

# OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

## XIX - MICROSPOROGÊNESE EM *COFFEA DEWEVREI*

DIXIER M. MEDINA

*Engenheira agrônoma, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas*

### 1 - INTRODUÇÃO

O comportamento meiótico de algumas espécies e variedades do gênero *Coffea*, vem sendo, desde alguns anos, objeto de investigações pelos técnicos da Secção de Citologia deste Instituto. Assim é que a meiose em diversas variedades de *Coffea arabica* L. já foi descrita, constituindo um processo normal nas variedades tetraplóides ( $2n=44$ ) (4, 6), enquanto que nas formas monosperma ( $2n=22$ ) (1) e bullata ( $2n=66$  e  $88$ ) (3) é bastante anormal. Irregularidades também foram encontradas numa forma tetraplóide, provavelmente um híbrido espontâneo entre *C. arabica* e *C. Dewevrei* (5).

Estudos semelhantes foram efetuados em *Coffea canephora* Pierre ex Frochner ( $2n=22$ ) que, embora auto-estéril, se comporta normalmente no que diz respeito à meiose (7).

No presente trabalho serão apresentadas as observações feitas na microsporogênese de outra espécie diplóide também auto-estéril: *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur.

### 2 - MATERIAL E MÉTODO

Duas plantas da espécie *C. Dewevrei* foram utilizadas para êsses estudos: n.º 63 e n.º 1008, a primeira tida como da variedade *excelsa* e a outra da var. *abeocutæ*.

Ramos com botões pequenos, foram colhidos e conservados em vasos com água, aguardando-se, no laboratório, o estado próprio de desenvolvimento, quando os botões foram fixados numa mistura de 3 partes de álcool absoluto para 1 de ácido acético glacial. O fixador foi renovado após 24 horas e o material conservado em refrigerador. Esta prática de colhêr o material, facilitou sobremaneira o trabalho, podendo-se acompanhar os estágios da meiose no próprio laboratório e permitindo a colheita de maior quantidade de material na fase desejada. O processo da microsporogênese não é perturbado por isso, pelo contrário, as condições de temperatura e umidade são mais propícias e constantes do que no campo.

O processo do exame dos microsporócitos e dos microsporos foi o do esfregaço, sendo a coloração, às vêzes, pelo carmim acético a 50% e, às vêzes, pelo carmim propiônico a 45%.

### 3 - OBSERVAÇÕES REALIZADAS

#### 3.1 - MICRSPOROGÊNESE

Os microsporócitos em prófase inicial mostram uma aglomeração muito intensa dos cromonemas. Mesmo nos estados de leptonema e zigonema só se consegue acompanhar partes dos cromossômios ao longo da sua extensão. Em paquinema, alguns são vistos em seu inteiro comprimento, enquanto outros só em parte (fig. 1-A). Todos apresentam, porém, regiões intensamente coloridas e regiões fracamente coloridas que serão aqui chamadas de "cromáticas" e "acromáticas", respectivamente (2). As partes cromáticas se iniciam junto ao centrômero que é muito nítido, e se alongam por extensões variáveis. Não são homogêneas, mas, sim, intercaladas de pequenas regiões acromáticas. Das partes acromáticas, a maior porção é distal e, por não possuírem aglomerados de cromômeros como as primeiras, dão aos cromossômios o aspecto de filamentos mais finos em certas extensões (fig. 1-B). Alguns dos cromossômios têm as duas partes distais acromáticas (fig. 1-B, a), ao passo que em outros somente um dos braços apresenta a extremidade assim (fig. 1-B, b).

Apesar de serem apenas 11 os pares de cromossômios, não se conseguiu ainda em número suficiente, fase semelhante à da figura 1-B para que eles pudessem ser identificados. O par de cromossômios ligado ao nucléolo possui um braço curto com cerca de 5 regiões muito cromáticas; o braço longo apresenta próximo ao centrômero algumas regiões cromáticas, sendo a parte distal constituída apenas de filamentos pouco cromáticos, que mal se distinguem do citoplasma (fig. 1-C). Une-se ao nucléolo, aparentemente, por uma região situada no braço curto.

