

# BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 24

Campinas, agosto de 1965

N.º 29

## NOVAS OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS NO ENDOSPERMA DE CAFÉ (1)

DIXIER M. MEDINA, engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo

### RESUMO

Contagens de cromossomos foram efetuadas em endosperma de algumas espécies de *Coffea*, empregando-se a técnica daorceína acética, já referida em trabalho anterior.

Os resultados encontrados para *C. arabica* (variedades *typica*, *semperflorens*,  $2n=44$ , e plantas monossômicas,  $2n=43$ ); *C. canephora*,  $2n=22$ , *C. dewevrei*,  $2n=22$ , *C. eugenioides* x *C. kapakata*,  $2n=22$  e *C. eugenioides* duplicado,  $2n=44$ , são discutidos em cada caso.

Em todo o material estudado foi constatada a endomitose. O endosperma é, no início, um tecido de constituição  $3x$ , transformando-se depois num tecido quimérico com células polissomáticas de diferentes graus.

As numerosas figuras conseguidas, que permitiram contagens ou microfotografias, confirmam que, no cafeeiro, o endosperma é um material favorável para pesquisas citológicas.

### 1 — INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (8) foram relatadas as observações feitas no endosperma de *C. arabica* L. var. *typica* ( $2n=44$ ) e em plantas monossômicas ( $2n=43$ ) da mesma espécie. Foi possível, empregando-se a técnica daorceína (9, 10), devidamente adaptada para o material em questão, contarem-se os cromossomos no endosperma, o que passou a representar mais um recurso para estudos citológicos no café.

No decorrer dessas observações, verificou-se o fenômeno da endomitose, através do qual aparecem no endosperma células polissomáticas com número duplicado e reduplicado de cromossomos, além das inicialmente formadas ( $3x$ ).

Os estudos tiveram prosseguimento a fim de verificar: 1.º se a técnica poderia ser aplicada a outras espécies de café; 2.º se, nas plantas normais de *C. arabica*, os endospermas formados continham todos

(1) Parte deste trabalho foi apresentada na XVI Reunião da S. B. P. C. realizada em Ribeirão Preto de 5 a 13 de julho de 1964. Recebido para publicação em 14 de julho de 1965.

os 66 cromossomos; e 3.º) se o fenômeno da endomitose se processava, também, em outras espécies de *Coffea*.

