

# OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XVII—O SACO EMBRIONÁRIO EM *COFFEA CANEPHORA* PIERRE EX FROEHNER

CÂNDIDA H. T. MENDES

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

## 1-INTRODUÇÃO

Das espécies mais conhecidas do gênero *Coffea*, apenas a espécie *Coffea arabica* L. é autofértil. Todas as demais são auto-estéreis e se multiplicam por fecundação cruzada.

Um plano especial de pesquisas foi elaborado na Secção de Citologia do Instituto Agrônômico, para elucidar o problema da improdutividade de tais espécies nos casos de autopolinização.

Dêsse plano fazem parte, como pontos essenciais, os estudos da formação do grão de pólen e da formação do saco embrionário.

Sobre o primeiro assunto já foram publicadas as nossas observações (9).

Quanto à formação do saco embrionário, sabe-se que Leliveld (6) a estudou na espécie *C. canephora* e em outras espécies e variedades de café, concluindo que ela segue a mesma marcha que na maioria das Angiospermas, formando um saco embrionário do tipo "normal" (7). À mesma conclusão chegaram Faber (2), Graner (3 e 4) e Mendes (8), com relação à espécie *C. arabica*.

No presente trabalho estão reunidas as observações feitas em *C. canephora* sobre as várias fases do desenvolvimento do saco embrionário em relação ao dia da abertura das flores.

## 2-MATERIAL E MÉTODO

As plantas da espécie *C. canephora* que nos forneceram material para este estudo são conhecidas sob os números 748, 801 e P64enx.6 e se encontram na Estação Experimental Central, em Campinas. Os ovários foram colhidos com diversas idades, desde a véspera até 15 dias após a abertura das flores.

Para evitar contaminação de pólen estranho, os botões previamente emasculados foram protegidos com sacos de papel. Essas flores não receberam pólen de espécie alguma, pois a deiscência das anteras, em *C. canephora*, só ocorre depois que as flores se abrem.

A fixação dos ovários foi feita em Craff (10). Em seguida, fizemos a sua inclusão em parafina, pelo método do álcool butílico. Os cortes, longitudinais e de 12 micra de espessura, foram sempre coloridos pela hematoxilina de Heidenhain.

As observações aqui relatadas foram feitas em material das seguintes idades : 1 dia antes da abertura das flores, no mesmo dia, e 1, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14 e 15 dias após. O número de óvulos examinados, em cada idade, variou de 11 a 48 ; apenas num caso (com 14 dias de idade) somente 3 foram examinados. Consideraram-se, nesta contagem, apenas os óvulos em que o saco embrionário se estava formando, ou já se achava formado. Quando as células do nucelo não se apresentaram diferenciadas na região correspondente ao saco embrionário, êsse óvulo não foi contado.

Os desenhos apresentados foram feitos com câmara clara, em microscópio "Zeiss", usando-se a ocular 3 e a objetiva 90x, (fig. 1-A e B) ou a ocular 5x e a objetiva 90x, (fig. 1-C e D).

### 3-OBSERVAÇÕES

O processo do desenvolvimento do saco embrionário em *C. canephora*, examinado nas plantas acima citadas, apresentou-se perfeitamente normal, como o já descrito por Leliveld (6). O macrosoro funcional, por mitoses sucessivas, dá formação a dois, quatro e oito núcleos. Os estágios de quatro e oito núcleos se acham representados nas figuras 1-A e 1-B, respectivamente. Em seguida, os oito núcleos se agrupam, formando o conjunto de células micropilares (duas sinérgides e a oosfera), o conjunto de células chalazais (as três antípodas) e os dois núcleos polares que, por algum tempo, permanecem separados no centro do saco embrionário (fig. 1-C) e depois se fundem (fig. 1-D).

No quadro 1 estão reunidas as observações feitas em ovários de diferentes idades. Os dados correspondentes aos ovários colhidos no mesmo dia da abertura das flores pertencem a flores que não foram emasculadas. Êstes dados, no entanto, podem ser comparados com os demais, porque não houve tempo para que a autopolinização natural tivesse exercido qualquer influência perturbadora no desenvolvimento dos sacos embrionários.

