam, torna-se clara a sua individualidade: são em número de 22 (figs. 1-B e C), e em cada um dêles se nota um centrômero bem evidente, que não se colore absolutamente, e se acha ladeado por duas zonas bem coloridas (fig. 1-D). A estas segue, de um lado e de outro, uma série de regiões picnóticas (os cromômeros), separadas por zonas mais claras. As extremidades dos cromossômios são pouco coloridas, desprovidas dêsses cromômeros e acabam confundindo-se com o próprio protoplasma. Em alguns cromossômios percebe-se, principalmente nas regiões claras, que êles são de constituição dupla. Dêste ponto até a metáfase I, as fases se sucedem com relativa rapidez. Os filamentos se encurtam e engrossam progressivamente. Em "diplotene", quando os pares se abrem largamente, êles já estão bem curtos (fig. 1-E), não se percebendo mais a região do centrômero. O cromossômio todo, nesta fase, não tem uma estrutura bem delineada. Em "diakinese" (fig. 1-F), os cromossômios apresentam-se em 22 pares, cada um dêles constituído de dois elementos, que se repelem pela parte escura (constituída pela reunião dos cromômeros e onde se situa o centrômero, que já não é visível) e se unem pela parte clara. Esta parte clara constitui como que uma "cauda", de um lado ou de ambos os lados do cromossômio. Ê evidente a inexistência de quiasmas no corpo pròpriamente dito do cromossômio (a parte bem colorida). Os elementos de cada par só se unem pela parte que mal se colore. Assim, quando o cromossômio é constituído de um corpo e uma cauda, a união se dá de um só lado do centrômero; quando o corpo é ladeado por duas caudas, a união se dá em ambos os lados. Podem-se contar os quiasmas: quase todos os cromossômios apresentam um quiasma em um dos prolongamentos, ou dois quiasmas, sendo um em cada prolongamento. Dois a quatro cromossômios apresentam um só quiasma em uma das caudas e dois ou três quiasmas na outra cauda, mais longa. Um par de cromossômios (às vèzes aparentemente 2 ou 3) une-se ao nucléolo. O nucléolo torna-se cada vez mais claro e desaparece completamente em prometáfase (fig. 1-G), quando