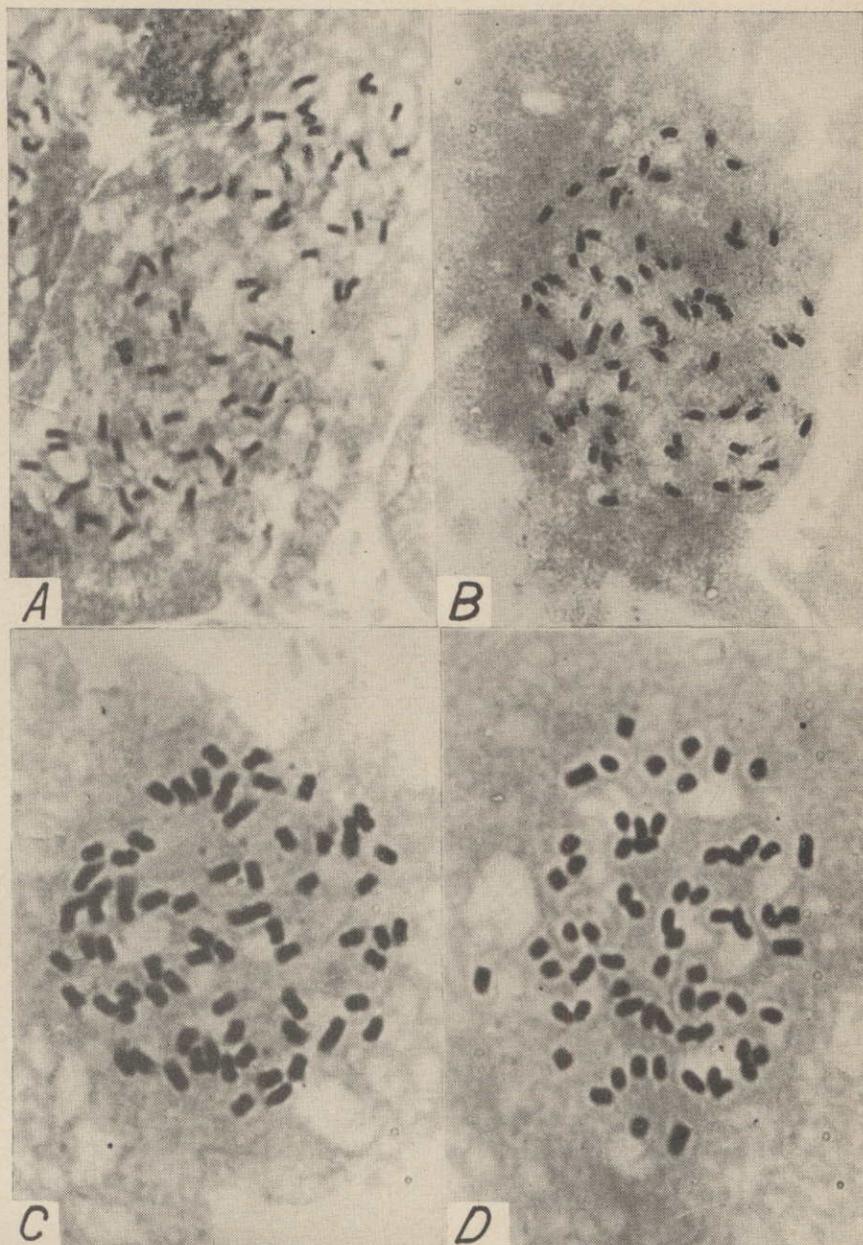
Para isso, novas observações foram feitas tanto em endospermas de outras plantas da espécie arábica como também de outras espécies, a saber: *C. canephora* ( $2n=22$ ), *C. dewevrei* ( $2n=22$ ), um híbrido entre *C. eugenioides* e *C. kapakata* ( $2n=22$ ) e *C. eugenioides* duplicado ( $2n=44$ ) (7). Os resultados dessas observações são apresentados e discutidos neste trabalho.

## 2 — OBSERVAÇÕES

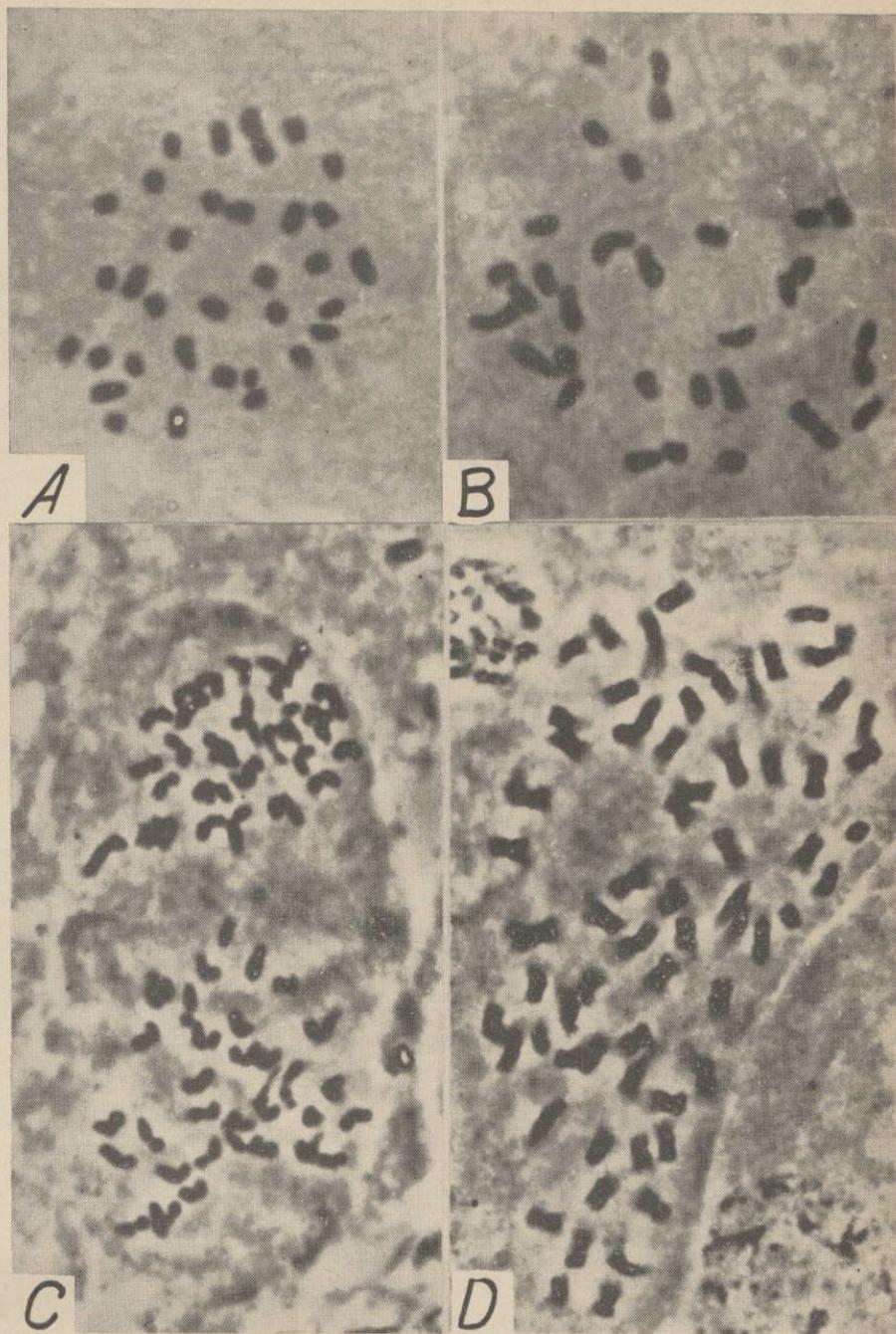
Numerosas foram as figuras bem coloridas que permitiram contagens dos cromossomos e obtenção de microfotografias. As observações