Em diaquinese (fig. 1-D) já se observa uma contração relativamente grande dos cromossômios, verificando-se o pareamento íntimo apenas nas regiões acromáticas, sendo que as regiões cromáticas se mantêm afastadas. Na maioria das células examinadas, foram vistos 11 bivalentes. Não se verificaram polivalentes.

Em metáfase I, também foram contados 11 pares de cromossômios. Nota-se nesta fase uma redução muito grande das regiões acromáticas (fig. 1-E).

Muito poucas vezes observaram-se "laggards" em anáfase I; caracteriza-se esta fase por uma distribuição normal dos cromossômios para os polos, como se pode verificar pelos seguintes dados:

#### DISTRIBUIÇÃO DOS CROMOSSÔMIOS EM ANÁFASE I

	<i>N.º de células encontradas</i>	
	<i>Planta 63</i>	<i>Planta 1008</i>
11-11 -----	41	31
11-? -----	6	16
12-10 -----	1	3

Em fins de anáfase I, os cromossômios ainda se apresentam diferenciados em partes cromáticas e partes acromáticas. Provavelmente, estas correspondem às regiões dos quiasmas que se desprenderam (fig. 2-A).

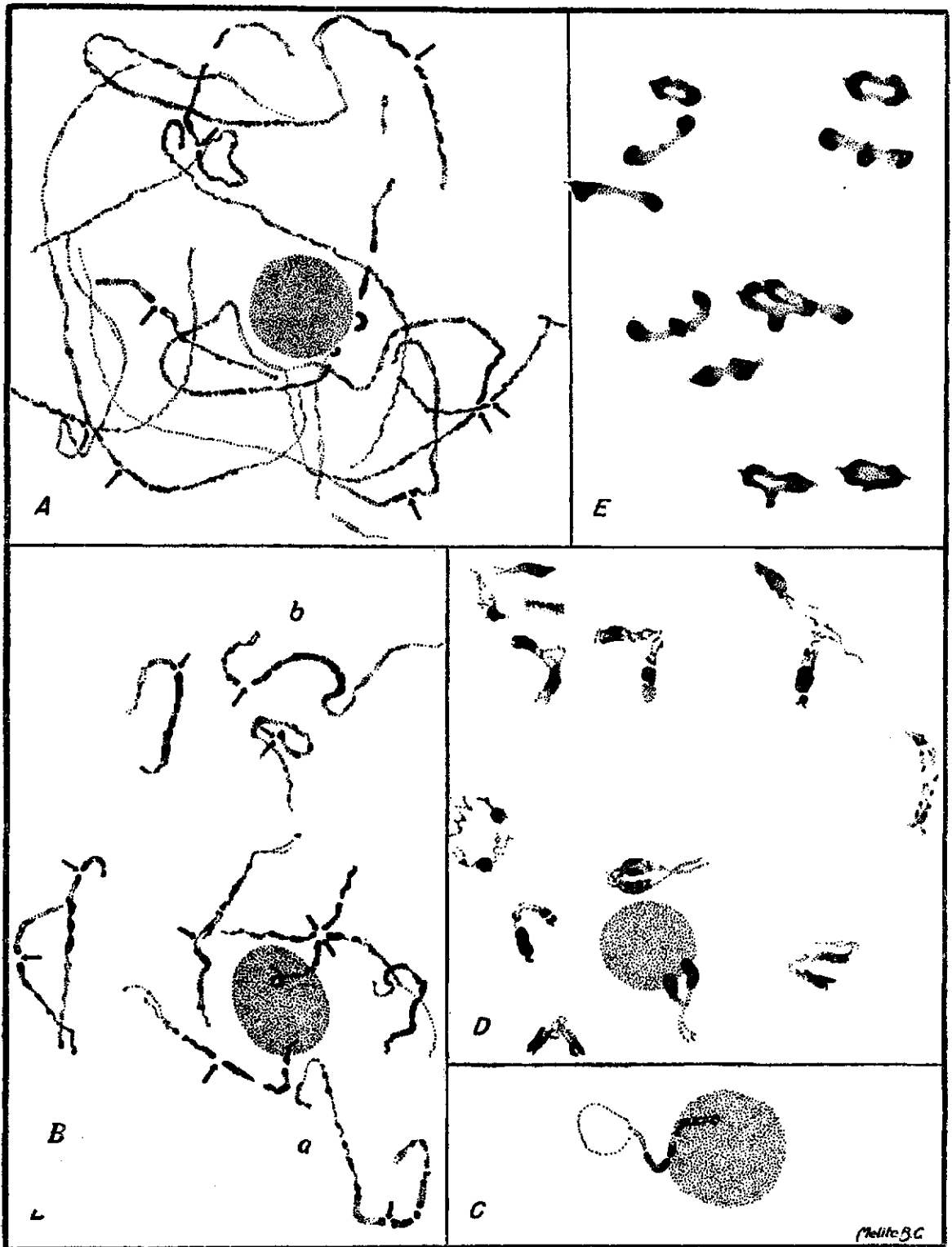


FIGURA 1. — Detalhes da microsporogênese em *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. A — Paquinema; B — paquinema-diplonema; C — o cromossômio ligado ao nucléolo; D — diaquinese; E — metáfase I. A a D (2.140x); E (2.800x).

A segunda divisão meiótica, é também uma ocorrência normal dando como resultado a formação de quatro núcleos de 11 cromossômios cada um (fig. 2-B).

### 3.2. - ESTUDO DO PÓLEN

Assim que se liberta da tetrade, o grão de pólen se prepara para primeira divisão, a qual ocorreu no ambiente do laboratório, um a dois dias após a meiose, ainda antes da antese. A figura 2-C mostra um microsporo em estado de prófase adiantada; de alguns dos cromossômios vêem-se claramente os centrômeros. Seguem-se uma metáfase (fig. 2-D) e uma anáfase (fig. 2-E), sem anormalidades. As anteras deiscentes apresentam microsporos providos de dois núcleos.

