

O ENDOSPERMA DE CAFÉ COMO MATERIAL PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS (1)

DIXIER M. MEDINA, engenheira-agrônoma, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo

RESUMO

O endosperma de café foi utilizado, com sucesso, para contagens de cromossomos, tendo-se empregado a técnica daorceina acética para sua coloração.

Foi possível constatar que, na variedade *typica* de *C. arabica* L., todos os endospermas examinados possuíam $3n=66$ cromossomos, enquanto que endospermas com 62, 64, 66 e 68 cromossomos ocorreram em plantas monossômicas ($2n=43$) da referida espécie. Células poliplóides com cerca de 128 e 132 cromossomos foram também encontradas como resultado da endomitose nesse tecido.

A observação direta dos cromossomos de endosperma dá informação exata sobre a constituição citológica dos gametas, inferindo-se daí a provável constituição da progênie.

1 — INTRODUÇÃO

Os estudos citológicos realizados sobre a formação da semente do café mostraram que ela é constituída de endosperma (3). Na primeira fase de desenvolvimento do fruto, a semente é formada apenas por perisperma, que é substituído, depois, pelo endosperma. O tempo decorrido para o desenvolvimento do endosperma varia naturalmente com as diferentes espécies, variedades e linhagens e com as condições climáticas. Em *Coffea arabica* L., no material estudado, a atividade máxima do endosperma foi observada entre 90 e 120 dias após a abertura da flor, quando o endosperma, que ocupava aproximadamente 1/10 do volume do perisperma, passa a ocupar cerca de 8/10 desse volume (5). Embora uma parte desse crescimento se efetue apenas pelo aumento de tamanho das células, a atividade mitótica é muito intensa (3, 5), donde o nosso interesse em verificar a possibilidade de utilizar o endosperma do café como material para contagem de cromossomos.

(1) Recebido para publicação a 20 de março de 1964.

2 — MATERIAL E MÉTODO

Frutinhas novos da *C. arabica* ($2n = 44$) e de algumas plantas monossômicas dessa mesma espécie ($2n = 43$), foram colhidos e os endospermas retirados. A técnica de coloração utilizada para raízes de amendoim (3) e que vem sendo adotada em nosso laboratório para raízes de café, foi também usada para os endospermas com pequena modificação :

a) Fixação em álcool absoluto e ácido acético na proporção de 1:1 ou 3:1 durante 24 horas. Submeter o material ao vácuo, durante cinco minutos, logo após a fixação. Quando necessário, o material pode ser conservado em refrigerador, renovando-se o fixador.

b) Hidrólise em orceína a 2% em ácido acético a 70% (9 partes) e ácido clorídrico N/1 (1 parte). Essa hidrólise é feita a 30°C durante meia hora.

c) Coloração em orceína a 1% em ácido acético a 45%, durante 15 minutos pelo menos.

d) Fazer o esmagamento em uma gôta da mesma orceína a 1%.

Endospermas de dois a três milímetros de diâmetro podem ser retirados facilmente do interior do perisperma, a olho nu. De cada um deles, pode-se fazer duas a quatro lâminas. Endospermas maiores mostram também grande atividade mitótica em algumas regiões, permitindo a sua utilização.

Os desenhos foram executados com câmara clara e as microfotografias foram tiradas no Fotomicroscópio Zeiss.

3 — OBSERVAÇÕES

O exame das lâminas preparadas de acordo com a técnica descrita mostrou que a atividade mitótica no endosperma é, de fato, intensíssima; embora o número de metáfases em vista polar seja pequeno, as pró-fases, que são numerosas, prestam-se ôtimamente para a contagem dos cromossomos: estes se mostram espalhados por todo o núcleo, com os centrômeros bem evidentes (figura 1-A). Notável é que mesmo na metáfase, os cromossomos se apresentam bem separados um dos outros, facilitando muito a sua contagem (figura 1-B).