QUADRO 1. — Contagens de cromossomos realizadas no endosperma de algumas espécies de *Coffea*

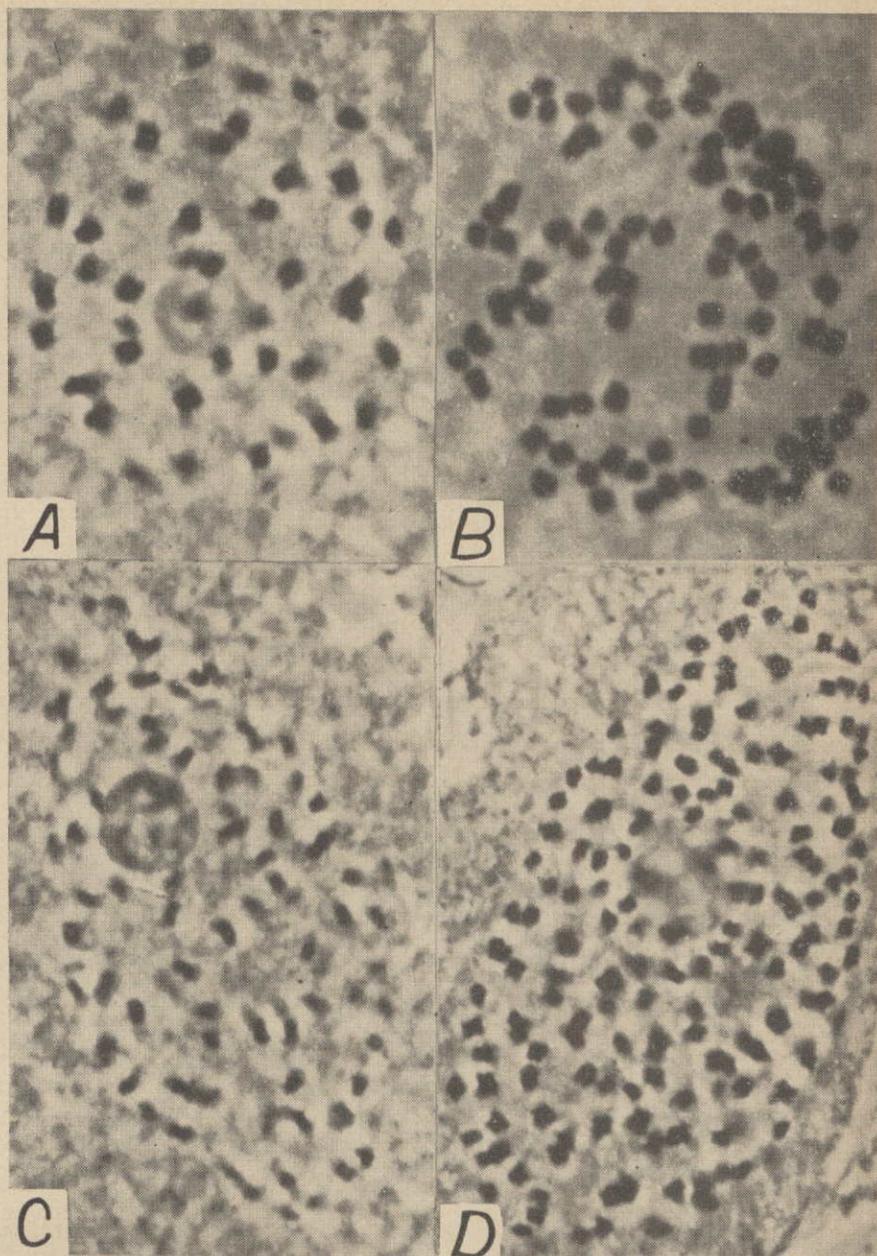
Espécies estudadas	Endospermas		Endomitose	
	Freq.	n.º de crs.	(n.º de crs.)	
<i>C. arabica</i>				
var. <i>typica</i> ( $2n=44$ ) .....	15	66	132	264
" <i>semperflorens</i> ( $2n=44$ ) .....	7	66		
pls. monossômicas ( $2n=43$ )				
. Cit. 1442.....	1	62		
	19	64	128	
	12	66	132	
	1	68		
Cit. 1448.....	10	64		
	6	66		
Cit. 1454.....	1	62		
	4	64		
	8	66		
<i>C. canephora</i> ( $2n=22$ ) .....	16	33	66	
	3	34		
<i>C. dewevrei</i> ( $2n=22$ ) .....	9	33	66	
	1	35		
	1	44	88	176
<i>C. eugenioides</i> x <i>C. kapakata</i> ( $2n=22$ ) .....	6	44	88	176
	2	46	92	184
<i>C. eugenioides duplicado</i> ( $2n=44$ ) .....	1	53	106	
	1	64		
	1	66		
	1	67		
	1	68		
	1	69		