Não foi possível observar a segunda divisão no microsporo para a formação dos gametas.

### 3.3 - QUIASMAS

No material estudado, não foi possível analisar os quiasmas em diplonema nem em diaquinese. Nesta fase, observa-se apenas que eles ocorrem nas partes acromáticas distais. Eventualmente, puderam alguns bivalentes em diaquinese ser interpretados quanto ao número de quiasmas. Um exemplo é apresentado na figura 2-F, onde se vêem perfeitamente localizados os centrômeros entre regiões cromáticas e os quiasmas: um de um lado do centrômero e no mínimo três do outro lado.

Do número e da localização dos quiasmas em cada bivalente, depende a configuração apresentada pelo mesmo em metáfase I. Nesta fase, puderam os bivalentes ser analisados sob êstes dois aspectos, verificando-se que os cromossômios apresentam de um a três quiasmas, cuja localização determina configurações como as que se vêem na figura 2-G.

O cromossômio com três quiasmas é bem característico e inconfundível com os demais. Um dos quiasmas se localiza de um lado do centrômero sendo terminal; os outros dois localizam-se no outro lado, no braço longo do cromossômio (fig. 2-G, a) e são intersticiais. Em quase tôdas as células há um único cromossômio assim; porém, às vêzes, êle não é encontrado e, às vêzes, encontram-se dois.

Dos cromossômios com dois quiasmas, dois tipos são bem caracterizados: um em que os quiasmas se localizam do mesmo lado do centrômero e que chamamos assimétricos (fig. 2-G, b), de ocorrência mais rara que o outro, simétrico, com um quiasma em cada lado do centrômero. Neste segundo tipo, ainda se verifica que os quiasmas podem ser ambos terminais (fig. 2-G, c), ambos intersticiais (fig. 2-G, e) ou um terminal e outro intersticial (fig. 2-G, d).

No quadro 1 são apresentados os resultados das observações sôbre número de quiasmas em metáfase I, feitas em 38 células, da planta 1008 (*abeocutæ*).

