

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 10

Campinas, Abril de 1950

N.º 4

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XVI — MICROSPOROGÊNESE EM *COFFEA CANEPHORA* PIERRE EX FROEHNER

CÂNDIDA H. T. MENDES

Engenheiro agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1-INTRODUÇÃO

O café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), quando autopolinizado, não produz frutos. Trata-se, pois, de uma espécie tipicamente auto-estéril e de fecundação cruzada, fato êste já comprovado por vários investigadores (8).

Diversas podem ser as causas que acarretam a ausência de frutos quando as espécies vegetais são submetidas à autopolinização. Ora é consequência de anomalias nos órgãos reprodutivos da planta ou da ausência de algumas de suas partes; ora é o resultado da diferença na época da maturação das anteras e do estigma ou da localização da antera em nível inferior ao do estigma. Êsses casos resultam no que comumente se denomina auto-esterilidade. Na ausência dessas anomalias, a falta de produção de frutos após a autopolinização pode ser devida à ocorrência de fatores genéticos determinando a incompatibilidade. Ê o que aparentemente ocorre no café robusta (8).

A microsporogênese no gênero *Coffea* foi descrita apenas superficialmente por Faber (1). Êste autor não indicou as espécies de que se serviu para as observações.

Alguns estudos sobre a microsporogênese, sobre a formação dos grãos de pólen e o comportamento dêste em cruzamentos controlados levaram Krug e Mendes (4) à conclusão de que, nas variedades tetraplóides ($2n=44$) de *Coffea arabica* L. bem como nas espécies diplóides ($2n=22$), a microsporogênese é normal. Recentemente, Medina (5) e Mendes (6) estudaram mais detalhadamente a microsporogênese em *C. arabica*, confirmando que se trata de um processo normal. Investigações detalhadas foram também realizadas por Mendes e Bacchi (7), em *Coffea arabica* L. var. *monosperma* Ottoländer et Cramer, que é diplóide ($2n=22$); por Krug (2), em *Coffea arabica* L. var. *bullata* Cramer, que apresenta uma forma hexaplóide ($2n=66$) e uma octoplóide ($2n=88$), e por Krug e Mendes (3), em híbridos triplóides ($3n=33$) entre *C. arabica* e *C. canephora*.

As observações realizadas sobre a microsporogênese de *C. canephora* Pierre ex Froehner, relatadas no presente trabalho, constituem uma das várias pesquisas básicas que se vem efetuando no Instituto Agronômico de Campinas, a fim de melhor conhecer essa espécie auto-estéril de *Coffea*.

2-MATERIAL E MÉTODO

O estudo da microsporogênese em *C. canephora* foi feito em anteras colhidas de três plantas diferentes, que vêm sendo utilizadas na análise da auto-esterilidade.

Os botões contendo as anteras foram desembaraçados dos lobos da corola com o auxílio de uma pinça e colocados em fixador de Carnoy (três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial), e depois coloridos pelo carmim acético. Quando necessário, o material foi conservado durante muitos dias no próprio fixador, em refrigerador, cuja temperatura oscilou entre 3 e 8° C.

Os desenhos foram executados com o auxílio de uma câmara clara, usando-se, para todos êles, a ocular 10x e a objetiva 90x.

3-OBSERVAÇÕES

3.1-PROCESSO DA MICROSPOROGENESE

Nos estágios iniciais da prófase, isto é, nos estados de leptotene e zigotene, os cromossômios apresentam apenas algumas regiões pareadas. Nestes estágios é muito difícil uma observação sobre a estrutura dos cromossômios; apenas se pode dizer que muito cedo êles apresentam uma grande diferenciação na coloração de suas regiões, sendo algumas altamente heteropicnóticas e outras tão pouco coloridas, que sua visibilidade se torna extremamente difícil (est. 1-A). O nucléolo é grande, bem colorido, e apresenta vacúolos.

