

# BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 19

Campinas, agosto de 1960

N.º 48

## MACROSPOROGENESE, FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO SACO EMBRIONÁRIO, DO ENDOSPERMA E DO EMBRIÃO EM *COFFEA DEWEVREI* De Wild. et Th. Dur. (\*)

DIXIER M. MEDINA

*Engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo*

### RESUMO

O desenvolvimento do saco embrionário nas flôres de *Coffea Dewevrei* é um processo mais demorado do que em *C. canephora* e muito mais lento do que em *C. arabica*. As primeiras divisões do megasporo funcional têm início no dia da abertura da flor, raros sacos embrionários se apresentando completos no 1.º dia; em geral estão completos aos oito dias e, independentemente da fertilização, apresentam os núcleos polares fundidos 10 dias após a abertura das flôres.

A fertilização se dá a partir do 6.º dia, sendo mais comum a partir do 10.º dia. É também a partir do 10.º dia que ocorrem as primeiras divisões do endosperma, que pode apresentar até 20 núcleos antes de se tornar celular, e isto pode ocorrer dos 22 aos 107 dias.

Somente depois que o endosperma se apresenta celular é que se dá a 1.ª divisão na célula-óvulo; e esta primeira divisão só foi observada aos 142 dias. Em óvulos dessa mesma idade foram observados pró-embriões em estado um pouco mais adiantado de desenvolvimento.

O crescimento do endosperma em volume é lento na primeira fase; o óvulo, no entanto, cresce rapidamente em seguida à fertilização, atingindo em média, aos 142 dias, um tamanho 1500 vezes maior que seu tamanho por ocasião da abertura da flor. No mesmo espaço de tempo o endosperma torna-se, em média, somente 230 vezes o volume inicial.

Mesmo na falta da fertilização o óvulo cresce ligeiramente durante os 30 primeiros dias; observam-se, porém, os sinais de degenerescência do saco embrionário, que não cresce. Em seguida, os tecidos do óvulo também degeneram e se isto ocorrer nos dois óvulos, o ovário se desprende da árvore; alguns chegam a se manter na planta até 107 dias.

(\*) Recebido para publicação em 5 de fevereiro de 1960.

## 1 — INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do endosperma e do embrião em *Coffea arabica* L. foi há algum tempo descrito em detalhes por Mendes (5). Nesse trabalho já foram suficientemente discutidos diversos pontos de controvérsia então existentes e ficou reafirmado o ponto de vista de von Faber (1), sobre a constituição do óvulo e a formação do saco embrionário e do endosperma nas espécies de *Coffea*.

Sabe-se então que o óvulo é constituído de um integumento único no interior do qual há um nucelo de uma só camada de células recobrimdo a célula-mãe do macrosporo; que a partir do macrosporo calazal forma-se o saco embrionário que é, por êsse motivo, do tipo monospórico (3); e que a semente de *Coffea arabica* é constituída de endosperma contendo um embrião e envolvida por uma "película prateada", que corresponde ao integumento do óvulo (5).

Estudando a formação e desenvolvimento do saco embrionário na espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, Mendes (8) constatou ser êle do tipo idêntico ao de *C. arabica*; a igual conclusão chegara, anteriormente, Leliveld (2).

De um trabalho anterior sobre a auto-incompatibilidade na espécie *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. constam algumas observações sobre o desenvolvimento do saco embrionário, do endosperma e do embrião (4). De forma mais completa e detalhada são as observações relatadas neste trabalho, acrescentando-se informações sobre a macrosporogênese, a formação do saco embrionário, crescimento do óvulo, bem como as ilustrações referentes a diversas fases do gametófito feminino.

## 2 — MATERIAL E MÉTODO

As plantas utilizadas para o presente estudo foram: 63, 975, 641enx., 655enx. e 972, tôdas pertencentes à espécie *Coffea Dewevrei*, sendo que as duas primeiras estão localizadas na Coleção e as três últimas no Lote 8, na Estação Experimental "Dr. Theodureto de Camargo", em Campinas.