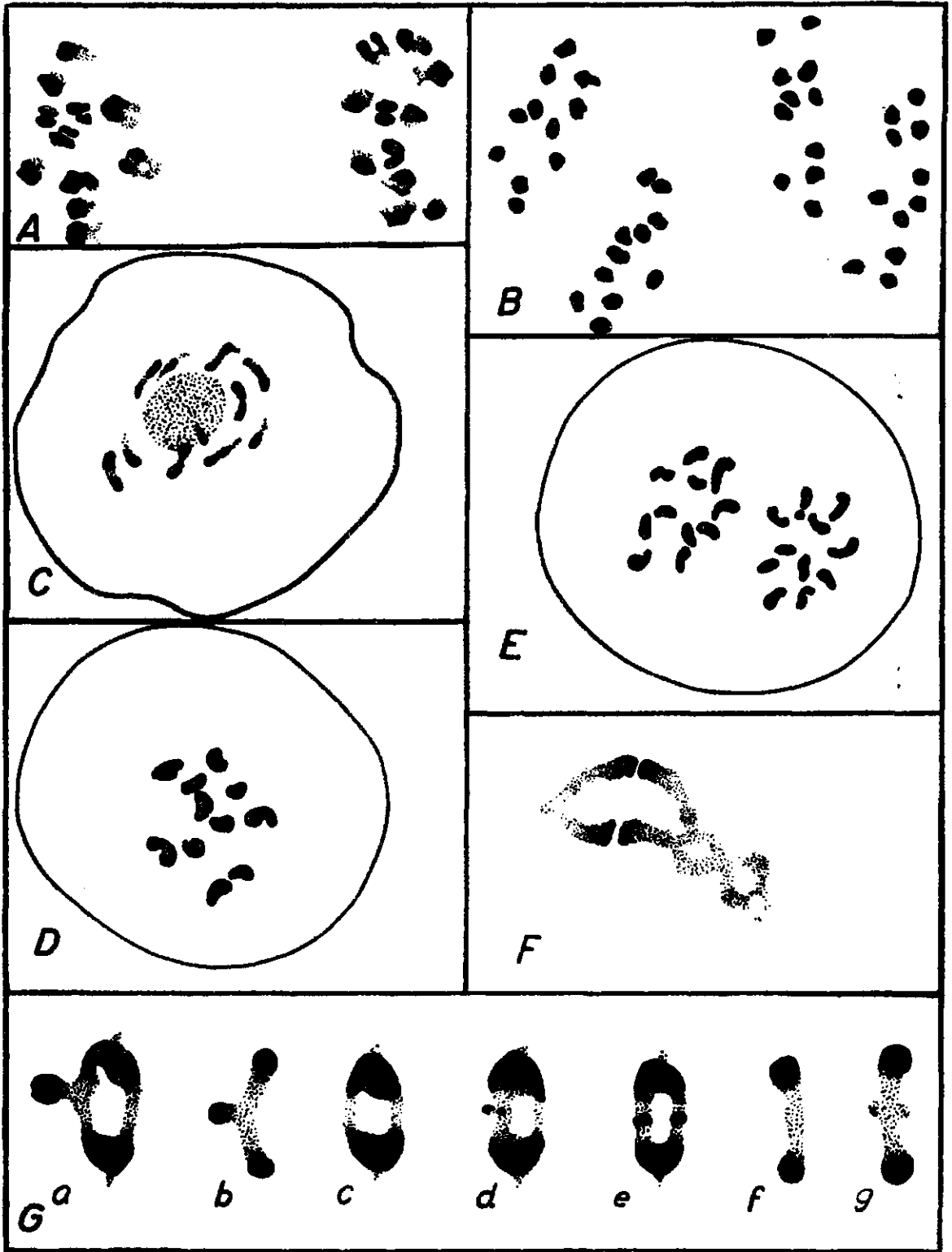


FIGURA 2. — Detalhes da microsporogênese e grão de pólen em *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. A — Anáfase I (2.800x). B — Anáfase II (1.710x). C a E — Microsporo (2.140x). C — Prófase. D — Metáfase. E — Anáfase. F — Aspecto de um par de cromossômios em diaquinese onde se vêem os quiasmas (5.600x). G — Tipos de cromossômios encontrados em metáfase I; a — bivalente com três quiasmas; b a e — bivalentes com dois quiasmas; f e g — bivalentes com um só quiasma.

