

Aspectos Citológicos da Microgametogênese no Cafeeiro



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Café
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 12

Aspectos Citológicos da Microgametogênese no Cafeeiro

Paula Cristina da Silva Angelo

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Café

Parque Estação Biológica - PqEB,
Av. W3 Norte (final), Ed. Sede
70770-901, Brasília - DF
Fone: (61) 3448-4010
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações da Embrapa Café

Presidente: *Lucas Tadeu Ferreira*
Vice-Presidente: *Jamilsen de Freitas Santos*
Secretária-Executiva: *Adriana Maria Silva Macedo*
Membros: *Anísio José Diniz*
Antonio Fernando Guerra
Carlos Henrique Siqueira de Carvalho
Cristina Arzabe
Helena Maria Ramos Alves
Maurício Sérgio Zacarias
Milene Alves de Figueiredo Carvalho

Supervisão editorial: *Adriana Maria Silva Macedo*
Revisora de texto: *Flávia Raquel Bessa*
Normalização bibliográfica: *Maria de Fátima da Cunha*
Tratamento de ilustrações: *Thiago Farah Cavaton*
Editoração eletrônica: *Thiago Farah Cavaton*

1ª edição

1ª Impressão (2017): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte constitui violação dos direitos autorais (Lei nº9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Café

Angelo, Paula Cristina da Silva.
Aspectos citológicos da microgametogênese no cafeeiro /
Paula Cristina da Silva Angelo. – Brasília, DF : Embrapa, 2017.
25 p. (Documentos / Embrapa Café, ISSN 1678 -1694 ; 12).

1. Café. 2. *Coffea arabica*. 3. *Coffea canephora*. 4. Genótipo.
5. Microgametogênese. I. Embrapa Café. II. Título. III. Série.

CDD 633.73

Autores

Paula Cristina da Silva Angelo

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas,
pesquisadora da Embrapa Café
Brasília, DF

Agradecimentos

Ao Consórcio Pesquisa Café e Fundação Procafé, pela compra de corantes e fixadores.

Apresentação

No início dos trabalhos de melhoramento do cafeeiro o ponto principal era o aumento do rendimento. Atualmente além do incremento da produtividade, o melhoramento tem objetivado o desenvolvimento de cultivares de elevado potencial produtivo, boa qualidade de bebida, adaptada a diferentes ambientes e com boa estabilidade, resistente a pragas e doenças etc. Logo nenhum melhoramento é possível no cafeeiro sem o conhecimento de aspectos da sua biologia floral e reprodutiva.

Tema recorrente nas pesquisas, em que são utilizadas as tecnologias de base molecular e citogenética para estudos em biotecnologia, genômica, transcriptômica, a constituição do genoma de cultivares e espécies pode ser ampliada com a contribuição do estudo de micrósporos, visando conhecer e selecionar o estágio de desenvolvimento do objeto de estudo, que é essencial.

Este trabalho acrescenta análises citogenéticas de micrósporos e um painel dos aspectos citológicos das células germinativas masculinas de cafeeiros, ao longo de seu desenvolvimento, até o estágio de grão de pólen binucleado aos já publicados e importantes estudos citogenéticos relacionando-os ao desenvolvimento de botões florais e flores.

Uma vez que não há trabalho semelhante nas bases de dados da literatura técnico-científica, espera-se que seja útil para facilitar a coleta de material biológico em futuras ações de pesquisa.

Gabriel Ferreira Bartholo
Gerente-Geral da Embrapa Café

Sumário

Introdução.....	11
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão	15
Conclusões.....	22
Referências.....	23