Ovários de diferentes idades foram colhidos:

- a) **antes da abertura das flôres:** da planta 63, diariamente, desde seis dias antes até a abertura das flôres;
- b) **de flôres castradas e não polinizadas:** da planta 63, aos 15, 30, 45, 60 e 107 dias após a abertura das flôres;
- c) **de flôres livremente polinizadas:** da planta 63 diariamente desde a abertura até 18 dias após; e também diariamente das plantas

641enx. e 655enx. a partir de 10 dias até 22 dias após a abertura das flôres.

d) **de flôres polinizadas artificialmente:** da planta 63 polinizada pela planta 975 e desta última polinizada por aquela, aos 15, 30, 45, 60, 107 e 142 dias após a abertura das flôres; e também, com intervalos de um ou de dois dias, desde a abertura das flôres até 22 dias depois, das plantas 641enx. e 655enx. polinizadas pela 972.

O material foi fixado diretamente em "Craf" (9); em ovários pequenos fazia-se apenas um desbaste na parte superior e inferior para facilitar a penetração do fixador; quando os ovários estavam mais desenvolvidos, fazia-se a sua dissecação e só os óvulos eram fixados. A inclusão foi feita em parafina pelo processo do álcool butílico, os cortes à espessura de 12 micros no material mais novo e de 16 micros nos óvulos de mais idade. As lâminas foram coloridas pela hematoxilina férrica de Heidenhain.

Para cálculo do volume do óvulo e do endosperma tomaram-se dos mesmos duas dimensões sob o microscópio; a terceira dimensão era dada multiplicando-se o número de cortes pela sua espessura. Dessa maneira, levando-se em conta a forma geométrica aproximada que essas estruturas iam tomando durante o desenvolvimento, tinha-se o seu volume.

Os desenhos foram feitos com auxílio da câmara clara, algumas vezes sendo necessário fazer-se a superposição dos desenhos. Os aumentos vão especificados junto às figuras.

### 3 — OBSERVAÇÕES

#### 3.1 — MEGASPOROCÊNESE E FORMAÇÃO DO SACO EMBRIONÁRIO

Aos seis dias antes da abertura da flor, todos os óvulos examinados mostram o megasporócito em início de meiose; observam-se com muita frequência megasporócitos em prófase inicial e paquinema (fig. 1, A), algumas vezes em diaquinese (fig. 1, B).

Essas mesmas fases são observadas em óvulos aos cinco e quatro dias antes da abertura, tendo-se encontrado um óvulo apenas em que a primeira divisão meiótica já havia ocorrido (fig. 1, C).

É no intervalo que vai desde três dias antes até o dia da abertura da flor que a meiose se completa, podendo ser observadas então as quatro células resultantes, das quais uma, duas e mesmo três já se acham em degenerescência (fig. 1, D): a remanescente, calazal, constitui o megasporo funcional.