QUADRO 1.—Observações sobre número de quiasmas e sua distribuição pelos bivalentes em 38 células em metáfase I na planta 1008 da espécie *Coffea Dewevrei*

Tipos de distribuição dos quiasmas pelos onze bivalentes	Frequência de células	Número de bivalentes			Número de quiasmas por célula
		Com 1 quiasma	Com 2 quiasmas	Com 3 quiasmas	
a	1	5	5	1	18
b	4	6	4	1	17
c	2	7	2	2	17
d	11	7	3	1	16
e	2	7	4	0	15
f	1	8	1	2	16
g	11	8	2	1	15
h	3	9	1	1	14
i	1	9	2	0	13
j	1	10	1	0	12
k	1	10	0	1	13
Total	38	286*	95*	37*	587*
Médias		7,5	2,5	1,0	15,4

\* Totais considerando a frequência das células.

Os resultados obtidos em observações da mesma natureza, feitas em 20 células na planta 63 (*excelsa*), podem ser vistos no quadro 2.

QUADRO 2.—Observações sobre número de quiasmas e sua distribuição pelos bivalentes em 20 células em metáfase I na planta 63 da espécie *Coffea Dewevrei*

Tipos de distribuição dos quiasmas pelos onze bivalentes	Frequência de células	Número de bivalentes			Número de quiasmas por célula
		Com 1 quiasma	Com 2 quiasmas	Com 3 quiasmas	
a	1	6	3	2	18
b	6	6	4	1	17
c	9	7	3	1	16
d	3	8	2	1	15
e	1	9	1	1	14
Total	20	138*	61*	21*	323*
Médias		6,9	3,0	1,1	16,2

\* Totais considerando a frequência das células.

Esses dois resultados são perfeitamente concordantes. Aplicando-se o "teste" de  $\chi^2$ , verificou-se que não há diferença significativa entre o número médio de quiasmas encontrados para a planta 63 e os da planta 1008.

Com a finalidade de se estabelecer a média para a espécie *C. Dewevrei*, pode-se juntar os dados dos quadros 1 e 2 (quadro 3).

Verificou-se, assim, que no material observado de *C. Dewevrei*, ocorrem, em média, 7,3 bivalentes com um quiasma, 2,7 bivalentes com dois quiasmas e 1,0 bivalente com três quiasmas. O número total por célula, em metáfase I, é de 15,8 quiasmas.

QUADRO 3.—Cálculo do número médio de bivalentes com 1, 2 e 3 quiasmas para a espécie *C. Dewevrei*, reunindo os totais dos quadros 1 e 2

Totais parciais extraídos	Número de bivalentes			Número de células observadas	: Número de quiasmas
	Com 1 quiasma	Com 2 quiasmas	Com 3 quiasmas		
Quadro 1 -----	286	95	37	38	587
Quadro 2 -----	138	61	21	20	323
Totais gerais -----	424	156	58	58	910
Médias gerais -----	7,3	2,7	1,0	-----	15,8

Os bivalentes com dois quiasmas, são de dois tipos: os “simétricos” e os “assimétricos”. Nas observações de ambas as plantas, ao mesmo tempo que se faziam as contagens dos quiasmas, anotavam-se, também, quantos eram de um e do outro tipo. Assim, dos bivalentes com dois quiasmas (95), encontrados na planta 1008 e que constam do quadro 1, 47 foram classificados em “simétricos” ou “assimétricos”, como se vê no quadro 4.

QUADRO 4.—Dados sôbre a posição dos quiasmas nos bivalentes com 2 quiasmas. Observações efetuadas em 16 células das 38 do quadro 1 em metáfase I na planta 1008 da espécie *Coffea Dewevrei*

Número de bivalentes com 2 quiasmas	Distribuição dos bivalentes segundo a posição dos quiasmas		Frequência das células
	Simétrica	Assimétrica	
5 -----	5	0	1
4 -----	3	1	4
4 -----	2	2	1
3 -----	3	0	2
3 -----	2	1	2
2 -----	1	1	4
1 -----	1	0	1
1 -----	0	0	1
Totais -----	34*	13*	16
Médias -----	21	0,8	-----

\* Totais considerando a frequência das células.