Aspectos Citológicos da Microgametogênese no Cafeeiro

Paula Cristina da Silva Angelo

Introdução

O desenvolvimento do grão de pólen ou microgametogênese em plantas com flores segue uma sequência de eventos padronizados. Sob o controle de genes homeóticos das classes B, C e E (CHANG et al., 2011; MA, 2005), ocorre a morfogênese das anteras com sua camada interna de tecido esporogênico em cada um dos lóculos. As células desse tecido, os microsporócitos, dão origem às células mãe dos micrósporos (CMMs), que têm ploidia idêntica às das células somáticas ($2n$ em plantas diplóides) da flor e da planta que floresce. CMMs adquirem uma parede de calose que é secretada pelo *tapetum*, tecido da antera de duração transitória e que tem função glandular (PIFFANELLI et al., 1998) e, em seguida, passam pelas duas divisões meióticas. Durante a primeira divisão meiótica, a recombinação por *crossing over* ocorre sob controle de genes como *SWITCH/DYAD*, *POOR HOMOLOGOUS SYNAPSIS 1* que asseguram alta fidelidade à segregação dos cromossomas recombinantes (CHANG et al., 2011; MA, 2005). Ao fim da meiose, um conjunto de quatro micrósporos pode ser visto dentro de um mesmo envoltório de calose, tendo cada um deles a ploidia reduzida à metade (n , em plantas diplóides) daquela que têm as células somáticas nas flores e plantas que florescem.

Terminada a microsporogênese, os micrósporos crescem e amadurecem para dar origem a grãos de pólen, ou gametófitos, preparados para germinar ao contato com estigmas receptivos. Assim que são liberados do envoltório de calose, que é digerido por glucanases também secretadas pelo *tapetum* (PIFFANELLI et al., 1998), micrósporos jovens têm núcleos grandes e centralizados, denominados núcleos vegetativos, envoltos por um sistema de membranas que é parte do retículo endoplasmático e enriquecido em ribossomas (WETZEL; JENSEN, 1992). Nesse estágio, têm paredes celulares delgadas que recebem das células do *tapetum* os precursores lipídicos para formar a exina do envoltório celular, o que é um dos primeiros eventos que marcam a fase de maturação dos grãos de pólen (PIFFANELLI et al., 1998). O núcleo vegetativo torna-se excêntrico quando o citoplasma é dominado por grandes vacúolos. Estes vacúolos emergem de um processo de renovação celular, durante o qual é eliminado o que foi utilizado na microsporogênese e já não é necessário, e geralmente duram até a primeira divisão mitótica do núcleo vegetativo (PACINI et al., 2011). Em geral, vacúolos têm importância no balanço de água e no aumento do volume dos micrósporos (FIRON et al., 2012).

Quando o núcleo vegetativo sofre a primeira mitose, os micrósporos tornam-se binucleados, apresentando um núcleo vegetativo e um núcleo generativo, cada um deles com a metade da ploidia (n) das plantas que floresceram ($2n$, em plantas diplóides). Logo após a mitose, o núcleo generativo pode ser visto aderido à membrana celular do micrósporo e, em seguida, migra para o centro da célula já envolto em seu próprio sistema de membranas (PARK; TWELL, 2001; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2003). Desse ponto em diante, a estrutura é reconhecida como célula generativa e contém, além do núcleo generativo, algum citoplasma e proplastídeos, mas não amiloplastos, e algumas mitocôndrias, a depender da espécie (CLÉMENT; PACINI, 2001). A maioria das organelas permanece no citoplasma da célula vegetativa, assim como a maioria dos corpúsculos de reserva, que podem ser constituídos de óleos e mais comumente de carboidratos, além do amido nos plastídeos (CLÉMENT; PACINI, 2001; PIFFANELLI et al., 1998).

Uma segunda divisão mitótica marca a dissolução da célula generativa e a origem de dois espermatócitos (ambos de ploidia n nas plantas diplóides). Grãos de pólen que já têm dois espermatócitos e um núcleo vegetativo antes da deiscência das anteras e da antese das flores ocorrem em algumas espécies e aqueles com uma célula generativa e um núcleo vegetativo são mais frequentes. A segunda divisão mitótica do núcleo generativo pode até mesmo ocorrer durante a germinação do pólen, já no tubo polínico (MA, 2005). O genoma do grão pólen é expressado (NOWAK et al., 2011) e as reservas no citoplasma da célula vegetativa são mobilizadas durante a síntese do tubo polínico, que é um processo ativo dependente de ATP (CLÉMENT; PACINI, 2001; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2003). O tubo transporta os espermatócitos através do estigma e do estilete da flor e os direciona aos megagametófitos (sacos embrionários) no ovário. Um deles funde-se com o megagametócito (de ploidia n em plantas diplóides) para formar o embrião, que recupera a ploidia dos genitores ($2n$ nas plantas diplóides) e o outro espermatócito funde-se com a célula central do megásporo (que tem ploidia $2n$ em plantas diplóides) para formar o endosperma da semente (ploidia $2n + n$, triplóide em plantas diplóides).