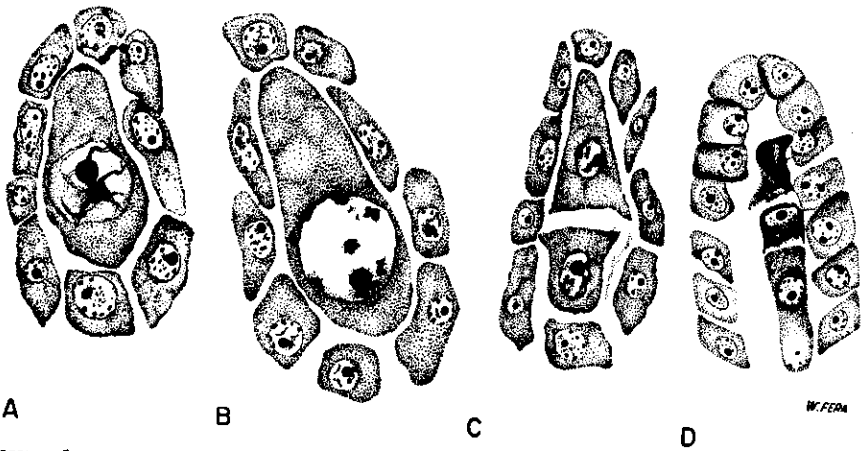


FIGURA 1. — Megasporócitos em divisão: A — paquinema; B — diaquinese; C — duas células resultantes da primeira divisão meiótica; D — células resultantes da meiose ( $\times 950$ ).

No dia da abertura da flor têm início as primeiras divisões do megasporo funcional (quadros 1 e 2).

QUADRO 1. — *Coffea Deweyi*. Observações sôbre desenvolvimento do saco embrionário em ovários da planta 63 da coleção de Campinas

Idade dos óvulos em relação à abertura da flor	Óvulos examinados(*)	Megasporócito	Megasporo funcional	S. Embrion. dois núcleos	S. Embrion. quatro núcleos
	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
6 dias antes -----	31	29	-----	-----	-----
5 " " -----	14	10	-----	-----	-----
4 " " -----	16	11	-----	-----	-----
3 " " -----	16	8	-----	-----	-----
2 " " -----	11	1	5	-----	-----
Véspera da abertura ---	4	---	7	-----	-----
Dia da abertura -----	16	---	3	2	1
			7		
Total -----	108	59	22	2	1

(\*) A diferença de 24 óvulos entre o n.º dos interpretados (84) e o total dos examinados (108), está distribuída em três classes: anormais, degenerados precocemente e de difícil interpretação.

A formação do saco embrionário, isto é, as divisões sucessivas do megasporo funcional até se constituir o conjunto de oito núcleos perfeitamente diferenciados, se opera no espaço de tempo que vai do dia da abertura da flor até oito dias após (quadro 2).

Até o 5.º dia predominam os sacos embrionários incompletos com dois núcleos (fig. 2, A) ou com quatro núcleos (fig. 2, B); no 6.º dia