Para a planta 63, foram feitas essas observações em tôdas as 20 células, num total de 61 bivalentes com dois quiasmas. Foram êles classificados como se vê no quadro 5.

A análise dêstes dois quadros, mostra, desde logo, a não concordância entre as frequências relativas dos dois tipos, verificados em cada uma das plantas. Esta falta de concordância, aliás, é comprovada pelo teste de  $\chi^2$ .

Ora, se já havíamos concluído que as duas amostras podem ser tomadas como representativas (em relação ao número de quiasmas) do material

QUADRO 5.—Dados sôbre a posição dos quiasmas dos bivalentes que apresentaram 2 quiasmas. Observações efetuadas nas 20 células do quadro 2 em metafase I na planta n.º 63 da espécie *Coffea Dewevrei*

Número de bivalentes com 2 quiasmas	Distribuição dos bivalentes segundo a posição dos quiasmas		Frequência das células
	Simétrica	Assimétrica	
4	4	0	3
4	3	1	3
3	3	0	9
3	2	1	1
2	2	0	2
2	1	1	1
1	1	0	1
Totais	56*	5*	20
Médias	2,8	0,3	-----

\* Totais considerando a frequência das células.

examinado como sendo *Coffea Dewevrei*, procurou-se uma explicação para a discordância dos dados agora analisados sob outro aspecto.

Os bivalentes com dois quiasmas “assimétricos” ou seja, com dois quiasmas do mesmo lado do centrômero, podem ser considerados como um estado mais adiantado de bivalentes que, momentos antes, apresentassem também um terceiro quiasma do outro lado do centrômero; dependendo, portanto, do seu estado pouco mais adiantado ou atrasado, êles poderiam apresentar-se como bivalentes com dois quiasmas ou com três quiasmas. Aqui estaria também a explicação para a ocorrência de metafase I com mais um par de cromossômios com três quiasmas, além daquele considerado típico que, aliás, é aparentemente maior que os demais.

Os bivalentes com dois quiasmas “simétricos”, ou seja, com um quiasma de cada lado do centrômero, segundo o mesmo raciocínio, apresentar-se-iam, às vezes, com um quiasma único, devido ao desprendimento do outro, sendo classificados, na observação, como bivalentes de um quiasma.

Dependendo, pois, da marcha da terminalização, um grupo de bivalentes apresentar-se-ia com dois quiasmas assimétricos (com, ou sem um terceiro do outro lado do centrômero) e um outro grupo de bivalentes apresentar-se-ia com um quiasma (com, ou não, um segundo, do outro lado do centrômero).

Grupando-se os dados obtidos nas duas séries de observações, têm-se os dados do quadro 6, pelos quais se verifica a perfeita concordância das médias para ambas as variedades estudadas.

#### 4 - RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo da microsporogênese e dos grãos de pólen, feito na espécie *Coffea Dewevrei*, relevou o seguinte:

Nos microsporócitos em paquinema, os cromossômios se apresentam diferenciados em regiões acromáticas e cromáticas. O centrômero é nítido,



QUADRO 6.—Conjunto de observações sôbre número e posição dos quiasmas em metáfase I em duas plantas da espécie *Coffea Dewevrei*. Os quatro tipos de bivalentes são grupados em apenas duas classes

Variedade e número da planta	Número de células	Bivalentes com um quiasma ou dois quiasmas simétricos				Bivalentes com dois quiasmas assimétricos ou três quiasmas			
		Um quiasma	Dois quiasmas simétr.	Total	Média	Dois quiasmas assimetr.	Três quiasmas	Total	Média
Excelsa 63..	20	138	56	194	9,7	21	5	26	1,3
Abeocutæ 1008	17	126	34	160	9,4	14	13	27	1,6
Total.....	37	264	90	354	-----	35	18	53	-----
Média .....	-----	-----	-----	-----	9,6	-----	-----	-----	1,4

completamente acromático. Foi possível reconhecer um par de cromossômios de braços desiguais relacionado com o nucléolo. Liga-se ao mesmo pelo braço curto que é constituído de algumas regiões muito cromáticas. Neste particular, assemelha-se bastante ao descrito em *Coffea canephora*. (7)