A citologia da microgametogênese em cafeeiros não foi suficientemente examinada, a despeito da importância do processo para programas de melhoramento (COULIBALY et al., 2003) e outras biotecnologias. Há relatos muito bons sobre o pareamento e a segregação dos cromossomas durante a meiose (BOAVENTURA, 1990; CONAGIN, 1961), sobre taxas de germinação e longevidade de grãos de pólen (MENDES, 1961) e sobre a estrutura e a ornamentação do envoltório externo dos grãos de pólen, que é extremamente variável em espécies de *Coffea*, especialmente *C. arabica* e suas variedades (CHINNAPPA; WARNER, 1981, 1982). Mas não foi possível encontrar trabalhos incluindo os aspectos morfo-citológicos da microgametogênese. Este trabalho é um registro dos estados citológicos citados acima para o cafeeiro, relacionando-os com os estádios de desenvolvimento das flores, o que pode ser útil para consultas que antecederem coletas de material biológico para fins de pesquisa.

Material e Métodos

Os botões florais foram coletados, em setembro e outubro de 2015 e junho a setembro de 2016, em plantas férteis de *Coffea arabica* L. 'Siriema' (clone 33) e *C. arabica* 'Acauã' e de uma planta de progênie de *C. arabica* 'Bourbon'; de uma planta do Híbrido do Timor; e de *C. canephora* Pierre ex A. Froehner 'Conillon', na fazenda mantida pela Fundação Procafé, para experimentação, em Varginha/MG. De acordo com seu comprimento, os botões florais foram designados como F1 a F9, com comprimentos aproximados de 4 mm a 5 mm até 2,5 cm a 3 cm, respectivamente, sendo os últimos estádios F8 e F9 representados por flores em antese parcial ou completa. Foram coletados botões florais em cada um desses estádios para cada um dos genótipos examinados.

Uma vez coletados, os botões florais foram examinadas a fresco ou fixados, por pelo menos 24 horas, em etanol:ácido acético 3:1, à temperatura ambiente. Anteras, excisadas de botões florais recém coletados ou pré-fixados, foram seccionadas sobre as lâminas de vidro para liberar os micrósporos no corante ou coradas em pequenos volumes da solução de corante, a 60 °C, em estufa de temperatura controlada por duas a três horas, antes do exame. Os corantes usados foram carmin-acético (5% carmin em ácido acético 45%) ou carmin acético-alcoólico, modificado de Snow (1963) por ter sido preparado com ácido acético glacial e não com ácido clorídrico, sendo todos os outros detalhes da preparação mantidos como na receita original. Os procedimentos relatados por Gardner e Rattenbury (1974) para romper os micrósporos, expulsando-os dos envoltórios, e facilitar as observações de núcleo(s), e também aqueles úteis para descorar os citoplasmas com solução de ácido acético, evidenciando a coloração do(s) núcleo(s), foram empregados.

O exame das lâminas foi realizado em microscópio binocular de campo claro (Zeiss), sob aumento de 400X (lentes oculares de 10X) e um *zoom* digital de 4X foi aplicado a algumas das imagens (vide as legendas), para propiciar a visualização de detalhes das células nos diversos estádios de desenvolvimento.

Resultados e Discussão

Flores de plantas dos diferentes genótipos apresentam diferenças quanto ao comprimento final. Alguma variabilidade no comprimento e morfologia de flores de um mesmo genótipo, em anos consecutivos, também foi observada. Essas diferenças podem estar relacionadas a fatores ambientais como a disponibilidade de água (BEAUZAMY et al., 2014), o que é capaz de induzir efeitos até mais marcantes. Por exemplo, a ocorrência de frutos resultantes de duplicação dos pistilos, o que no café é vulgarmente conhecido como “Felipe”, pode estar relacionada com a escassez de água, como relatado para outras espécies (HANDLEY; JOHNSON, 2000). As flores malformadas e pequeninas de café, conhecidas como “estrelinhas” na antese, que também podem apresentar pistilos duplos, foram observadas depois de longos períodos de escassez drástica de água seguidos por chuvas que atingem flores enquanto estas não estão completamente diferenciadas e preparadas para a antese (observação da autora).

