

# OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

## XIV-MICROSPOROGÊNESE EM *COFFEA ARABICA* L. VAR. *RUGOSA* K.M.C. (1)

DIXIER M. MEDINA (2)

*Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas*

### 1-INTRODUÇÃO

Investigações citológicas estão sendo realizadas para explicar o motivo de não se ter observado, até agora, a ocorrência de plantas com fôlhas enrugadas na descendência do cafeeiro rugosa (*Coffea arabica* L. var. *rugosa* K. M. C.).

A princípio supôs-se que isto poderia estar correlacionado com a ocorrência, no rugosa, de camadas de células com números múltiplos de cromossômios. A análise citológica realizada (1) revelou, no entanto, a existência de um número normal de 44 cromossômios em todos os tecidos estudados, indicando que essa variação não constitui uma quimera citológica.

Sabe-se que o cafeeiro rugosa produz um número muito limitado de frutos. Neste trabalho procurou-se estudar o processo da microsporogênese, a fim de ver se nela ocorre alguma irregularidade que possa explicar essa baixa produtividade. As observações sobre as várias fases da microsporogênese constituem também uma contribuição para o estudo da meiose na espécie *Coffea arabica* L.

### 2-MATERIAL E MÉTODO

Os botões, colhidos e fixados imediatamente em "Carnoy" (três partes de álcool absoluto para uma de ácido acético glacial), foram conservados em refrigerador, durante todo o tempo em que se realizaram êstes estudos, tendo-se o cuidado de renovar o fixador, 24 horas após a colheita. As anteras, para estudo dos microsporocitos e também dos micrósporos, foram coloridas pelo método usual do carmim acético.

O pólen de flores colhidas no dia da sua abertura foi semeado em lâminas com ágar a 0,5 e 15% de sacarose, e examinado 24 horas depois da sementeação.

Todos os desenhos aqui apresentados foram feitos com auxílio da câmara clara.

---

(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.

(2) A autora expressa os seus agradecimentos ao engenheiro agrônomo Antônio José Teixeira Mendes pela orientação dada na execução deste trabalho.

### 3-OBSERVAÇÕES REALIZADAS

#### 3.1-MICROSPOROGÊNESE

O exame dos microsporocitos mostrou, mais uma vez, a dificuldade que apresentam de se colorirem pelo carmim acético, em início de prófase. Neste estado, o nucléolo é relativamente grande e bem colorido. Alguns cromossômios têm uma tendência para permanecer ligados ao nucléolo, à medida que a prófase caminha para um estado mais adiantado, ao passo que os demais cromossômios se espalham mais ou menos uniformemente pelo núcleo. Em diaquinese, dois pares e, às vezes, aparentemente três pares, aparecem ligados ao nucléolo, que então se apresenta mais descolorido. Nesta fase, os cromossômios se mostram bastante contraídos, com uma região cromática bem nítida, que constitui, por assim dizer, um corpo, e uma ou duas regiões não cromáticas, como se fossem prolongamentos do cromossômio. É na região cromática que se situa o centrômero, às vezes bem visível no estado anterior ao de diaquinese. Quando são duas as regiões não cromáticas, o cromossômio se apresenta como um bastonete, com um prolongamento claro, partindo de cada extremidade. Em diaquinese os cromossômios estão pareados, raramente se notando univalentes. Não foram encontrados polivalentes.

A união dos elementos, em pares, se dá pelas partes fracamente cromáticas. As zonas cromáticas se repelem sistematicamente, enquanto um, dois ou três quiasmas se formam nos "prolongamentos". Os cromossômios com um único quiasma apresentam-se em forma de "V", "L" ou "I". Aquêles com dois quiasmas tomam a aparência de um "O" e, quando há mais de dois quiasmas, a aparência do cromossômio é de "OX" (fig. 1-A).

Em diaquinese foram observados, em média, 3,0 bivalentes com três quiasmas, 12,3 com dois quiasmas, 6,3 com um quiasma e 0,3 com nenhum quiasma (quadro 1).