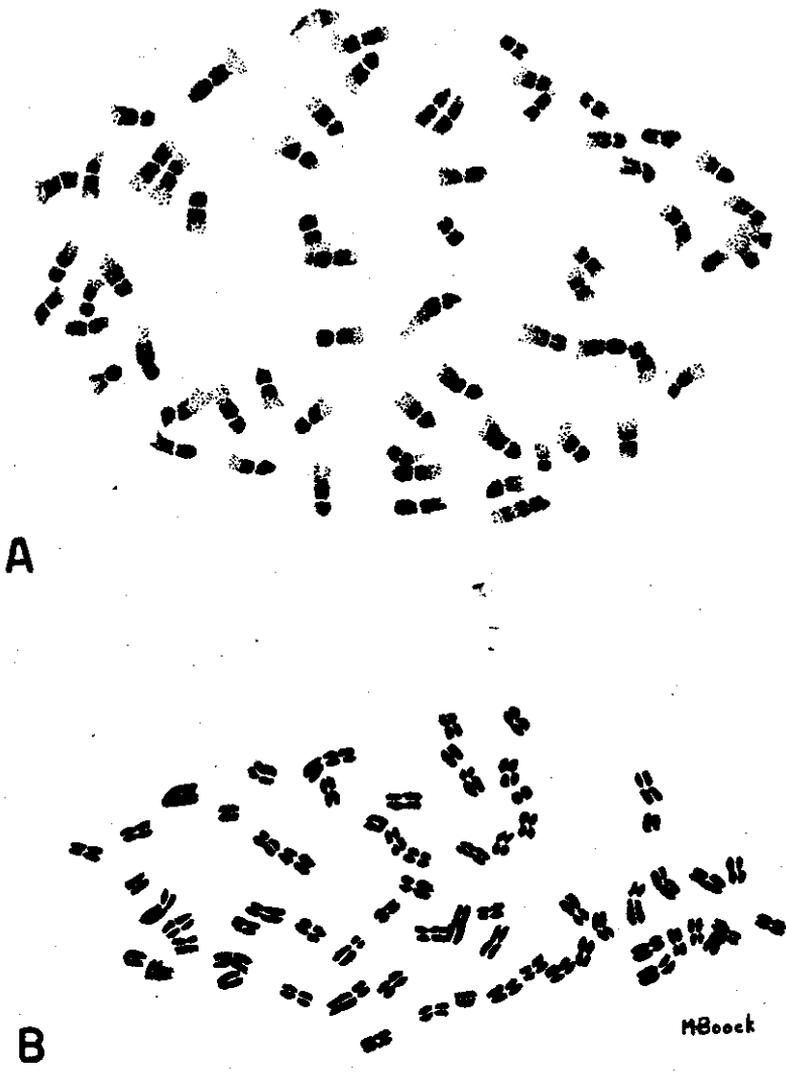


FIGURA 1. — Cromossomos no endosperma de uma planta monossômica de *Coffea arabica* L. ($2n = 43$). A e B — Prófase e metáfase com $3n = 64$ cromossomos. $\times 2.320$.

Os endospermas provenientes da variedade típica continham, todos eles, $3n=66$ cromossomos, estampa 1-B. Entre aqueles das plantas monossômicas, foram encontrados endospermas com 62, 64, 66 e 68 cromossomos. Um exemplo de metáfase, com 64 cromossomos pode ser observado na estampa 1-A.

Em vários dos endospermas examinados, constatou-se a endomitose

num grupo de células; na figura 2, observa-se uma placa metafásica com 128 cromossomos e a estampa 2-A mostra um núcleo com 132 cromossomos pro-fásicos, indicando que os cromossomos se dividiram sem que fossem acompanhados pelo núcleo ou pelo citoplasma. A ocorrência de endomitoses sucessivas pode dar formação a células com número ainda mais elevado de cromossomos, como a que se vê na estampa 2-B, como dois núcleos, cada um dos quais com cerca de 132 cromossomos pro-fásicos.