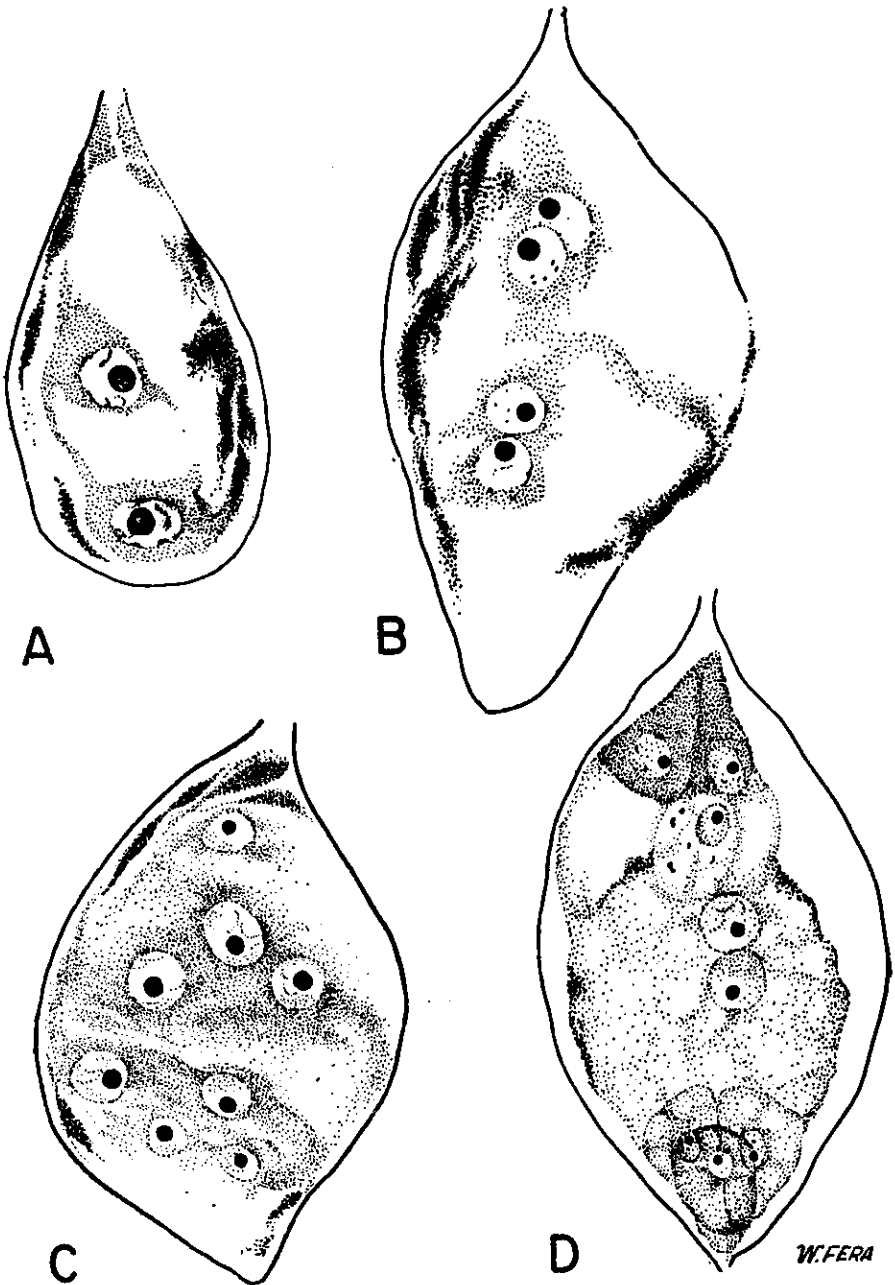


FIGURA 2. — A — D — Saco embrionário no estado de dois, quatro, oito núcleos e completo, respectivamente (x890).

aumenta o número dos sacos embrionários com oito núcleos (fig. 2, C), sendo encontrados alguns com os núcleos já diferenciados indicando que a formação do saco embrionário se completou. Apresentam-se nêles então: o conjunto micropilar, formado pelas sinérgidas bem desenvolvidas com seu enorme vacúolo basal e a oosfera localizada mais para o centro da cavidade; o conjunto calazal, formado por três grandes antípodas de citoplasma bastante vacuolizado; e na parte central os dois núcleos polares bem esféricos (fig. 2, D).

QUADRO 2. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre a formação do saco embrionário de flôres livremente polinizadas da pl. 63 e de flôres das pls. 641enx. e 655enx. polinizadas pela pl. 972

Idade dos óvulos em relação ao dia da abertura da flor	Óvulos examinados(*)	Óvulos apresentando megasporo funcional	Estado de desenvolvimento do saco embrionário			
			Dois núcleos	Quatro núcleos	Seis núcleos	Oito núcleos
	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
Dia da abertura						
1 dia após	36	21	7	1		
2 " "	8		3	4		1
3 " "	28	2	9	6	1	1
4 " "	4			1		1
5 " "	21	3	2	5	2	5
6 " "	4	2	1			1
7 " "	15			1	2	9
8 " "	23					18
Total	139	28	22	18	5	36

(\*) Os 30 óvulos que constituem a diferença entre o n.º dos examinados (139) e o n.º dos interpretados (109) distribuem-se nos tipos seguintes: sacos embrionários anormais, degenerados precocemente e de difícil interpretação.

Aos oito dias após a abertura da flor, todos os sacos embrionários observados estavam completos: parte se apresentava com os núcleos polares ainda separados, enquanto que alguns já tinham os núcleos polares fundidos. A partir dos dez dias na maior parte dos casos, os núcleos polares estão fundidos independentemente de ter sido o saco embrionário fertilizado ou não.