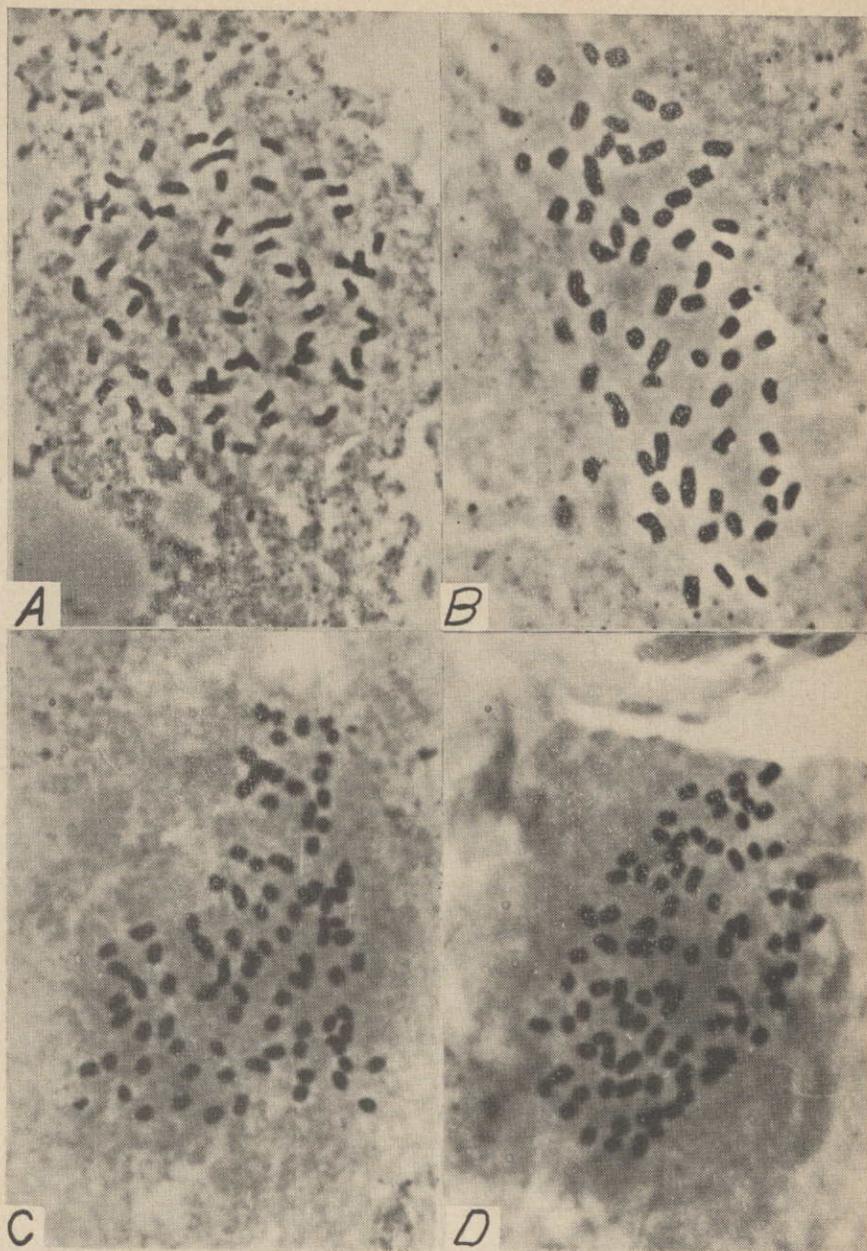
*Coffea arabica* var. *sempervlorens*. A — D. Fases da mitose no endosperma com 66 cromossomos; A a C: Prófase em três graus de adiantamento. D: Metáfase. A x1050, B x1380. C e D x1720.



*Coffea canephora*. Endosperma. A e B — Metáfases com 34 e 33 cromossomos, respectivamente. A x2300, B x2240. C — Anáfase em que se contam 33 cromossomos dirigindo-se a cada polo. x2240. D — Prófase com 66 cromossomos. x2370.



*Coffea eugenioides* x *C. kapakata*. Endosperma. *A* — Prófase com 46 cromossomos, x1840. *B* — Metáfase com 92 cromossomos, x2300. *C* — Prófase com 92 cromossomos, x1440. *D* — Prófase com 184 cromossomos, x1480.



Mitose no endosperma. *A e B* — *Coffea eugenioides* duplicado. *A* — Prófase com 66 cromossomos. x1380. *B* — Metáfase com 64 cromossomos. x1770. *C e D* — *Coffea dezweveri*. Metáfase com 88 cromossomos. x1770.

nem sempre foram feitas em placas metafásicas; a maioria das contagens se realizou em prófases, as quais têm a vantagem de um maior espalhamento dos cromossomos.

Os resultados das determinações efetuadas, sejam elas referentes ao número normal de cromossomos esperado, sejam relativas à endomitose, estão condensados no quadro 1.

### 2.1 — ENDOSPERMAS 3X OU APROXIMADAMENTE 3X

a) *Coffea arabica* L. — Os endospermas das variedades *typica* e *semperflorens* ( $2n=44$ ) continham, todos,  $3x=66$  cromossomos (estampa 1-A a D), ao passo que aquêles das plantas monossômicas ( $2n=43$ ) apresentavam 62, 64, 66 ou 68 cromossomos. Êstes endospermas correspondem, muito provavelmente, às seguintes combinações gaméticas:

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

Tais números poderiam ser obtidos através de outras combinações gaméticas, como:

♀	♂	Endosperma
21 + 21	20	62
22 + 22	20	64
23 + 23	20	66
24 + 24	20	68

nas quais a fertilização teria sido efetuada por grãos de pólen com 20 cromossomos. Neste caso, porém, ter-se-ia que admitir que pólen com 21 e 23 cromossomos poderia funcionar, e endospermas com 61, 63, 65 e 67 cromossomos seriam encontrados. O fato de só aparecerem endospermas com números pares sugere que só o pólen com 22 cromossomos foi fértil, ao passo que, do lado feminino, gâmetas  $n=20, 21$  e  $23$  foram funcionais, além dos normais com 22.