Analisando-se os dados do quadro 1, vê-se que :

a) Na véspera da abertura das flores, os sacos embrionários ainda não estão completos, pois, em 16 óvulos examinados, nenhum ainda tinha atingido o estado de oito núcleos. Predominam os sacos embrionários com dois e com quatro núcleos, havendo também uma pequena percentagem de óvulos nos quais o megasporócito ainda se acha em divisão ;

b) No dia da abertura das flores, já há sacos embrionários com oito núcleos, mas predominam os que ainda estão no estado tetranucleado (60,3%) ;

c) No dia seguinte ao da abertura das flores há uma elevada percentagem (64,3%) de sacos embrionários completos, encontrando-se também alguns mais atrasados, isto é, em início da divisão, com dois e com quatro núcleos ;

d) Em idades mais avançadas, a partir de três dias após a abertura das flores, encontraram-se sempre sacos embrionários completos. Houve

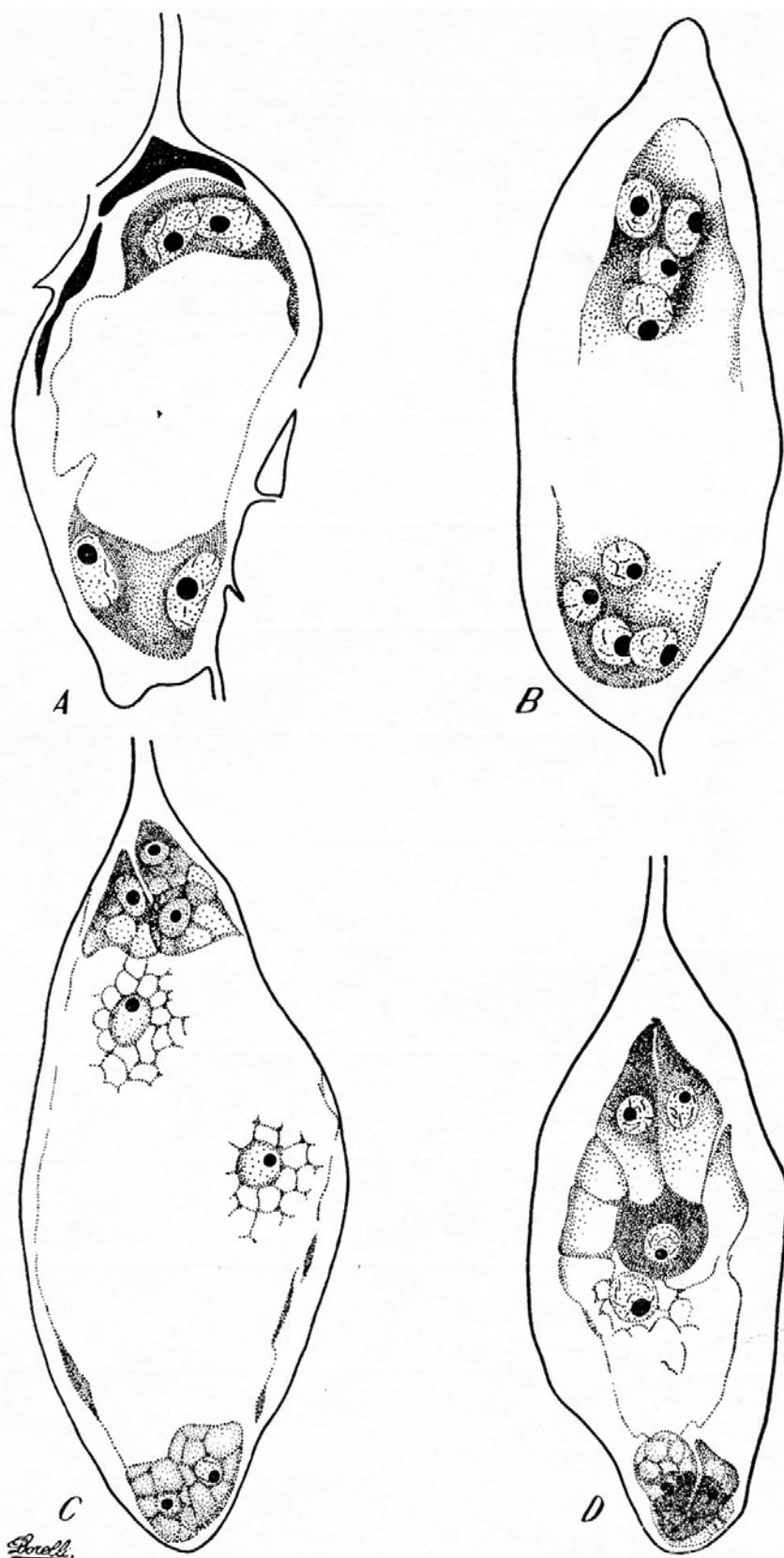


FIGURA 1.-Formação do saco embrionário em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. A — S. E. no estado de quatro núcleos (584 x). B — S. E. no estado de oito núcleos (584 x). C — S. E. completo, com os núcleos polares separados (está faltando uma das antípodas) (513 x). D — S. E. completo, com os núcleos polares fundidos (513 x).