4 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

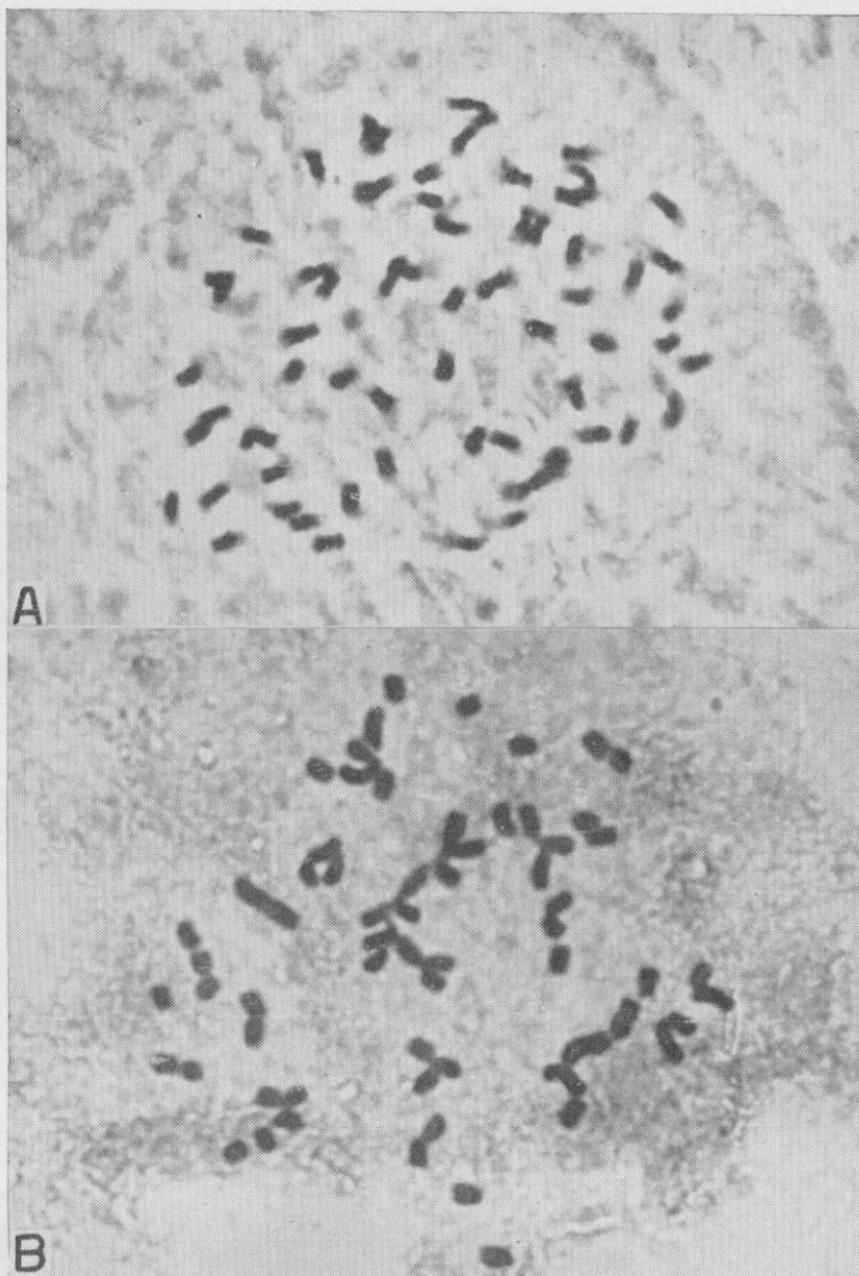
Do exame dos endospermas produzidos por uma planta qualquer, pode-se inferir a constituição citológica dos embriões correspondentes, e, portanto, avaliar como seria constituída sua progênie. No caso da espécie arábica, essencialmente autógena, com mais de 90% de autofecundação (1), isso é possível mesmo quando as flôres sejam deixadas à livre polinização.

Estudos realizados por Mendes (4) em plantas monossômicas, levaram-no à conclusão que, do lado feminino, gâmetas com 21 e 22 cromossomos são funcionais, enquanto que somente os grãos de pólen com 22 cromossomos são capazes de efetuar a fertilização; pode-se agora concluir que também gâmetas femininos férteis com $n=20$ e 23 devem se formar, pois que os endospermas com $3n=62, 64, 66$ e 68 produzidos pelas plantas monossômicas examinadas somente são possíveis, com as seguintes combinações :