Conclui-se, portanto, que embriões com 42, 43, 44 e 45 cromossomos podem formar-se a partir de monossômicas ( $2n=43$ ) de *C. arabica*.

b) *Coffea canephora* Pierre ex Froehner — Nesta espécie ( $2n=22$ ) encontraram-se, como era esperado, 33 cromossomos nos endospermas examinados (estampa 2-B, C e D), tendo sido possível observar, com facilidade, alguns cromossomos com satélites. Em alguns endospermas havia 34 cromossomos (estampa 2-A), indicando fertilização por pólen com 12 cromossomos. Sendo a espécie *canephora* auto-estéril, sabe-se que tal pólen é proveniente de outra planta, seja da mesma espécie ou de outra espécie diplóide situada nas proximidades.

c) *Coffea dewevrei* De Wild et Th. Durand — Determinações também foram feitas nesta outra espécie diplóide, encontrando-se, na maior parte dos endospermas, 33 cromossomos. Dois casos fugiram ao normal:

1) com 35 cromossomos, o que é muito provavelmente o resultado da combinação  $12 + 12 + 11$ , levando à conclusão que a planta estudada formou gâmetas femininos férteis com 12 cromossomos.

2) com 44 cromossomos, os quais ter-se-iam formado a partir de  $11 + 11$  cromossomos do lado feminino e 22 do pólen. Pólen com tal constituição poderia ser proveniente da espécie *arabica*, do 387 (5), que também está próximo, ou de um gâmeta não reduzido da própria *dewevrei*.

d) *C. eugenoides* Moore x *C. kapakata* Hirschfeldt — As duas espécies envolvidas neste cruzamento são diplóides, sendo também diplóide o híbrido mencionado. É de se esperar, porém, que a meiose dessa planta seja anormal. De fato, encontraram-se, em alguns endospermas estudados, 44 e 46 cromossomos (estampa 3-A) os quais se devem ter formado, provavelmente, pelas seguintes combinações de gâmetas:  $11 + 11 + 22$  e  $12 + 12 + 22$ .

Apesar do número relativamente pequeno de endospermas examinados, oito, pode-se supor que, nessa planta, gâmetas femininos com 11 ou com número de cromossomos próximo de 11 são formados com maior freqüência ou têm mais possibilidades de ser férteis.

Tratando-se de duas espécies auto-estéreis, e estando tal planta rodeada de exemplares de *C. arabica*, deduz-se que, muito provavelmente, o pólen com  $n=22$  proveio desta última espécie.

e) *C. eugenoides* duplicado — É um exemplar *C. eugenoides* ( $2n=22$ ) que foi tratado com colchicina (7), visando à duplicação dos

cromossomos. Em contagens realizadas em seis endospermas encontraram-se 53, 64 (estampa 4-A), 66 (estampa 4-B), 67 e 69, indicando que o número de cromossomos foi, de fato, duplicado ( $2n=44$ ); conclui-se que a fertilização foi efetuada por gâmetas com número de cromossomos diferente de 22, resultantes de meiose irregular.

## 2.2 — OBSERVAÇÕES SOBRE A ENDOMITOSE

De modo geral, a endomitose foi observada em todo o material estudado. Assim é que, em quase todos os endospermas examinados, grupos de células com diferentes graus de ploidia foram observados. Em *C. arabica* ( $2n=43$  e  $2n=44$ ) havia células com 128 e 132 cromossomos, correspondendo à duplicação daquelas com o número inicial de 64 e 66, respectivamente. Em *C. canephora* ( $2n=22$ ) e *C. dewevrei* ( $2n=22$ ) apareceram zonas de células com 66. No citado endosperma de *C. dewevrei* com 44 cromossomos a endomitose produziu células com 88 (estampa 4-C e D) e 176; no híbrido *C. eugenioides* x *C. kapakata* ( $2n=22$ ), células com 88 e 92 (estampa 3-B e C) são o resultado da endomitose em endosperma de 44 e 46 cromossomos; a repetição da endomitose levou à formação de células com 176 e 184 cromossomos, respectivamente (estampa 3-D). No material de *C. eugenioides* duplicado ( $2n=44$ ) o endosperma de 53 cromossomos produziu também células com 106 cromossomos.