### 3.2 — FERTILIZAÇÃO. DESENVOLVIMENTO DO ENDOSPERMA E DO EMBRIÃO

A presença do tubo polínico no interior da cavidade do saco embrionário foi notada em apenas um dos 15 óvulos em material de seis dias de idade. Em óvulos de mais idade os indícios da sua passagem se tornam mais freqüentes: aos 10 dias, por exemplo, constatou-se a presença do tubo polínico em 13 dos 58 óvulos examinados (quadro 3).

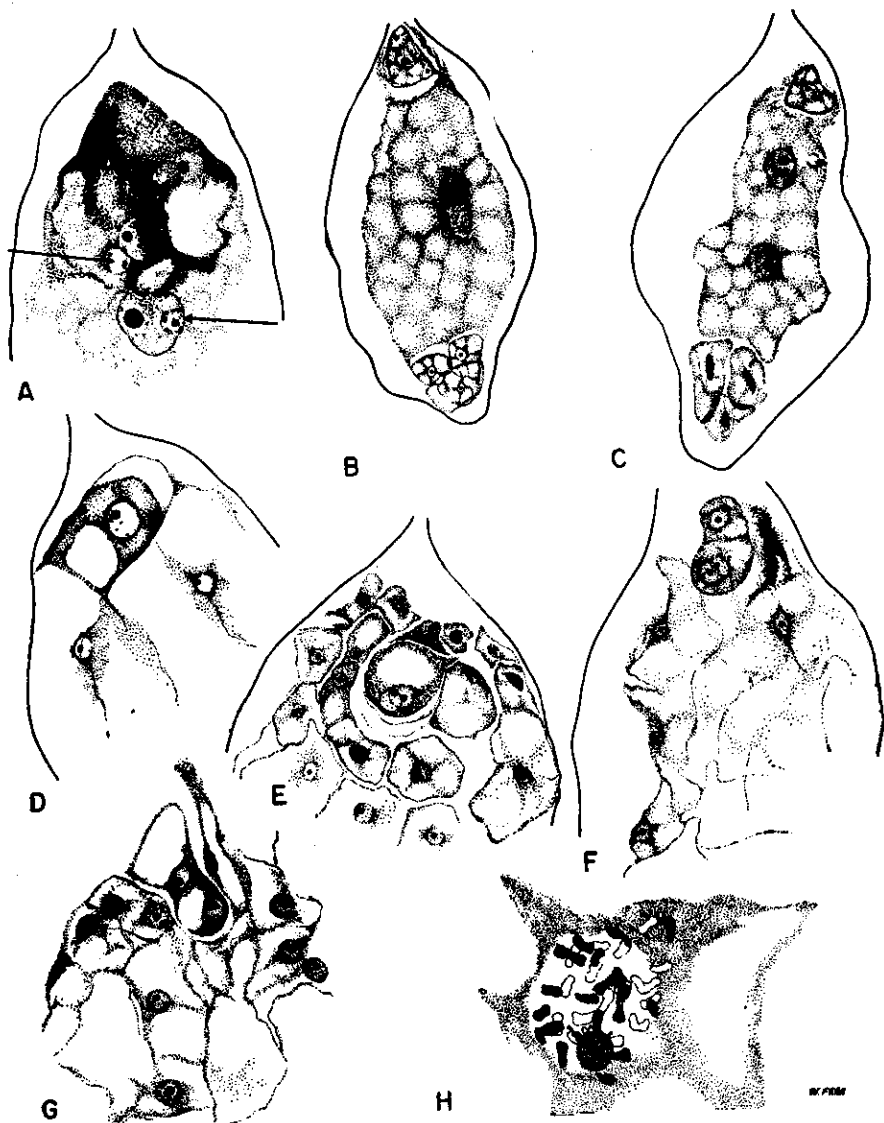


FIGURA 3. — A — Passagem do tubo polínico através do saco embrionário (gametas masculinos indicados pelas flechas) (x950); B e C — sacos embrionários recentemente fertilizados, com o endosperma em início de desenvolvimento (x445); D e E — célula-ôvo indivisa e no estado binucleado, respectivamente (x950 e 445); F e G — pró-embrião bi-celular (x445); H — prófase em uma das células do endosperma em desenvolvimento (x1925).