A figura 1-B corresponde a cromossômios num estado anterior à metáfase, que chamamos de prometáfase; nesta fase eles se apresentam mais contraídos e, por esse motivo, mais fortemente coloridos. Em metáfase I, os cromossômios atingem o máximo de concentração e se arranjam em 22 pares, na placa equatorial (fig. 1-C). Esta fase, bem como o início de anáfase (fig. 1-D), se presta para a realização de observações sobre o pareamento dos cromossômios. De dez células examinadas, somente duas apresentavam pares que não se mostravam intimamente associados (uma com um único, outra com dois pares) (quadro 1).

O número de cromossômios sem quiasmas, em metáfase, foi o mesmo observado em diaquinese (0,3 em média). Notou-se, porém, um aumento no número de bivalentes com um único quiasma (de 6,3 para 11,0), e uma redução de bivalentes com dois quiasmas (12,3 para 8,4). O número de bivalentes com três quiasmas também foi reduzido de 3,0 para 2,3. O total de quiasmas, por célula, foi assim reduzido de 40,0 em diaquinese, para 34,7 em metáfase (quadro 1).

A distribuição dos cromossômios, para os pólos em anáfase I, é normal, tendo sido possível contar, em cinco células, 22 cromossômios em cada pólo. Em quatro outras células contaram-se 22 cromossômios em um pólo, não sendo possível a contagem em outro pólo. Em metáfase II contaram-se