QUADRO 1.-Marcha do desenvolvimento do saco embrionário em *C. canephora*. Número e percentagem de óvulos em diferentes estados de desenvolvimento, examinados em flores colhidas desde a véspera da abertura das flores até quinze dias após

Idade dos óvulos em relação ao dia da abertura das flores	Divisão do megasporócito				Estado do saco embrionário				Óvulos com sacos embrionários de difícil interpretação		Número de óvulos examinados		
	Primeira		Segunda		Dois núcleos		Quatro núcleos		Oito núcleos				
	Número de óvulos	Per-centagem	Número de óvulos	Per-centagem	Número de óvulos	Per-centagem	Número de óvulos	Per-centagem	Número de óvulos	Per-centagem		Número	Per-centagem
Um dia antes	2	12,5	1	6,3	5	31,3	6	37,5	---	---	2	12,5	16
No mesmo dia	2	4,2	6	12,5	5	10,4	29	60,3	5	10,4	1	2,1	48
Um dia depois	---	---	---	---	2	14,3	3	21,4	9	64,3	---	---	14
Três dias depois	---	---	---	---	---	---	1	7,7	12	92,3	---	---	13
Quatro dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	13	100,0	---	---	13
Cinco dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	12	100,0	---	---	12
Sete dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	13	92,9	1	7,1	14
Onze dias depois	---	---	---	---	---	---	1	10,0	9	90,0	---	---	10
Doze dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	10	100,0	---	---	10
Treze dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	11	100,0	---	---	11
Catorze dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	3	100,0	---	---	3
Quinze dias depois	---	---	---	---	---	---	---	---	14	100,0	---	---	14

apenas uma exceção: entre os óvulos de flores colhidas onze dias após a abertura, foi encontrado um com o saco embrionário no estado tetranucleado.

Em sacos embrionários com a idade de sete dias notou-se que as antípodas se apresentam escuras e em estado de degenerescência; com a idade de quinze dias, êsse aspecto de degenerescência se estende também às células micropilares, de modo que a maioria dos sacos embrionários examinados com esta idade se apresentou cheia de manchas escuras e com as células deformadas.

Foi notado que a partir de cinco dias depois da abertura das flores o citoplasma da oosfera apresenta inclusões muito semelhantes às que foram encontradas por Mendes (8) em *C. arabica*.

No decorrer do estudo sobre a formação do saco embrionário em *C. canephora* foi possível fazer observações sobre a época da fusão dos núcleos polares e dos respectivos nucléolos.

No quadro 2 estão resumidos os dados dessas observações. Nêles se nota que, até a idade de três dias após a abertura das flores, o número de sacos embrionários com núcleos polares fundidos é praticamente igual aos dos que os têm ainda separados. Também se nota que, dos núcleos polares fundidos, metade tem os nucléolos fundidos e metade os tem separados. Em sacos embrionários mais velhos (quatro dias em diante) só se observam núcleos polares fundidos; é muito raro encontrá-los separados, como se vê entre os que foram examinados com cinco dias de idade. Quanto aos nucléolos, existe uma percentagem baixa dos que ainda se encontram separados em núcleos polares de mais de três dias de idade.

QUADRO 2.-Número e percentagem de sacos embrionários com núcleos polares fundidos ou separados, e número e percentagem de núcleos polares fundidos com os nucléolos fundidos ou separados. Dados obtidos em óvulos de flores colhidas em diferentes dias após a sua abertura

Idade dos óvulos, em dias, após a abertura das flores	Sacos embrionários examinados		Sacos embrionários com núcleos polares separados		Sacos embrionários com núcleos polares fundidos		Núcleos polares fundidos examinados			Núcleos polares fundidos com nucléolos separados		Núcleos polares fundidos com nucléolos fundidos	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	N.º	%	N.º	%		
1	8		4	50,0	4	50,0	4	2	50,0	2	50,0		
3	13		7	53,8	6	46,2	6	3	50,0	3	50,0		
4	12		0	0,0	12	100,0	12	4	33,3	8	66,7		
5	12		1	8,3	11	91,7	11	2	18,2	9	81,8		
7	13		0	0,0	13	100,0	13	3	23,1	10	76,9		
11	8		0	0,0	8	100,0	8	1	12,5	7	87,5		
12	10		0	0,0	10	100,0	10	2	20,0	8	80,0		
13	11		0	0,0	11	100,0	11	1	9,1	10	90,9		
14	3		0	0,0	3	100,0	3	0	0,0	3	100,0		
15	11		0	0,0	11	100,0	11	4	36,4	7	63,6		