No estágio de paquitene, os cromossômios já pareados e bem mais curtos permitem um estudo mais preciso; entretanto, é raro encontrar-se uma célula na qual estejam individualizados os onze pares de cromossômios. Pelo que se pode observar, existe sempre um cromossômio ligado ao nucléolo; êste cromossômio tem a região do centrômero muito nítida e esta o divide em dois braços desiguais: um deles, o menor, liga-se ao nucléolo e apresenta muitas regiões heteropicnóticas; o outro mostra as regiões heteropicnóticas mais nítidas localizadas junto ao centrômero; o restante do seu comprimento é difícil de ser analisado, em vista de se colorir muito mal pelo carmim (est. 1-B). Todos os cromossômios apresentam um centrômero muito distinto e bem delimitado entre duas regiões altamente heteropicnóticas. Em alguns cromossômios estas regiões heteropicnóticas se situam somente junto ao centrômero e, em outros, distribuem-se ao longo de seus braços (est. 1-C).

Em diaquinese (est. 1-D e E), os cromossômios se apresentam muito mais curtos e dispersos, aos pares, pelo citoplasma. Cada cromossômio é formado de uma região escura, fortemente colorida, onde frequentemente se observa uma estreita faixa clara, que corresponde ao centrômero; em continuação a essa parte intensamente colorida há uma zona clara, onde podem ser observados os quiasmas. Em alguns bivalentes, os quiasmas se localizam em ambos os lados da região heterocromática, dando-lhes uma



Detalhes da meiose em células-mães de pólen, em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. A — Zigotene-paquítene (800 x). B — Cromossômio ligado ao nucléolo (1600 x). C — Paquítene (800 x). D e E — Diaquínese (800 x). F — Vista polar de metáfase I (1600 x). G — Vista lateral de metáfase I (1600 x). H — Anáfase I (1600 x). I — Anáfase II (1600 x). J — Telófase II (1600 x).

forma fechada, semelhante à letra O. Na maioria dos casos, entretanto, êles são assimétricos, localizando-se só dum lado da região heterocromática; êstes bivalentes se apresentam em forma de V, mais ou menos aberto (est. 1-D e E).

Em metáfase I (est. 1-F e G), os cromossômios atingem o máximo de encurtamento, separando-se, normalmente, em anáfase I, onze cromossômios para cada pólo.

Logo após à primeira anáfase, os cromossômios se arranjam numa metáfase II (est. 1-H). Em células neste estado observam-se, com facilidade, os dois grupos de onze cromossômios que, em seguida, se separam dando quatro núcleos de onze cromossômios (est. 1-J). Sòmente depois de êstes núcleos sofrerem as transformações que caraterizam a telófase II é que o citoplasma se divide dando origem à tétrade de microsporócitos e, depois, aos grãos de pólen.

Em algumas células-mães, a separação em anáfase I resulta em dez cromossômios para um pólo e doze para o outro (est. 1-I), dando, no final da meiose, dois microsporos com dez e dois com doze cromossômios. Esta anormalidade, única observada, é muito pouco frequente: uma contagem de 95 microsporócitos em divisão mostrou que, em 93,68% dos casos, a meiose é normal (quadro 1). Chegou-se a êste resultado examinando células-mães de pólen em divisão, nas quais, pelo menos num dos pólos, foi permitida uma contagem exata dos cromossômios.

QUADRO 1.-Contagem de microsporócitos nos estados de anáfase I e anáfase II, para a observação das percentagens de divisões normais e anormais

Casos em que foi possível a contagem dos cromossômios	Número de células em divisão normal	Número de células em divisão anormal	TOTAL
1 núcleo (anáfase I)	41	0	41
2 núcleos (anáfase I)	25	3	28
1 núcleo (anáfase II)	6	0	6
2 núcleos (anáfase II)	7	1	8
3 núcleos (anáfase II)	4	0	4
4 núcleos (anáfase II)	6	2	8
Total	89	6	95
Percentagem	93,68	6,32	100,00

3.2-QUIASMAS

Em *C. canephora*, os estados mais favoráveis ao estudo dos quiasmas são a diaquinese e a metáfase I em vista lateral. Em estados anteriores, os cromossômios são muito longos e mal coloridos, e, além disso, como já se mencionou, é difícil encontrar uma célula na qual estejam individualizados os onze pares de cromossômios no início de prófase.