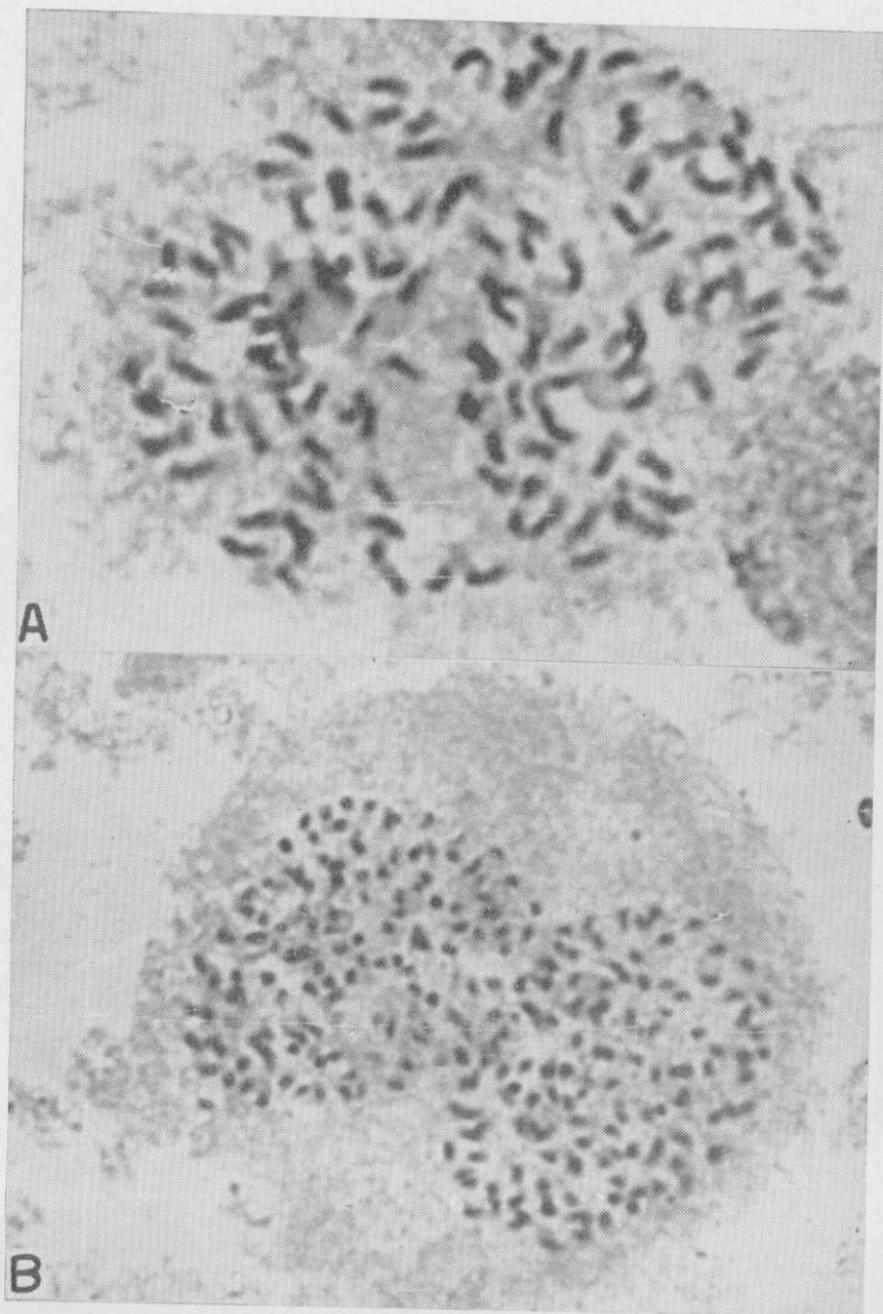
♀	♂	Endosperma
20 + 20	22	62
21 + 21	22	64
22 + 22	22	66
23 + 23	22	68

Por outro lado, as contagens realizadas levam à conclusão que a progênie dessa planta monossômica ($2n=43$) será constituída de indivíduos com 42, 43, 44 e 45 cromossomos. Quanto às proporções relativas em que êsses endospermas se formam nessa e em outras plantas monossômicas, os estudos prosseguem.