## 2.3 — EMPRÊGO DO TÊRMO ENDOMITOSE

O aparecimento de células poliplóides no periblema da raiz em *Spinacia* é referido por Berger (2) como **polissomatia**.

Witkus (15) considera que o termo endomitose só deve ser empregado nos casos em que tenha sido possível observarem-se as quatro fases: **endoprófase**, **endometáfase**, **endoanáfase** e **endotelófase**, tais como foram descritas por Geitler pela primeira vez.

Segundo Lorz (6), porém, a tendência, por parte de muitos investigadores, em usar o termo **endomitose** para aplicar a todos os casos em que reproduções repetidas dos cromonemas ocorrem dentro de uma membrana nuclear intacta, não é sem justificativa. Revela a necessi-

dade de um termo simples, incluindo todos os fenômenos intranucleares que resultem em reproduções extranumerárias dos cromonemas.

Serra (12) emprega o termo **endomitose** para designar um fenômeno geral da multiplicação dos cromossomos que não é acompanhada pela divisão nuclear. Refere-se aos cromossomos politênicos como um caso extremo de endomitose em que há fusionalamento dos homólogos. Êste mesmo ponto de vista é encontrado em Beermann (1).

Considerações bem detalhadas se encontram no trabalho de Huskins (4). Para êste autor, os termos **polissomatia** (endopoliploidia) e **politenia**, apesar de indicarem situações um tanto diferentes — pois que o primeiro significa a existência de cromossomos reduplicados, mas separados um dos outros, e o segundo cromonemas reduplicados mas ainda ligados — representam um mesmo fenômeno geral: que o material cromossômico se reproduziu e se acumulou em células que não se dividiram. Refere-se o mesmo autor à existência de inúmeros tipos intermediários, bem como à combinação entre **politenia** e **polissomatia**.

Parece não haver dúvida, pois, que o termo **endomitose** cabe perfeitamente para o fenômeno observado, do aparecimento de células polisomáticas no endosperma.

#### 2.4 — ENDOMITOSE E SUA FUNÇÃO NO ENDOSPERMA

Que a duplicação extranumerária dos cromonemas, aumentando a atividade nuclear, está relacionada com diferenciação celular, é opinião de muitos autores, como, por exemplo, Lorz (6), Swanson (13) e White (14). Referindo-se à endomitose, diz Beermann (1): «Whenever the function of a growing cell involves the direct cooperation of chromosomal genes — as is likely in many types of synthetic activities — polyploidization should become a physiological necessity, too».

A endomitose no endosperma do milho foi descrita por Duncan e Ross (3); foi ela interpretada através de observações sôbre o volume e superfície dos núcleos de diferentes regiões, além de certas evidências, como tamanho e forma dos nucléolos, espessura dos cromossomos, número de cromonemas. Contagens de cromossomos foram efetuadas mais tarde por Punnet (11), que encontrou células hexaplóides. Os maiores núcleos observados são os da zona central; o aumento de volume nuclear e o aumento do volume de todo o endosperma coincidem com o início e um grande desenvolvimento do processo de depósito de

amido. Duncan e Ross concluem que a endomitose é exibida por algumas células num período de atividade fisiológica especializada do endosperma.

Um maior depósito de amido pode representar apenas o efeito dessa atividade fisiológica. A finalidade poderia ser, por exemplo, alimentação do embrião. No caso do café, pode-se supor que a endomitose seja o mecanismo através do qual as células aumentariam sua atividade nuclear durante um certo período em que o endosperma, além do processo de substituição do perisperma, tem de ceder substâncias ao embrião, o qual também está se desenvolvendo com grande intensidade. Estudos e observações em endospermas de diversas idades, feitos em cortes seriados, poderão esclarecer se existe ou não relação de endomitose com o desenvolvimento do embrião.