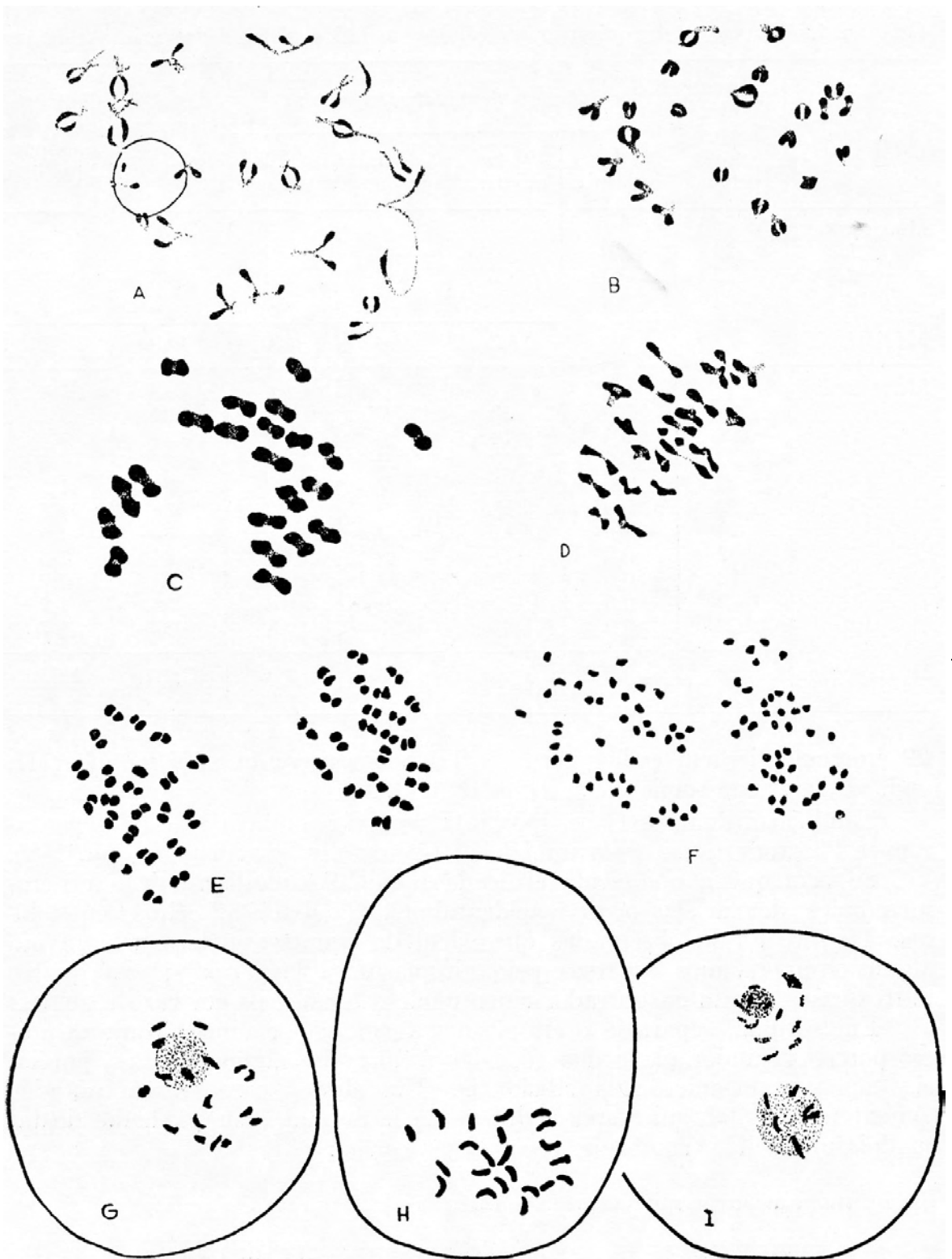


FIGURA 1.—A a F: Meiose na variedade rugosa. A — diaquinese, x 1400; B — prometáfase, x 1400; C — vista lateral da metáfase I,  $n=22$ , x 2800; D — início de anáfase I,  $n=22$ , x 1400; E — metáfase II, onde se vêem 22 pares de cromossômios em cada placa, x 1400; F — anáfase II, onde se contam 22 cromossômios em dois pólos e 44 nos outros dois pólos juntos, x 1400; G a I: Fases da mitose em microsporo: G — microsporo recém-formado, já independente, x 1400; H — metáfase em microsporo  $n=22$ , x 1400; I — microsporo no estado de dois núcleos, x 1400.

QUADRO 1.-Contagem de quiasmas em células meióticas de café da variedade *rugosa*.

Células	Número de bivalentes por célula	Número de bivalentes com :				Total de quiasmas por célula	Número de quiasmas por bivalente
		Nenhum quiasma	Um quiasma	Dois quiasmas	Três quiasmas		
<b>DIAQUINESE</b>							
1	22	1,0	9	10	2	35	1,6
2	22	0,0	5	13	4	43	1,9
3	22	0,0	5	14	3	42	1,9
Média . . . . .	22	0,3	6,3	12,3	3,0	40,0	1,80
<b>METÁFASE I</b>							
1	22	1,0	13	6	2	31	1,4
2	22	0,0	13	6	3	34	1,5
3	22	0,0	13	7	2	33	1,5
4	22	2,0	11	7	2	31	1,4
5	22	0,0	11	9	2	35	1,6
6	22	0,0	11	9	2	35	1,6
7	22	0,0	11	9	2	35	1,6
8	22	0,0	9	10	3	38	1,7
9	22	0,0	9	10	3	38	1,7
10	22	0,0	9	11	2	37	1,7
Média . . . . .	22	0,3	11,0	8,4	2,3	34,7	1,57

22 cromossômios em cada placa. A fig. 1-*E* representa uma metáfase II, onde cada cromossômio já se acha dividido.

Também a anáfase II se apresenta normal; em várias células contaram-se 22 cromossômios em um, dois, três, ou nos quatro pólos (fig. 1-*E*).

Se bem que não fôsem verificadas anomalias na distribuição dos cromossômios, devem elas ocorrer acidentalmente, pois de 82 células em telófase II, sete foram observadas que, além dos quatro núcleos, mostravam alguns cromossômios esparsos pelo citoplasma ("laggards"); em quatro outros casos, foram encontrados cinco núcleos telofásicos em vez de quatro.

Em seguida, separa-se o citoplasma, formando-se uma tétrade de micrósporos. A maior parte das tétrades é normal; algumas vezes, porém, elas apresentam micrócitos adicionais. Em alguns casos foram notados somente dois ou três micrósporos de aparência normal, acompanhados de um ou dois micrócitos, conforme a seguinte relação :

N.º DE MICRÓSPOROS E MICRÓCITOS POR TÉTRADE

<i>micrósporos</i>	<i>micrócitos</i>	N.º de células
4	0	140
4	2	2
4	1	7
3	0	1
3	1 (sem núcleo)	8
2	2 (sem núcleo)	3

### 3.2-ESTUDO DO PÓLEN

É comum observar-se nos micrósporos recém-formados, ainda na forma de tétrade, além do nucléolo grande, sempre bem visível, um outro nucléolo pequeno. Quando já independentes, porém, os micrósporos apresentam, em geral, um núcleo, onde se vê somente um grande nucléolo e os corpúsculos cromáticos, (correspondentes aos cromossômios), em número aproximado de 22 (fig. 1-G).