Em razão da variabilidade natural descrita acima, observada de um ano para o seguinte no mesmo genótipo e entre genótipos no mesmo ano, não foram realizadas medições rigorosas (que teriam desvios de média da ordem de milímetros e décimos de milímetros) do comprimento de botões florais de cada genótipo em cada estádio. Botões florais com diferenças de 2 mm ou 3 mm no comprimento em um mesmo genótipo e ano podem conter micrósporos em estádios tão diferentes quanto MMCs e tétrades (vide a seguir) e diferenças como essa ocorrem em

floradas consecutivas de uma mesma cultivar. As imagens das células e das flores foram dispostas como um *continuum* no tempo, pois não houve correspondência absoluta e universal entre o comprimento das flores e o estágio dos micrósporos para todos os genótipos e anos de coleta. Portanto, as imagens incluídas no presente trabalho podem ser consultadas para obter orientação inicial antes das coletas, sendo o material coletado examinado em seguida, para se ter certeza do estágio de desenvolvimento dos micrósporos, e são úteis para saber, por exemplo, que em flores F4 ou F5 (Figura 2) a meiose dos micrósporos já ocorreu.

Cultivares oriundas de seleção e híbridos de *C. arabica* ('Siriema', 'Acauã' e 'Bourbon') são tetraplóides ($4n$), produzem grãos de pólen contendo espermatócitos diplóides ($2n$) e a maioria das células no endosperma sólido deve ser, em teoria, hexaplóide ($4n + 2n$). O Híbrido do Timor é um tetraplóide natural resultante da hibridação interespecífica entre *C. canephora* e *C. arabica*. Plantas de *C. canephora* são diplóides. Então, alguma variabilidade no tamanho dos micrósporos em um mesmo estágio e na ornamentação do envoltório externo do pólen, já reportados por Chinappa e Warner (1981, 1982), foram notados, mas não foram observadas diferenças muito marcantes relativas ao processo da microgametogênese em si, como, por exemplo, diferenças na frequência de microgametas ou de células malformadas que pudessem ser relacionadas específica e exclusivamente a qualquer um dos genótipos examinados.

Quanto aos corantes utilizados, o carmin acético-alcoólico funcionou bem, especialmente para tecidos previamente fixados em etanol:ácido acético e, em seguida, corados por algumas horas (duas a três) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Utilizados em conjunto, esses dois procedimentos - a pré-fixação e a coloração em temperatura alta - produziram coloração do(s) núcleo(s) um pouco mais estável do que a do carmin acético-alcoólico sobre células recém-colhidas. A estabilidade da coloração foi importante quando se necessitou descolorir os citoplasmas preservando e realçando a coloração dos núcleos. A pré-fixação e a alta temperatura também

contribuíram para a clarificação dos citoplasmas das células, devida à dissolução dos corpúsculos de reserva (SNOW, 1963).

Em geral, no entanto, o carmin-acético produziu coloração muito mais intensa do que o carmin acético-alcoólico, mais vermelha que rosada, sem a necessidade de pré-fixar o material. Mas, nas preparações em que foi utilizado o carmin-acético, quase que invariavelmente foi necessário descolorir um pouco os citoplasmas para evidenciar os núcleos.

A ruptura e remoção do envoltório externo dos grãos de pólen em estágio tardio, seguindo as instruções de Gardner e Rattenbury (1974), foi essencial para observar e capturar as imagens da célula generativa e foi facilitada por um leve aquecimento das lâminas em placa aquecedora elétrica, antes do esmagamento.