Considerando o aparecimento do tubo polínico no interior do saco embrionário como indicio seguro da fertilização, podemos dizer que em *Coffea Dewevrei* ela se dá a partir do sexto dia após a abertura da flor, tem sua freqüência máxima ao redor do 10.º dia e se prolonga por alguns dias mais, tendo-se encontrado vestígios do tubo polínico até em óvulos de 18 dias (quadro 3).

A identificação dos gametas masculinos é muito difícil; dos 28 sacos embrionários que se apresentavam com tubo polínico (óvulos de 10 até 18 dias, quadro 3) apenas um deles mostrou claramente os gametas masculinos: um junto dos núcleos polares fundidos e outro bem próximo do núcleo da oosfera (fig. 3, A). Apresentavam-se ovóides com diversas regiões cromáticas e em um deles via-se também um nucléolo pequeno; no outro o nucléolo não estava muito evidente. A penetração do tubo polínico consome na maioria das vezes uma das sinérgidas e no lugar desta o que se observa são restos degenerados que se colorem muito pela hematoxilina; isto, somado ao próprio conteúdo do tubo polínico, que também degenera, trás grande dificuldade para a observação dos gametas masculinos prestes a efetuar a fertilização.

Embora se tenha observado o tubo polínico dentro do saco embrionário em ovário de 6 a 8 dias, é dos 10 dias em diante que se notam os primeiros indícios de que a fertilização se realizou: o núcleo primário do endosperma preparando-se para a primeira divisão (fig. 3, B) e uma célula-ovo bem próxima à micrópila. Ao mesmo tempo nota-se o desaparecimento das sinérgidas enquanto que as antípodas perduram mais tempo sem degenerar. A figura 3, C mostra um estado um pouco mais adiantado de endosperma binucleado.

Dos 10 aos 18 dias, o número relativo de sacos embrionários com vestígios de tubo polínico diminui e o número de sacos embrionários com a célula-ovo e o endosperma em desenvolvimento aumenta (quadro 3). Na figura 3, H observa-se um dos núcleos do endosperma em prófase adiantada pois que a membrana nuclear já desapareceu e nêle se podem contar aproximadamente 33 cromossomos.

O número de núcleos de endosperma pode alcançar até 20, sem que se formem membranas celulares separando-os; entretanto, isto pode acontecer mais cedo quando os núcleos são apenas 10 ou ainda em menor número. Os números constantes na coluna "Cél.-ovo + Endosp. celular" do quadro 3 referem-se a ovários nos quais o endosperma já se transformou em celular, alguns deles com poucos núcleos.



QUADRO 3. — *Coffea Dewevrei*. Observações sobre os estados que se sucedem à formação do saco embrionário. Ovários colhidos de polinização livre ou controlada, das pls. 63, 975, 64lenx. e 655enx.

Dias decorridos após a abertura das flores	Óvulos examinados	Não formação do saco embrionário	S.E. anormal	S.E. não fertilizado	S.E. em degenerescência ou degenerado	S.E. c/tubo polínico	S.E. fertiliz. Cél. óvo + Endosperma 2 a 10 núcleos	S.E. fertiliz. Cél. óvo + Endosperma 11 a 20 núcleos	Cél. óvo + endosperma celular	Pró-embrião de 2-4 células	Pró-embrião multifretular
n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
10	58	2	5	20	10	13	8				
12	46	3	3	6	18	2	14				
14	42	3	-----	6	12	3	15	3			
16	29	-----	4	1	10	-----	13	1			
18	43	1	1	7	13	7	13	1			
22	26	1	1	1	10	-----	6	3	4		
30	28	-----	-----	-----	8	-----	13	6	1		
45	14	-----	-----	-----	2	-----	3	8	1		
60	11	-----	-----	-----	4	-----	5	2	-----		
107	29	-----	-----	-----	6	-----	2	14	7		
142	11	-----	-----	-----	-----	-----	1	2	4	2	2
Total	337	10	14	41	93	25	93	40	17	2	2