Logo depois de os micrósporos se tornarem independentes, ocorre uma mitose somática nos micrósporos. Na metáfase desta divisão pôde-se contar  $n=22$  cromossômios (fig. 1-H). Os dois núcleos filhos, resultantes da divisão, apresentam uma nítida diferença no tamanho dos seus nucléolos. Um deles tem um nucléolo grande e conserva-se geralmente em posição central na célula; o outro tem um nucléolo pequeno e vai-se localizar na periferia da célula (fig. 1-I).

O pólen, semeado em lâmina preparada com ágar a 0,5% com 15% de açúcar, germina dentro de poucas horas. Foram preparadas dez lâminas com o pólen de cinco flores (duas lâminas de cada flor). De 1100 grãos de pólen semeados, 758 germinaram, o que corresponde a uma percentagem de germinação de 69%, aproximadamente.

### 4-RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo da microsporogênese na var. *rugosa* de *C. arabica* foi realizado a fim de se obterem dados que pudessem esclarecer não só a baixa produtividade dessa variedade, como também o fato de não se terem ainda observado plantas típicas *rugosa* nas progênies desse cafeeiro, estudadas pela Secção de Genética.

Pequenas irregularidades foram notadas na distribuição dos cromossômios em Anáfase II e na formação dos micrósporos. A grande maioria dos grãos de pólen formados tem  $n=22$  cromossômios.

Houve dificuldade em se examinar a estrutura dos cromossômios em início de prófase. Em diaquinese, dois pares e, às vezes, aparentemente três pares, aparecem ligados ao nucléolo. Nessa fase pôde-se, com relativa facilidade, localizar o centrômero e fazer as contagens dos quiasmas. Observou-se que, em média, 6,6 bivalentes apresentam um só quiasma; 12,3 dois quiasmas e 3,0 bivalentes mostram três quiasmas. Contaram-se, também, os quiasmas formados em metáfase I, notando-se uma redução em seu número; o total por célula é de 40,0 em diaquinese e de 34,7 em metáfase. Estudou-se também a primeira divisão que ocorre nos micrósporos, verificando-se ser normal. Os dois núcleos resultantes diferem em tamanho e na dimensão do nucléolo que encerram. Os grãos de pólen são normais, verificando-se 69% de germinação em meio contendo ágar e sacarose.

O fato de não se terem encontrado ainda plantas *rugosa* na descendência do único exemplar existente dessa variedade, deve ser o resultado do pequeno tamanho das progênies estudadas, o que está correlacionado com a baixa produtividade do *rugosa*. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que essa baixa produtividade não é devida a anomalias na microsporogênese.

## SUMMARY

Only one plant of *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K.M.C., is available for study. Its fruit production is very low. Of the progeny observed, none has reproduced the rugose condition of the leaves characteristic of the parent plant. Previous study has shown that the rugose condition of the leaves could not be considered a somatic chimera because the tissues have a normal number ( $2n=44$ ) of chromosomes.

The present cytological study was undertaken in order to find out if the low yield of the rugose variety could be related to abnormalities in microsporogenesis.

The structure of the chromosomes in early prophase is difficult to study. In diakinesis two pairs and sometimes three pairs of chromosomes appear to be attached to the nucleolus. Also in diakinesis it is possible to locate the centromere in the chromosome pairs and to count the chiasmata. It was observed that an average of 6.6 bivalents show one single chiasma, 12.3 bivalents show two chiasmata and 3.0 bivalents show three chiasmata. The average total number of chiasmata per cell at this phase is 40.0, while at metaphase this number is reduced to 34.7. The first division in the microspore is normal and the resulting two nuclei differ in size and also in the size of their nucleolus.

The pollen grains are normal, giving 69% germination on a medium containing 0.5% of agar and 15% of sucrose.

It is concluded that microsporogenesis is normal and would not appear to be related to the low production of fruits of the rugosa variety. The fact that none of the progeny has reproduced the rugose condition might be due to the limited number of plants observed.

## LITERATURA CITADA

1. Medina, Dixier M. Observações citológicas em *Coffea*. XIII — Observação preliminares em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K.M.C. *Bragantia* 9: 47-51. est. 1. 1949.