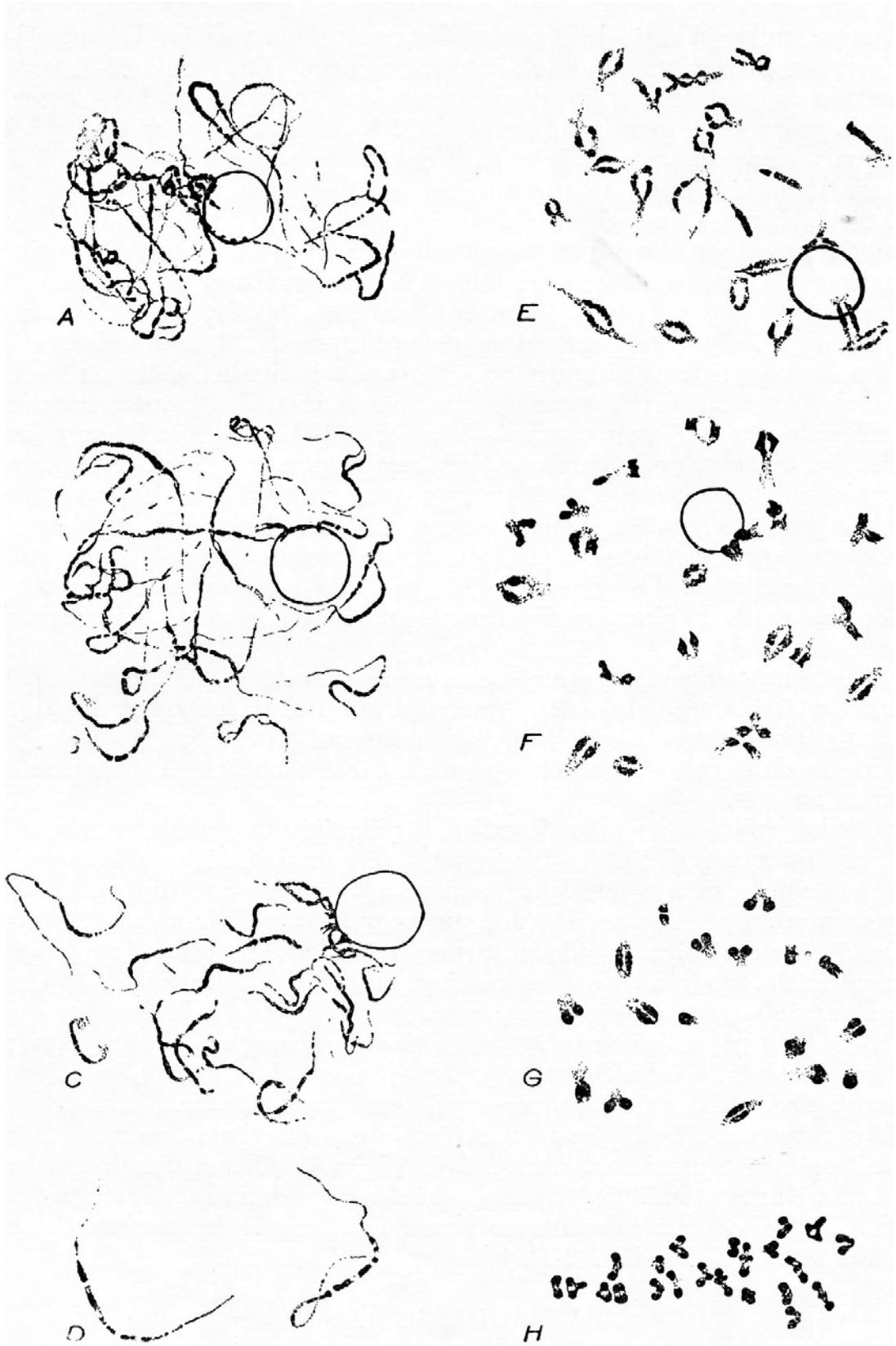


FIGURA 1.- Diversas fases da divisão meiótica na variedade *sempreflorens* (1070x).
 A — Condição em anafitene; B e C — paquitenes em dois estágios; D — dois cromossômios em paquitene; E — diplotene; F — diaquinese; G — prometáfase com 17 cromossômios; H — metáfase I.

os cromossômios já estão bem contraídos, mas ainda mostrando muito bem seu corpo escuro e sua cauda clara, porém curta. Em metáfase I, os cromossômios atingem o máximo de contração, mostrando-se os dois elementos de cada par estreitamente unidos. Há 22 bivalentes na placa metafásica, nos quais ainda se podem observar e contar os quiasmas (fig. 1-H). Em anáfase I, os bivalentes se separam e vão 22 univalentes para cada pólo (fig. 2-A). Em telófase (fig. 2-B), os cromossômios se colorem mais fracamente, tornando-se como que vacuolizados. Nesta fase já se pode perceber bem as regiões dos centrômeros. Não há, praticamente, uma intercinese; os cromossômios contraem-se de novo e a anáfase II se processa, imediatamente (fig. 2-C), podendo-se contar quatro grupos de 22 cromossômios. Ao mesmo tempo que estes cromossômios perdem a individualidade em telófase II, o citoplasma se divide e cada grupo de cromossômios passa a constituir o núcleo de um dos quatro micrósporos (fig. 2-D). Os micrósporos ficam unidos em tétrades por algum tempo e, finalmente, se soltam. Apresentam um único núcleo, que logo a seguir passa por uma mitose, donde resultam dois núcleos com $n=22$ cromossômios (fig. 2-E). Um desses núcleos é o reprodutivo, que se sobressai pela sua cromaticidade em relação ao outro, o núcleo vegetativo. Os grãos de pólen estão assim completos. Isto ocorre vários dias antes da abertura das flores e, portanto, antes da deiscência das anteras.

Tanto na variedade *semperflorens*, como na *caturra*, os grãos de pólen se apresentam binucleados três a quatro dias antes da abertura das flores, e assim permanecem até a deiscência das anteras. Nesta ocasião estão perfeitamente desenvolvidos, tanto que muitos deles chegam a germinar nas próprias anteras.