### 3 — CONCLUSÕES

1. A técnica daorceína acética adotada, pode ser generalizada com bons resultados a outras espécies de *Coffea*, além de *C. arabica*.
2. Nas plantas normais de *C. arabica* ( $2n=44$ ) são formados endospermas com  $3x=66$ . Números diferentes de 66 foram encontrados nas plantas monossômicas ( $2n=43$ ) e são o resultado de combinações de gâmetas com número de cromossomos diferentes de 22.
3. Nas diferentes espécies estudadas, formam-se, além dos gâmetas normais com  $n$  cromossomos, gâmetas férteis contendo  $n+1$  ou  $n-1$  cromossomos.
4. O processo da endomitose no endosperma deve ser geral para as espécies de *Coffea*, uma vez que foi observado indistintamente em todo o material estudado.
5. Parece, finalmente, que o endosperma é um tecido originalmente  $3x$ , mas que se modifica no decorrer do seu desenvolvimento, produzindo células com outros graus de ploidia.

### CYTOLOGICAL OBSERVATIONS ON COFFEE ENDOSPERM

#### SUMMARY

Chromosome countings have been made on the endosperm of *Coffea* using the same technique of aceticorcein already referred to in previous work of the author.

Endosperm from the varieties *typica* and *semperflorens* ( $2n=44$ ) and monosomic plants ( $2n=43$ ) of *C. arabica* as well as of other species as *C. canephora* ( $2n=22$ ), *C. dewevrei* ( $2n=22$ ), *C. eugenioides* x *C. kapakata* ( $2n=22$ ) and duplicated *C. eugenioides* ( $2n=44$ ) were studied. Gametic number of chromosomes are discussed leading in some cases to the conclusion that gametes with missing chromosomes and gametes with supernumerary chromosomes were functional.

Endomitosis was observed in all material studied. Endosperm tissue is constituted, therefore, by polysomatic cells ( $6x$ ,  $12x$ ) in addition to the monosomatic ones ( $3x$ ) initially formed through fertilization. The possible relation of endomitosis and embryo development is also discussed.

The great number of photomicrographies obtained indicates once more that coffee endosperm is a favourable material for cytological investigations.

### LITERATURA CITADA

1. BEERMANN, WOLFGANG. Chromosomal differentiation in insects. In Dorothea Rudnick. New York. The Ronald Press Company. Developmental Cytology. 1957. p. 83-86.
2. BERGER, C. A. Reinvestigation of polysomy in *Spinacia*. The Bot. Gaz. 102: 759-769. 1941.
3. DUNCAN, R. E. & ROSS, J. G. The nucleus in differentiation and development, III. Nuclei of maize endosperm. J. Hered. 41: 259-268. 1950.
4. HUSKINS, C. L. The subdivisions of the chromosomes and their multiplication in non-dividing tissues; possible interpretation in terms of gene action. Amer. Nat. 21: 401-434. 1947.
5. KRUG, C. A., MENDES, J. E. T., CARVALHO, A. & MENDES, A. J. T. Uma nova forma de *Coffea*. Bragantia 10: 11-25. 1950.
6. LÖRZ, ALBERT P. Supernumerary chromonemal reproductions: polytene chromosomes, endomitosis, multiple chromosome complexes, polysomy. The Bot. Rev. 13: 597-624. 1947.
7. MENDES, A. J. T. Tratamentos de ramos de *C. eugenioides* com colchicina. Relatório da Seção de Citologia (dados não publicados). 1957.
8. MEDINA, DIXIER M. O endosperma de café como material para estudos citológicos. Bragantia 23: [179]-186. 1964.
9. ——— & CONAGIN, C. H. T. M. Nova técnica para contagens de cromossomos em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Bragantia 22: [423]-444. 1963.
10. ———. Técnica Citológica. Campinas, Instituto Agronômico, 1964. Publicação n.º 2610.
11. PUNNETT, HOPE H. Cytological evidence of hexaploid cells in maize endosperm. The Jour. Hered. 44: 257-259. 1953.
12. SERRA, J. A. Genética geral e fisiológica. Vol. I. Imprensa de Coimbra, Ltda., VIII, 448 p. 1949.
13. SWANSON, CARL P. Cytology and Cytogenetics. New York, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, 596 p. 1960.
14. WHITE, M. J. D. The chromosomes. London, Methuen & Co. Ltd., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1961.
15. WITKUS, E. R. Endomitotic tapetal cell divisions in *Spinacia*. Am. Jour. Bot. 32: 326-330. 1945.