A observação direta do número de cromossomos do endosperma tem, portanto, a vantagem de fornecer a informação exata sôbre a



Coffea arabica L. — Microfotografias de cromossomos do endosperma. x 2100
A — Prófase em planta monossômica ($3n = 64$); B — Metáfase em planta normal ($3n = 66$).



Endomitose em *Coffea arabica* L. *A* — Célula duplicada com cerca de 132 cromossomos em prófase. $\times 2100$. *B* — Célula com dois núcleos com cerca de 132 cromossomos cada um. $\times 1640$.

constituição citológica dos gâmetas, o que não poderia ser revelado simplesmente pelo estudo da progênie obtida, sabendo-se que existe a possibilidade da inviabilidade de certos embriões, seja devido ao número anormal de cromossomos ou seja devido à relação numérica entre cromossomos do embrião e do endosperma.

Este processo permite, precocemente, a determinação mais provável dos cromossomos da progênie, sem exigir a sementeira das sementes; dispensa, além disso, todo espaço e material necessário desde a sementeira até a produção de raízes em condições favoráveis para a contagem de cromossomos.

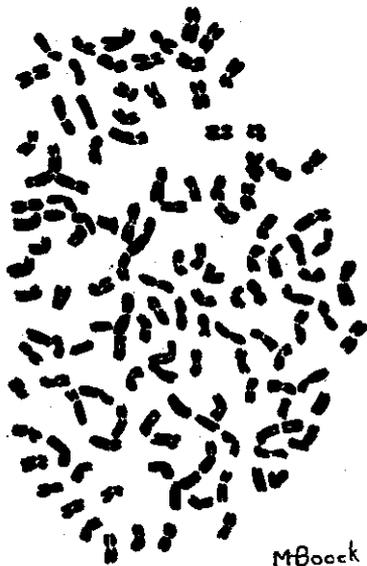


FIGURA 4. — Placa metafásica com 128 cromossomos em endosperma de uma planta monossômica ($2n=43$ de *C. arabica* L. x 2.320

Dada a extraordinária atividade mitótica do endosperma, bem como o grande aumento do volume de suas células, esperava-se encontrar o fenômeno da endomitose, «um dos processos pelos quais o núcleo cresce, acompanhando o crescimento do citoplasma» (6). Realmente, a endomitose foi constatada em vários dos endospermas examinados, produzindo grupos de células com número duplicado e também reduplicado de cromossomos. Pode-se supor, portanto, que a semente do café seja constituída não somente de tecido triploide, mas, também, de «ilhas» de células com outros graus de ploidia.

CHROMOSOME COUNTINGS IN COFFEE ENDOSPERM

SUMMARY

The endosperm tissue of the coffee seed was used successfully for chromosome countings, acetic orcein technique having proved satisfactorily to stain the well spread metaphasic and prophaseic chromosomes.

Endosperms with 62, 64, 66 and 68 chromosomes occur in the monosomic plants of *C. arabica* ($n=43$) while only endosperms with $3n=66$ are formed in the *typica* variety ($2n=44$). Polyploid cells with 128 and 132 chromosomes were also observed and this occurrence was probably the result of endomitosis.

Direct observation of endosperm chromosomes gives the real cytological constitution of fertile gametes, the probable chromosome numbers of the progeny being inferred in advance.

LITERATURA CITADA

1. CARVALHO, A. & KRUG, C. A. Agentes de polinização do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Bragantia* 9:[11]-24. 1949.
2. MEDINA, DIXIER M. & CONAGIN, CÂNDIDA H. T. M. Nova técnica para a contagem de cromossomos do amendoim. (*Arachis hypogaea* L.). *Bragantia* 22:[423]-444. 1963.
3. MENDES, A. J. T. Observações citológicas em *Coffea*. VI. Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 2:[115]-118. 1942.
4. ———. Monosomics in *Coffea arabica* L. *Caryologia*, VI, Vol. supp: 1095, 1954.
5. ———, MEDINA, DIXIER M. & CONAGIN, CÂNDIDA H. T. MENDES. Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café «Mundo Nôvo». *Bragantia* 13:[257]-279. 1954.
6. SERRA, J. A. Genética Geral e Fisiologia. Imprensa de Coimbra, Ltda. 1949. VIII, 448.