Os dois núcleos do grão de pólen, a princípio de igual tamanho, são, logo, perfeitamente distintos. O vegetativo é grande, esférico e homogêneo, mais parecido com um nucléolo; mal se colore com o carmim acético e, em seu interior, percebe-se, às vezes, um pequeno nucléolo. O núcleo reprodutivo se concentra, tornando-se menor, reticulado e também semelhante a um nucléolo. Este núcleo se colore bem, localiza-se na periferia da célula e, em seu redor, destaca-se uma porção de citoplasma de forma lenticular (fig. 2-F). No pólen deiscente não se distingue separação do citoplasma; o núcleo reprodutivo é fusiforme (fig. 2-G); raramente, porém, pode apresentar-se dividido em dois pequenos núcleos, arredondados (fig. 2-H).

Ao germinar o pólen, os núcleos caminham pelo tubo polínico, procurando localizar-se próximo à extremidade (fig. 2-I). Nessa marcha, pode-se encontrar, à frente, indiferentemente o núcleo reprodutivo ou o núcleo vegetativo. No tubo polínico, o núcleo reprodutivo se divide, produzindo dois gametas arredondados (fig. 2-J).

4-PARTICULARIDADES

De diaquinese a metáfase I podem-se fazer observações sobre o pareamento dos cromossômios e sobre o número de quiasmas por bivalente. Tendo-se analisado, na var. *semperflorens*, o pareamento em trinta e nove células, observou-se que trinta e seis células apresentavam 22 bivalentes, não se