Quanto às observações propriamente ditas, o tecido microsporogênico foi observado como agrupamentos de microsporócitos com paredes celulares bem finas, ricos em vacúolos, e que se destacaram facilmente dos outros tecidos da antera em flores nos estádios F1 e F2 (Figura 1A e 1B). A diferenciação e individualização dos microsporócitos foi percebida como a aquisição gradativa da forma elíptica. CMMs com citoplasmas uniformes e claros e com núcleos grandes e centralizados foram observadas em botões no estágio F2. Essas células tinham inicialmente a forma definida pela pressão das suas vizinhas, todas incluídas nos sacos polínicos dentro dos lóculos das anteras (Figura 1C e 1D). Microsporócitos e CMMs foram observados em botões florais F1-F2 de todos os genótipos examinados, sem dificuldades.

A partir da aquisição do envoltório de calose, na pré-meiose (Figura 1E), as CMMs apresentaram forma elíptica e, depois da divisão do citoplasma (Figura 1F), as tétrades de micrósporos que resultam da meiose foram observadas em botões florais F2-F3, de *C. arabica* 'Acauã', em 2015, (Figura 1G-J) e em Híbrido do Timor e *C. arabica* 'Siriema', em agosto de 2016. Tétrades são bastante efêmeras. CMMs foram observadas por

dois dias consecutivos de coleta e provavelmente podem durar um tempo maior, mas quando se tornaram aptas a evoluir, induzidas, certamente, por sinais ambientais e também endógenos, deram origem a micrósporos uninucleados jovens (Figura 2A) em menos de 12 horas.

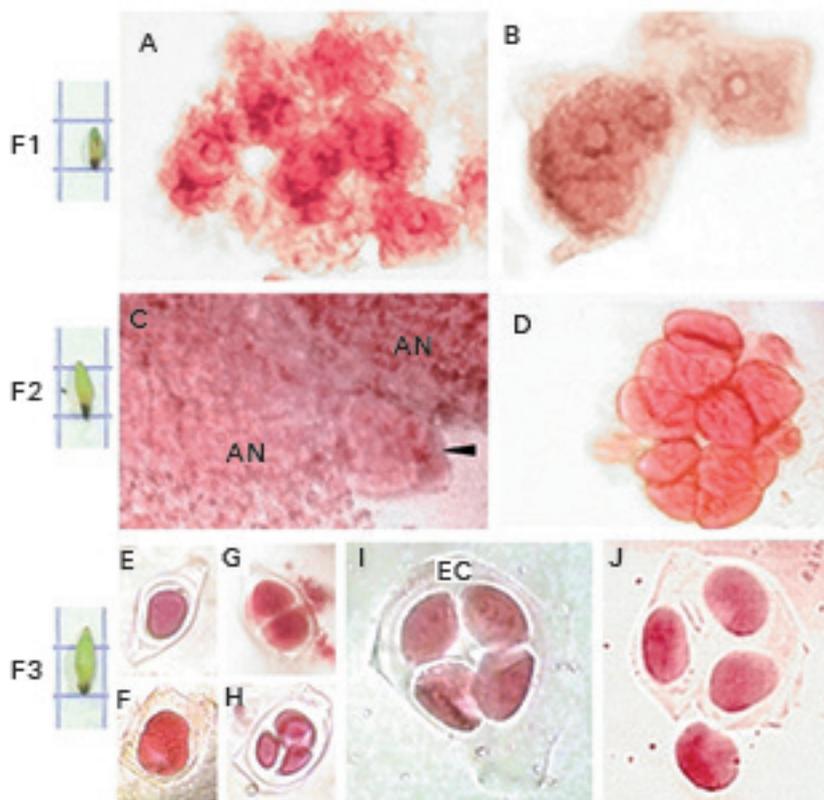


Foto: Paula Cristina da Silva Angelo

Figura 1. Microsporogênese em *Coffea* spp. F1-F3 são botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. A-B: microsporócitos. C-D: grupos de células mãe de micrósporos (CMMs - **ponta de seta preta**) expostas depois que uma antera seccionada foi esmagada sob a laminula e CMMs em maior aumento. E-F: CMMs dentro do envoltório de calose. E: em pré-meiose. F: em processo de divisão do citoplasma que segue as divisões meióticas do núcleo. G-J: tétrades de micrósporos sob diferentes ângulos, dentro do envoltório de calose (EC). J: um micrósporo da tétrade foi liberado durante a manipulação e os restantes são vistos dentro do envoltório de calose. A, C e E-H: aumento de 400X. B, D, I e J: aumento de 400X mais *zoom* digital de 4X. Quadrículas atrás dos botões florais são de 6 mm x 6 mm.