QUADRO 2.-Cálculo das médias de bivalentes com um, dois e três quiasmas, do número médio de quiasmas por célula e do número médio de quiasmas por bivalentes. Observações realizadas em 52 células no estado de diáquinese, na planta 37 enx.

Tipos de distribuição dos quiasmas pelos onze bivalentes	Frequência de células (f)	Número de bivalentes (n) com 1 a 3 quiasmas										N.º de quiasmas		Número médio de quiasmas por bivalente
		1 quiasma		2 quiasmas				3 quiasmas				Por célula (n)	Total (nf)	
		n	nf	simétricos		assimétricos		n	nf	n	nf			
				n	nf	n	nf					n	nf	
1	12	8	96	1	12	1	12	1	12	1	12	15	180	1,36
2	9	7	63	2	18	1	9	1	9	1	9	16	144	1,45
3	7	8	56	2	14	0	0	1	7	1	7	15	105	1,36
4	5	7	35	3	15	0	0	1	5	1	5	16	80	1,45
5	5	5	25	3	15	2	10	1	5	1	5	18	90	1,64
6	2	6	12	1	6	3	18	1	6	1	6	17	51	1,54
7	2	6	12	3	18	1	6	1	6	1	6	17	51	1,54
8	1	9	9	1	9	1	9	1	9	0	0	13	39	1,18
9	1	9	9	0	0	1	9	1	9	1	9	14	42	1,27
10	1	9	9	2	18	0	0	0	0	0	0	13	39	1,18
11	1	7	7	1	7	2	14	1	7	1	7	16	48	1,45
12	1	8	8	2	16	2	16	1	8	0	0	14	42	1,27
13	1	6	6	2	12	2	12	2	12	1	12	17	51	1,54
14	1	6	6	3	18	3	18	1	6	1	6	17	51	1,54
15	2	5	10	4	20	8	40	1	5	1	5	18	54	1,64
16	1	4	4	5	20	5	20	1	4	1	4	19	57	1,73
Totais :	52	-----	363	-----	106	-----	50	-----	49	-----	826	-----	-----	-----
Médias :	-----	-----	7,06	-----	2,04	-----	0,96	-----	0,94	-----	15,88	-----	-----	1,44

Nas células examinadas, de uma mesma planta, em diaquinese e metáfase, foram observados bivalentes com um, dois e com três quiasmas. Muito raramente foram observados pares de cromossômios sem quiasmas. Alguns raros casos desta natureza foram observados em diaquinese e podem ser atribuídos à separação forçada de um par de cromossômios com um quiasma, em consequência da compressão da lamínula sobre a lâmina. Por esta razão, êsses casos não constam no quadro 2. Os casos de ausência de quiasmas em metáfase I (0,31 bivalentes) podem ser explicados pela separação precoce de alguns pares em relação aos outros. Por êsse motivo, no cálculo do número de quiasmas por célula, no quadro 3, os bivalentes já separados são também considerados como tendo um quiasma. Tanto em diaquinese como em metáfase I, predominam os bivalentes com um quiasma.

Com relação aos cromossômios de dois quiasmas, foi observado que há dois tipos: aquêles em que os quiasmas são "simétricos", isto é, dispõe-se um de cada lado do centrômero; e outro em que êles são "assimétricos", isto é, os dois quiasmas se localizam num mesmo lado do centrômero.

Nos bivalentes com três quiasmas sempre foram encontrados dois dêles dum lado e um do outro, com relação ao centrômero.