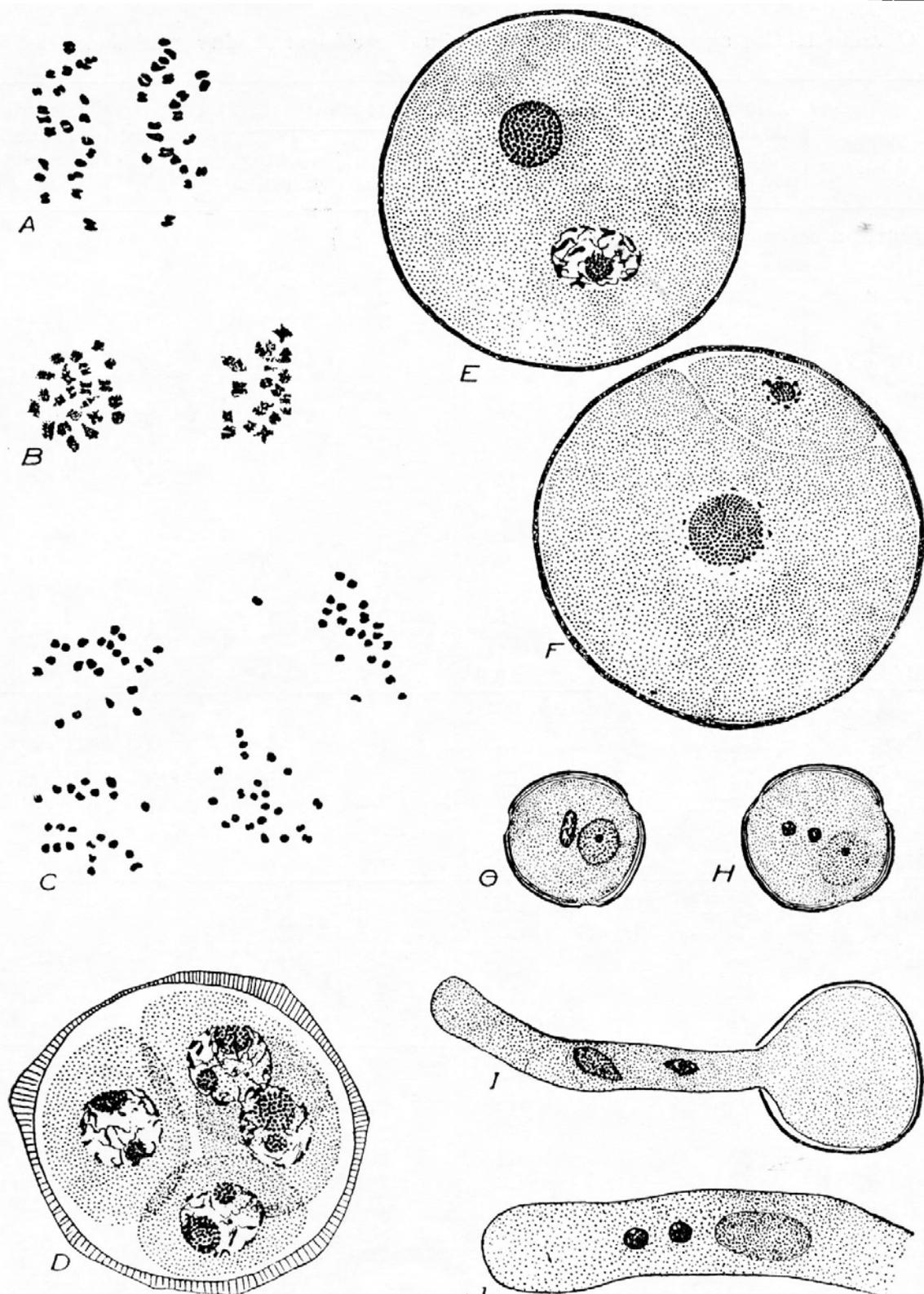


FIGURA 2.- A a E — Fase da divisão meiótica e formação do microsporo na variedade *semperflorens*, (1070 x). A — anáfase I; B — telófase I; C — anáfase II; D — tétrade de grãos de pólen; E — grão de pólen três dias antes da deiscência. F a J — Formação dos gametas masculinos na variedade *caturra*. F — grão de pólen maduro (1070 x); G — grão de pólen deiscente (425 x); H — grão de pólen deiscente com o núcleo reprodutivo já dividido (425 x); I — pólen germinado (535 x); J — detalhe da extremidade de um tubo polínico (950 x).

QUADRO 1.-Contagem de quiasmas em células meióticas de duas variedades de *Coffea arabica* L.

Células	Número de bivalentes por célula	Número de bivalentes com				Total de quiasmas por célula	Número de quiasmas por bivalente
		Um quiasma	Dois quiasmas	Três quiasmas	Quatro quiasmas		
VARIEDADE <i>semperflorens</i> — EM DIAQUINESE							
1	22	7	11	2	2	43	1,96
2	22	7	12	2	1	41	1,86
3	22	7	12	3	0	40	1,82
4	22	7	13	2	0	39	1,77
5	22	7	13	2	0	39	1,77
6	22	8	11	3	0	39	1,77
7	22	9	11	2	0	37	1,68
8	22	10	9	3	0	37	1,68
9	22	10	10	2	0	36	1,64
10	22	10	10	2	0	36	1,64
11	21	9	9	3	0	36	1,71
12	21	10	9	2	0	34	1,62
13	22	15	4	3	0	32	1,46
14	22	13	9	0	0	31	1,41
15	22	15	7	0	0	29	1,32
Médias ..	21,9	9,6	10,0	2,1	0,2	36,6	1,67
VARIEDADE <i>semperflorens</i> — EM METÁFASE I							
1	22	6	12	4	0	42	1,91
2	22	7	12	3	0	40	1,82
3	22	8	12	2	0	38	1,73
4	22	16	5	1	0	29	1,32
Médias ..	22	9,2	10,3	2,5	0	37,3	1,69
VARIEDADE <i>caturrea</i> — EM DIAQUINESE							
1	22	6	15	1	0	39	1,77
2	22	8	12	2	0	38	1,73
3	22	9	11	0	2	39	1,77
Médias ..	22	7,7	12,7	1,0	0,7	38,7	1,75
VARIEDADE <i>caturrea</i> — EM METÁFASE I							
1	22	4	16	2	0	42	1,91
2	22	6	14	2	0	40	1,82
3	22	6	14	2	0	40	1,82
4	22	7	13	2	0	39	1,77
5	22	7	13	2	0	39	1,77
6	22	9	11	2	0	37	1,68
7	22	11	9	2	0	35	1,59
8	22	11	9	2	0	35	1,59
9	22	11	9	2	0	35	1,59
10	22	11	9	2	0	35	1,59
11	22	12	8	2	0	34	1,55
12	22	12	8	2	0	34	1,55
13	22	12	8	2	0	34	1,55
Médias ..	22	9,2	10,8	2,0	0	36,8	1,67

constatando nem univalentes nem polivalentes. As três células restantes também apresentavam unicamente bivalentes mas, em duas delas, o seu número era de 21 e, noutra, era de 17, em vez dos 22 pares normais de cromossômios. Para o fato de tais células terem perdido um e cinco pares de cromossômios, não se encontrou explicação.