A redução no tamanho dos micrósporos, quando comparados com as CMMs, é facilmente percebida comparando-se as Figuras 1F e 1H.

Uma vez liberados das tétrades pela dissolução do envoltório de calose (Figura 1J), os micrósporos iniciam a maturação (Figura 2) para se tornarem grãos de pólen. Micrósporos uninucleados jovens com paredes celulares muito delgadas, citoplasma uniforme e claro e núcleo grande e centralizado (Figura 2A e 2B) e micrósporos uninucleados vacuolados com núcleos grandes e excêntricos (Figura 2C e 2D) foram observados em botões florais F4-F6, de *C. arabica* 'Siriema' (Figura 2C e 2D) e de Híbridos do Timor, no ano de 2016. Vacúolos muito reduzidos e de difícil identificação ao microscópio ocorreram em micrósporos de *C. canephora* e micrósporos vacuolados não foram observados nas preparações de *C. arabica* 'Bourbon' realizadas para este trabalho. Nesse caso, como para as tétrades, visto que são estádios de duração curta, não foram feitas coletas hora a hora, de botões florais em todos os estádios para todos os genótipos a fim de registrar mais imagens. Vale ressaltar que o objetivo do trabalho foi coletar e registrar imagens dos estados citológicos comuns a cafeeiros e relacioná-los com o desenvolvimento das flores e não distinguir genótipos quanto à frequência de tipos celulares em cada estádio ou duração de cada estádio da microgametogênese. Para estas ações de pesquisa futuras, espera-se que as imagens aqui registradas tenham utilidade.

A observação dos micrósporos binucleados recentes, com o núcleo generativo aderido à membrana da célula vegetativa (Figura 2E) e se destacando dela (Figura 2F), foi possível desde botões florais F6, onde os binucleados recentes eram minoria absoluta entre a população de micrósporos extraídos simultaneamente das cinco anteras de cada flor, até flores no estádio F7, onde os binucleados, principalmente os tardios, tornaram-se a maioria (Figura 2). Grãos de pólen em estádio tardio (Figura 2G), que possibilitaram a observação da célula generativa com seu citoplasma, foram encontrados em flores F7, mantidas em ambiente úmido, no refrigerador e dissecadas algumas horas antes de sofrerem antese, flores em antese parcial (F8) e completa (F9).

Grãos de pólen nos estádios florais F7 e seguintes foram capazes de gerar tubos polínicos *in vitro*. Contrariamente ao que ocorre na microsporogênese (Figura 1), a maturação dos grãos de pólen incluiu aumento de tamanho celular (Figura 2A x 2F e micrósporos jovens x micrósporos vacuolados na Figura 2C).