Das observações sôbre a ocorrência de quiasmas, feitas em metáfase I nas duas variedades — *abeocutæ* e *excelsa* —, as seguintes conclusões puderam ser tiradas :

- Um par de cromossômios, mais longo que os demais, apresenta-se em metáfase I com três quiasmas, sendo dois no braço maior e um no braço menor.
- Dos cromossômios restantes, 7,3 pares, em média, apresentam um único quiasma, e 2,7, apresentam dois quiasmas.
- Os cromossômios que apresentam dois quiasmas podem ser subdivididos em dois grupos : 1.º os que apresentam um quiasma de cada lado do centrômero e que, eventualmente, terminalizam completamente em um dos braços, passando para o grupo dos bivalentes com um único quiasma ; 2.º os que apresentam os dois quiasmas no mesmo braço do cromossômio e que podem ser tomados como bivalentes que tiveram três quiasmas, um dos quais, no outro braço do cromossômio, se terminalizou completamente.

O comportamento meiótico dos cromossômios em tôdas as fases é normal, tanto no seu pareamento como em sua distribuição para os pólos nas anáfases I e II. Raramente se formam núcleos com 10 ou com 12 cromossômios. Todos os microsporos examinados apresentaram 11 cromossômios.

#### SUMMARY

*Coffea Dewevrei* De Wild. et Th. Dur. is a diploid species with  $2n = 22$  chromosomes. Details on the microsporogenesis are presented in this paper.

From pachynema to diakynesis the 11 bivalents were well differentiated into achromatic and chromatic regions ; the centromere was in all chromosomes surrounded by

deeply chromatic zones. Only one pair of chromosomes was found to be attached to the nucleolus; it has a submedian centromere, the organizing region seeming to be located in the short arm.

Chiasmata were seen in diakinesis and metaphase I; in this later stage they were studied in detail and the chromosomes were classified as follows: a) 1 longer pair with 3 chiasmata; b) 2.7 pairs (average) with 2 chiasmata; c) 7.3 pairs (average) with 1 chiasma.

The 2-chiasmata chromosomes were of two kinds: "symmetric" and "assymmetric", depending on the position of their chiasmata in relation to the centromere.

The anaphase is normal, pollen grains having 11 chromosomes. Very seldom are pollen grains formed with 10 or 12 chromosomes. First mitosis in the microspores occurs before pollen shedding.

It was concluded that microsporogenesis in the coffee plants studied is normal.

#### LITERATURA CITADA

1. **Bachi, O.** Observações citológicas em *Coffea*. VII — A macrosporogênese na variedade "Monosperma". *Bragantia* 1: 483-490. 1941.
2. **Brown, S. N.** The structure and meiotic behavior of the differentiated chromosomes of tomato. *Genetics* 34: 437-461. 1949.
3. **Krug, C. A.** Observações citológicas em *Coffea*. III. Bol. téc. Inst. agron. Campinas 27: 1-19. 1937.
4. **Medina, Dixier M.** Observações citológicas em *Coffea*. XIV — Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K.M.S. *Bragantia* 10: 61-66, fig. 1. 1950.
5. **Mendes, A. J. T.** Observações citológicas em *Coffea*. XII — Uma nova forma tetraplóide. *Bragantia* 9: 25-34. 1949.
6. **Mendes, A. J. T.** Observações citológicas em *Coffea*. XV — Microsporogênese em *Coffea arabica* L.. *Bragantia* 10: 79-87, fig. 1-2. 1950.
7. **Mendes, C. H. T.** Observações citológicas em *Coffea*. XVI -- Microsporogênese, em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10: 97-104, est. 1. 1950.