## 4-RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo da marcha do desenvolvimento do saco embrionário em *C. canephora* revelou que êle se forma normalmente, sendo constituído por duas sinérgides e uma oosfera na região micropilar, três antípodas na região chalazal e dois núcleos polares no centro da cavidade. No aspecto e disposição das células e dos núcleos polares, êle é idêntico ao de *C. arabica*.

Nota-se, entretanto, um pequeno atraso na sua formação. Em *C. arabica*, o saco embrionário já se acha formado antes da abertura das flores (8). Em *C. canephora* é muito baixa a frequência de sacos embrionários completos, em flores colhidas no mesmo dia da antese.

Nos sacos embrionários de cinco dias em diante nota-se que a oosfera apresenta inclusões idênticas às encontradas por Mendes (8) em *C. arabica*.

A fusão dos núcleos polares se dá quatro dias após o florescimento; entretanto, também se podem encontrar núcleos separados, em ovários de flores mais velhas.

As antípodas começam a degenerar aos sete dias e, com quinze dias, a maioria dos sacos embrionários se apresenta com tôdas as células alteradas.

Com relação ao problema da auto-esterilidade, pode-se excluir a macroporogênese como uma possível causa dêste fenômeno, em *C. canephora*. O pequeno atraso que se observou na formação dos sacos embrionários não seria empecilho à fertilização, uma vez que êles se mantêm perfeitos durante uns cinco dias. Além disso, o pólen destas plantas tem provado ser fértil em cruzamentos realizados no dia seguinte ao da abertura das flores.

## SUMMARY

A study has been made of the embryo sac in self-sterile *Coffea canephora* flowers of different ages. The process was observed to be normal and included the formation of two synergides and one egg cell in the micropilar region, three antipodals at the chalazal region and two polar nuclei lying in the middle of the sac.

It is known that in the species *C. arabica* the embryo sac formation is complete at the time the flowers open. Embryo sac formation in *C. canephora* is slightly delayed and it is not complete until the day following opening of the flowers.

It was also determined that in *C. canephora* shedding of pollen begins shortly after the flowers open and the pollen was functional at least for two days. Thus the results of the present study indicate that the self-sterility of *C. canephora* flowers is not due to the delay in formation or abnormal development of the embryo sac.

## LITERATURA CITADA

1. **Chevalier, A.** *Em Les cafeiers du globe.* Fasc. 1 pág. 1-196. Paulo Le Chevalier, Paris. 1929.
2. **Faber, F. C.** Morphologische-physiologische untersuchungen an Blüten von *Coffea*-arten. *Annales du Jardin Bot. de Buitenzorg*, 2.<sup>e</sup> série, 25 : 29-160. 1912.
3. **Graner, E. A.** Megasporogenesis in *Coffea arabica* L. *Arq. Inst. Biol. Veg. Rio de Janeiro* 3 : 69. 1936.
4. **Graner, E. A.** Embriogênese de *Coffea* I — Desenvolvimento do óvulo em *C. arabica* L. *Anais Primeira Reunião Sul-Americana de Botânica* 3 : 193-201. 1938.
5. **Krug, C. A.** Contribuição para o estudo da Citologia do gênero *Coffea*. *Bol. Téc. Instituto Agronômico de Campinas* 11 : 1-8. 1934.
6. **Leliveld, J. A.** Formação dos frutos no cafeeiro. *Archief. V. d. Koffiecultuur in Ned. Indie* 3 : 127-167. 1939.
7. **Maheshwari, P.** The Angiosperm Embryo-sac. *Bot. Rev.* 14 : 1-56. 1948.
8. **Mendes, A. J. T.** Observações Citológicas em *Coffea*. VI — Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 2 : 115-125. 1942.
9. **Mendes, C. H. T.** Observações citológicas em *Coffea* XVI — Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10 : 97-104, est. 1. 1950.
10. **Randolph, L. S.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *St. Tecn.* 10 : 95-96. 1935.