Em dezenove das células, onde se contaram os bivalentes, pode ser analisada a frequência dos quiasmas por bivalente (quadro 1), verificando-se que a maioria dos cromossômios apresenta um ou dois quiasmas, e que dois ou três cromossômios apresentam três quiasmas (raramente quatro). O número de quiasmas, por célula, varia de 29 a 43, com uma frequência maior de 36 a 39. Não há variação sensível entre as médias obtidas em diaquinese e em metáfase. O número de quiasmas, por bivalente, em diaquinese é

de $\frac{549}{328} = 1,67$ e, em metáfase, de $\frac{149}{88} = 1,69$. Esta média, para metáfase,

foi calculada apenas com base em quatro células e, no entanto, é bastante aproximada da primeira.

Na var. *caturra* foram analisados os quiasmas em três células em diaquinese e em treze células, em metáfase (quadro 1). Como se pode ver pelo exame do quadro 1, os números encontrados em metáfase são sensivelmente iguais aos verificados na var. *semperflorens*; em diaquinese a variação é maior, porém devemos lembrar que neste caso contamos os quiasmas apenas em três células, o que é pouco.

Raras anormalidades ocorrem na distribuição anafásica dos cromossômios. Não se observam "pontes" e "laggards", porém, em alguns casos, se verificou que os núcleos resultantes da anáfase I tinham um número de cromossômios diferente de 22. Esta pequena irregularidade ocorreu em cerca de 9% das células. Em três células, das 46 examinadas, observaram-se as seguintes distribuições: 21+23, 16+28 e 21+1 isolado + ? cromossômios. Em anáfase II, em uma célula em que não foi possível contar os cromossômios nos quatro pólos, observou-se também um cromossômio isolado, no citoplasma (quadro 2).

QUADRO 2.-Contagem dos cromossômios em café da variedade *semperflorens*, em 32 células em anáfase I e em 14 em anáfase II

Fases	Tipo da distribuição cromossômica				Frequência dos tipos
Anáfase I	22		22		19
	22		?		10
	21		23		1
	16		28		1
	21	1	?		1
Anáfase II	22	22	22	22	4
	22	22	?	?	4
	22	?	?	?	1
	22	22		44	2
	?	?		44	1
	?	44		44	1
	?	?	1	?	?

As observações feitas em telófase II vêm confirmar a raridade das anormalidades, pois, em 100 células examinadas, 95 tinham quatro núcleos telofásicos, grandes e iguais; uma apresentava quatro núcleos mais ou menos iguais e um pequeno e, as quatro restantes, quatro núcleos mais ou menos iguais e alguns cromossômios esparsos pelo citoplasma.

Como era de se esperar, o número de micrósporos, por microsporocito, é também normal, pois, em 300 casos examinados, apenas dois não tinham quatro micrósporos.

5-RESUMO

No presente trabalho são apresentadas as observações realizadas sobre a microsporogênese nas variedades *semperflorens* e *caturrea*, de *Coffea arabica* L.