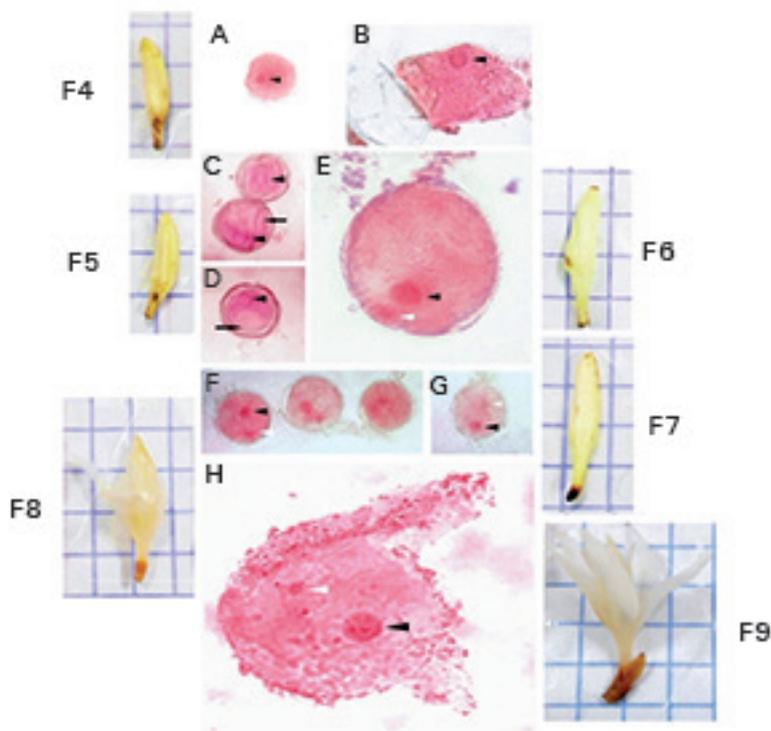


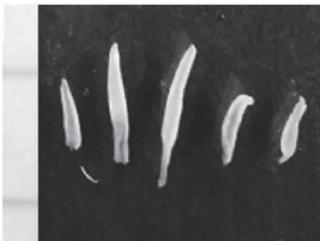
Foto: Paula Cristina da Silva Angelo

Figura 2. Maturação de grãos de pólen de *Coffea* spp. F4-F9 são botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. **A-B:** micrósporo jovem uninucleado, intacto e após a ruptura da parede, por esmagamento. Os fragmentos da parede estão ao lado esquerdo da imagem. **C:** micrósporos jovens uninucleados e micrósporos vacuolados lado a lado. **D:** outro micrósporo vacuolado da mesma preparação. Vacúolos estão indicados por **setas pretas**. **E-H:** micrósporos binucleados jovens, com o núcleo generativo aderido (**E**) e se destacando (**F**) da membrana da célula vegetativa. A visualização do núcleo generativo é dificultada pela presença da parede celular em **G** e mais fácil sem ela em **H**, onde registrou-se um micrósporo binucleado tardio, com o núcleo generativo envolto pela célula generativa que traz um "colar" de pequenas inclusões, imersa no citoplasma da célula vegetativa. **Pontas de seta pretas:** núcleos vegetativos. **Pontas de seta brancas:** núcleos generativos. **A, C-D, F-G:** aumento de 400X. **B, E e H:** aumento de 400X mais zoom de 4X. **Quadrículas atrás dos botões florais** são de 6 mm x 6 mm.

Não foi possível capturar imagens de grãos de pólen trinucleados e não foram encontradas referências bibliográficas sobre a fase em que se dá a segunda mitose do núcleo generativo do cafeeiro.

Além de fatores ambientais citados acima que podem interferir na correspondência exata entre o comprimento de flores e botões florais como aqueles inseridos nas Figuras e estádios de desenvolvimento de micrósporos, ao longo deste trabalho observou-se que há discrepância no comprimento e desenvolvimento das diferentes anteras de uma mesma flor, o que é mais pronunciado em alguns genótipos que em outros. Como exemplo, pode-se observar, na Figura 3, discrepância mais pronunciada em *C. arabica* 'Siriema' que em *C. canephora*, nos estádios F5-F6. Essa discrepância pode contribuir para explicar porque as populações de micrósporos de cada flor podem ser mais ou menos heterogêneas, dependendo, então, também do genótipo do cafeeiro. Além disso, Clément e Pacini (2001) relataram que micrósporos podem perder a sincronia de desenvolvimento tão cedo quanto depois da segunda divisão meiótica e algumas células podem iniciar a diferenciação antes das outras.

A



B



Foto: Paula Cristina da Silva Angelo

Figura 3. Anteras excisadas de flores em estágio F5-F6 de *C. arabica* 'Siriema' (A) e de *C. canephora* (B). O espaço entre escalas à esquerda de cada imagem é de 6 mm.