Os dados resumidos no quadro 2 correspondem a observações feitas em 52 células no estado de diaquinese. Nesta fase há, em média, sete cromossômios com um quiasma, três (2,04 + 0,96) com dois e um (0,96) com três. A média de quiasmas, por célula, é de 15,88. Há células com um mínimo de treze e outras com um máximo de dezenove quiasmas. A frequência mais elevada é de células com quinze quiasmas. A média, por bivalente, é de 1,44 quiasmas.

Analisando-se os dados apresentados no quadro 3, e que se referem às observações feitas em 89 células no estado de metáfase I, vê-se que também aqui há bivalentes com um, com dois e com três quiasmas. Foram encontrados 8,4 bivalentes com um quiasma, (0,31+8,09), 1,6 bivalentes com dois quiasmas, (1,21+0,4), e 0,97 bivalentes com três quiasmas. Pode-se dizer que há, aproximadamente, 8 bivalentes com um quiasma, 2 com dois quiasmas e 1 com três. O número de quiasmas, por célula, varia entre 11 e 17, sendo mais frequentes as células com 15 quiasmas (51 células entre as 89 examinadas). A média de quiasmas, por célula, é de 14,57, e a de quiasmas por bivalente, de 1,32.

Comparando-se os dados obtidos de quiasmas em diaquinese e em metáfase I (quadro 2 e 3), vê-se que há terminalização nesta última fase, e, como consequência, uma alteração nas médias das classes de bivalentes com um e com dois quiasmas:

CLASSES DE BIVALENTES	<i>diaquinese</i>	<i>metáfase I</i>
bivalentes com 1 quiasma	7,0	8,4
bivalentes com 2 quiasmas	3,0	1,6
bivalentes com 3 quiasmas	0,96	0,97
quiasmas por célula	15,88	14,47

QUADRO 3.-Cálculo das médias de bivalentes com um, com dois e com três quiemas, do número médio de quiemas por célula e do número médio de quiemas por bivalente. Observações realizadas em 89 células no estado de metáfase I (vista lateral), na planta 37 enx.

Tipos de distribuição dos quiemas pelos onze bivalentes	Frequência de células (f)		Número de bivalentes (n) com 1 a 3 quiemas										N.º de quiemas		Número médio de quiemas por bivalente
			1 quiasma		2 quiemas				3 quiemas				Por célula (n)	Total (nf)	
			n	nf	simétricos		assimétricos		n	nf	n	nf			
					n	nf	n	nf					n	nf	
1	28	8	224	1	28	1	0	28	1	1	28	1	15	420	1,36
2	20	8	160	2	40	0	0	0	0	0	0	0	15	300	1,36
3	10	9	90	1	10	0	0	0	0	0	0	0	14	140	1,27
4	4	9	36	1	4	0	0	0	0	0	0	0	14	56	1,27
5	4	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	52	1,18
6	6	10	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	78	1,18
7	3	9	27	1	3	0	0	0	0	0	0	0	14	42	1,27
8	3	7	21	2	6	1	3	3	1	3	1	3	16	48	1,15
9	2	7	14	3	6	0	0	0	0	0	0	0	16	32	1,45
10	2	9	18	0	0	1	2	2	1	2	2	2	14	28	1,27
11	2	8	16	2	4	0	0	0	0	0	0	0	15	30	1,36
12	1	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	1,00
13	1	10	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	12	12	1,09
14	1	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	15	1,36
15	1	7	7	2	2	1	1	1	1	1	1	1	16	16	1,45
16	1	6	6	3	3	3	3	1	1	1	1	1	17	17	1,54
Totais:	89	---	748	---	108	---	36	---	87	---	1297	---	---	---	---
Médias:	---	---	8,41	---	1,21	---	0,40	---	0,98	---	14,57	---	---	---	1,32

Vê-se, por essa relação, que a classe de bivalentes com três quiasmas não sofre alteração ; a de bivalentes com dois quiasmas diminui com a passagem do estado de diaquinese para metáfase e, em consequência, a de bivalentes com um quiasma é aumentada.