Notou-se que, no início da prófase, os cromossômios se colorem muito mal, não permitindo observações sobre a sua morfologia; em paquitene, os cromossômios se apresentam com várias secções heteropicnóticas separadas por secções muito finas, que se colorem mal; o centrômero é bastante nítido e se acha ladeado de zonas bem heteropicnóticas; as extremidades dos braços dos cromossômios se colorem mal e se perdem no meio do citoplasma; o nucléolo é bastante visível e a ele se acham ligados alguns cromossômios. É difícil determinar o número exato de cromossômios ligados ao nucléolo, tendo-se encontrado de 1 a 4. De paquitene a metáfase I, as fases se sucedem rapidamente. Em diplotene, os cromossômios são curtos, não mais se percebendo o centrômero. Em diaquinese os 22 pares de cromossômios se repelem pela sua parte mais colorida, onde se encontra o centrômero, e se unem pela parte clara, onde se notam os quiasmas; o número de quiasmas, por célula, varia de 29 a 43; a média por bivalente é de 1,67, em *semperflorens*, e 1,75, em *caturrea*. Em metáfase I, o número médio de quiasmas, por bivalente, é de 1,69, em *semperflorens*, e 1,67, em *caturrea*. Em anáfase I, os 22 pares de cromossômios se separam normalmente. Em telófase I, os cromossômios se colorem mal. Não há, praticamente, intercinese; os cromossômios contraem-se de novo e entram em anáfase II. A formação dos micrósporos é normal. Depois de soltos, ocorre a divisão nuclear, dando origem a dois núcleos com 22 cromossômios. Isto ocorre três a quatro dias antes da abertura das flores; o núcleo vegetativo é grande, esférico e homogêneo, colorindo-se mal; o núcleo reprodutivo é menor, reticulado, colore-se bem e se localiza na periferia da célula; ao seu redor se destaca uma porção de citoplasma, de forma lenticular. A divisão do núcleo reprodutivo geralmente se dá no tubo polínico. Tanto o núcleo vegetativo como o reprodutivo pode ser encontrado na extremidade do tubo polínico.

Poucas irregularidades foram observadas na distribuição dos cromossômios, tendo, a grande maioria dos gametas, $n=22$ cromossômios.

SUMMARY

This paper presents results of cytological observations on microsporogenesis of the *semperflorens* and *caturrea* varieties of the species *Coffea arabica* L.

In general meiosis was found to be normal, the gametes having $n=22$ chromosomes. Only minor irregularities were observed and these were limited to distribution of the chromosomes.

In the early prophase of meiosis the chromosomes did not stain well. In the pachytene stage the chromosomes stained comparatively well and showed several heteropiknotic regions separated by very fine sections which stained faintly. The centromere was readily seen and was located between two heteropiknotic sections. The extremities of the arms of the chromosomes stained very poorly and were lost to view in the cytoplasm. The nucleolus was easily visible and some of the chromosomes appeared to be attached to it. The exact number of chromosomes that were attached to the nucleolus appear to vary from one to four. From the pachytene stage the chromosomes passed very rapidly to metaphase I. In the diplotene stage the chromosomes were observed to be very short and the centromeres could not be seen. In the diakinesis stage the darkest colored parts of the 22 pairs of chromosomes, especially where the centromeres were located, were well separated indicating that they repelled each other. In contrast the slightly stained regions of the chromosomes were intimately associated and showed chiasmata. The number of chiasmata per cell varied from 29 to 43, the average per bivalents being 1.67 in *semperflorens* and 1.75 in *caturra*. In metaphase I the average number of chiasmata per bivalent was determined as 1.69, in *semperflorens* and 1.67 in *caturra*. In anaphase I the 22 pairs of chromosomes were normally separated and in telophase I the chromosomes did not stain well, again making detailed observations difficult. Practically no interkinesis was observed. Following telophase I the chromosomes were observed to contract and entered into anaphase II, that was observed to be normal.

The formation of microspores appeared to be normal. After separation of the microspores there occurred a division of the nucleus giving origin to two nuclei with 22 chromosomes each. This was observed to occur three to four days before opening of the flowers. The vegetative nucleus was observed to be large, round, homogeneous, and stain only faintly. The reproductive nucleus was observed to be small, reticulated; it stained well, and was located at the periphery of the cell. The reproductive nucleus was usually found to be surrounded by a small amount of cytoplasm in a lenticular shape. The division of the reproductive nucleus usually takes place in the pollen tube. Both vegetative and reproductive nuclei were observed to occur in the extremity of pollen tube.

LITERATURA CITADA

1. Medina, Dixier M. Observações citológicas em *Coffea*. XIV — Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K. M. C. *Bragantia* 10 : 61-66. fig. 1. 1950.
2. Mendes, Cândida H. T. Observações citológicas em *Coffea*. XVI — Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* (no prelo).