Conclusões

Os estádios da microsporangênese e da maturação dos grãos de pólen do cafeeiro foram aqui registrados. Os botões florais e flores inseridos nas Figuras devem ser úteis para estimar o estágio de desenvolvimento dos micrósporos que encerram e para orientar coleta de material biológico para investigação complementar, em qualquer um dos campos correlatos à microgametogênese. O desenvolvimento dos botões florais e micrósporos é altamente relacionado a fatores ambientais e a passagem de F1 a F9 pode levar um mês e até quase dois, a depender do ano e do ambiente. Geralmente boa disponibilidade de água determina crescimento e desenvolvimento mais acelerados. De qualquer forma, de posse do resultado do exame ao microscópio de micrósporos coletados uma primeira vez, reconhecendo-se o estágio de desenvolvimento das células por comparação com as Figuras 1 e 2, será possível decidir por coletar botões florais maiores ou menores do que os da primeira coleta para obter micrósporos que estejam exatamente no(s) estágio(s) desejado(s) e planejar melhor as coletas seguintes para fins de pesquisa.

Referências

BEAUZAMY, L.; NAKAYAMA, N.; BOUDAOU, A. Flowers under pressure: ins and outs of turgor regulation in development. **Annals of Botany**, v. 114, n. 2, p. 1517–1533, 2014.

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

CHANG, F.; WANG, Y.; WANG, S.; MA, H. Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 66-73, 2011.

CHINNAPPA, C. C.; WARNER, B. G. Pollen morphology in the genus *Coffea* (Rubiaceae) and its taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 83, n. 3, p. 221-236, 1981.

CHINNAPPA, C. C.; WARNER, B. G. Pollen morphology in the genus *Coffea* (Rubiaceae): II. pollen polymorphism. **Grana**, v. 21, n. 1, p. 29-37, 1982.

CLÉMENT, C.; PACINI, E. Anther plastids in angiosperms. **The Botanical Review**, v. 67, n. 1, p. 54-73, 2001.

CONAGIN, C. H. T. M. Microsporogênese, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congensis* Froehner. **Bragantia**, v. 20, n. 27, p. 669-677, 1961.

COULIBALY, I.; LOUARN, J.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Pollen viability restoration in a *Coffea canephora* P., *C. heterocalyx* Stoffelen backcross. QTL identification for marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 2, p. 311-316, 2003.

FIRON, N.; NEPI, M.; PACINI, E. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. **Annals of Botany**, v. 109, n. 7, p. 1201-1213, 2012.

GARDNER, R. O.; RATTENBURY, J. A. Staining pollen nuclei with snows alcoholic hydrochloric acid-carmin. **Stain Technology**, v. 49, n. 5, p. 257-259, 1974.

HANDLEY, D. F.; JOHNSON, R. S. Late summer irrigation of water-stressed peach trees reduces fruit doubles and deep sutures. **HortScience**, v. 35, n. 4, p. 771, 2000.

MA, H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in overing plants. **Annual Review in Plant Biology**, v. 56, p. 393-434, 2005.

MENDES, A. Velocidade de penetração do tubo polínico em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 20, n. 12, p. 495-502, 1961.

NOWAK, M. D.; DAVIS, A. P.; ANTHONY, F.; YODER, A. D. Expression and trans-specific polymorphism of self-incompatibility RNases in *Coffea* (Rubiaceae). **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120821/>>. Acesso em: 26 maio 2016.

PACINI, E.; JACQUARD, C.; CLÉMENT, C. Pollen vacuoles and their significance. **Planta**, v. 234, n. 2, p. 217-227, 2011.

PARK, S. K.; TWELL, D. Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the *Arabidopsis gemini* pollen mutant. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 899-909, 2001.

PIFFANELLI, P.; ROSS, J. H.; MURPHY, D. J. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, n. 2, p. 65-80, 1998.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; M'RANI-ALAOUI, M.; FERNÁNDEZ, M. C. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma**, v. 221, n. 3-4, p. 237-244, 2003.

SNOW, R. Alcoholic hydrochloric acid-carminé as a stain for chromosomes in squash preparations. **Stain Technology**, v. 38, n. 1, p. 9-13, 1963.

WETZEL, C. L.; JENSEN, W. A. Studies of pollen maturation in cotton: the storage reserve accumulation phase. **Sexual Plant Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 117-127, 1992.



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