4-RESUMO E CONCLUSÕES

Pelo estudo de células-mães de pólen de *C. canephora*, verificou-se que, durante os estados iniciais da prófase, é possível, em alguns cromossômios, reconhecer-se a região do centrômero e observar-se a distribuição das regiões heteropicnóticas. O nucléolo é visível desde o início da prófase até a prometáfase ; a ele sempre se acha ligado um par de cromossômios, pelo menos.

As observações sobre o número de quiasmas, feitas em diaquinese e em vistas laterais de metáfase I, indicam que há terminalização em metáfase.

O pareamento e a separação dos cromossômios são normais, dando, no final, grãos de pólen com onze cromossômios. Numa pequena percentagem (6,32%) de células-mães de pólen, foram contados $n=10$ e $n=12$ cromossômios, como resultado de uma separação anormal na primeira anáfase.

A alta percentagem de células-mães que se dividem normalmente (93,68%) nos conduz à conclusão de que o pólen de *C. canephora* é normal.

SUMMARY

This paper presents the results of cytological observations on microsporogenesis in the self-sterile species *Coffea canephora*.

It was found difficult to study chromosome structure in the first stages of meiosis because the chromosomes do not stain well with aceto carmine and could be seen only as long faintly threads with some heteropycnotic regions.

In many observations of the pachytene stage it was possible to observe and study a chromosome attached to the nucleolus. This chromosome characteristically had a visible centromere which divided it into two arms of different sizes. The short arm was attached to the nucleolus and had several heteropycnotic regions. In the long arm the heteropycnotic regions were observed to be close to the centromere ; the distal portion of this arm was only faintly stained. Other chromosomes in the pachytene stage were found to have a conspicuous centromere located between two highly heteropycnotic regions. The heteropycnotic regions in some chromosomes were located near the centromere while in others they were observed to be scattered throughout the chromosome.

In diakinesis the chiasmata were counted and there were found seven chromosomes with one chiasma, three chromosomes with two chiasmata and one chromosome with three chiasmata. The average number of chiasmata per cell was 15.88.

In metaphase the average number of chiasmata per cell was found to be 14.57, which is less than the average per cell in diakinesis.

Anaphase I appeared normal as did all subsequent phases of meiosis, that resulted finally in the development of four microspores with eleven chromosomes each.

Very few pollen mother cells with abnormal numbers of chromosomes were observed.

On the basis of this study, it is concluded that microsporogenesis in *Coffea canephora* is normal.

LITERATURA CITADA

1. Faber, F. C. von. Morphologische-physiologische untersuchungen an Blüten von *Coffea*-arten. Annales du Jardin Bot. Buitenzorg. 2.e série 25 : 59-160. 1912.
2. Krug, C. A. Observações citológicas em *Coffea*. III — Bol. Téc. Inst. Agron. de Campinas 27: 1-17. 1937.
3. Krug, C. A. and A. J. T. Mendes. Cytological observations in *Coffea*. IV — Journal Gen. 39 : 189-203. 1940.
4. Krug, C. A. e A. J. T. Mendes. Conhecimentos gerais sôbre a Genética e a Citologia do gênero *Coffea*. Rev. Agric. (Piracicaba) 18 : 399-408. 1943.
5. Medina, D. M. Observações citológicas em *Coffea*. XIII — Observações preliminares em *C. arabica* L. var. *rugosa* K.M.C. Bragantia 9 : 47-51. 1949.
6. Mendes, A. J. T. Observações citológicas em *Coffea*. XV — Microsporogênese em *C. arabica* L. Bragantia 10 : 79-87, fig. 1-2. 1950.
7. Mendes, A. J. T. e O. Bacchi. Observações citológicas em *Coffea*. V — Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. Jornal de Agronomia (Piracicaba) 3 : 183-206. 1940.
8. Mendes, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. Bragantia 9 : 35-41. 1949.