Durante todo esse tempo em que o endosperma se desenvolve, a célula-ôvo permanece indivisa; apresenta-se ovalada, tendo excêntrico o núcleo, ao redor do qual se condensa quase todo o citoplasma, e do outro lado um grande vacúolo (fig. 3, *D*); todavia nem sempre ela é vista dessa forma ao microscópio, dependendo da sua posição em relação ao corte efetuado; por todo o citoplasma vêem-se inclusões que se colorem fortemente pela hematoxilina e no interior do núcleo observa-se ora um ora dois nucléolos (fig. 3, *D* e 3, *C*).

A primeira divisão da célula-ôvo foi vista em ovários de 142 dias. Na fig. 3, *E* vê-se um estado binucleado da célula-ôvo, enquanto que a fig. 3, *G* mostra as duas células, basal e terminal, resultantes dessa divisão; a célula terminal pode se dividir mesmo antes da basal, como se vê na fig. 3, *F*. Num estado um pouco mais avançado (fig. 4, *A*) observa-se um pró-embrião multicelular, no qual cinco células de seção retangular muito semelhantes umas às outras formam o suspensor: a mais basal delas

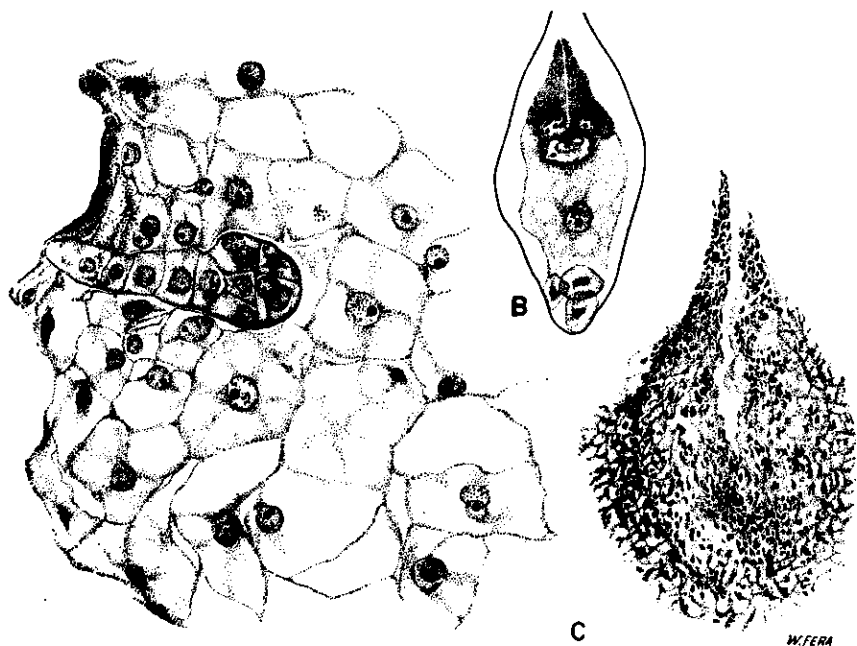


FIGURA 4. — *A* — pró-embrião multicelular, no interior do endosperma em desenvolvimento em ovário de 142 dias após a abertura das flores ( $\times 445$ ); *B* — saco embrionário em início de degenerescência ( $\times 445$ ); *C* — parte central do óvulo em degenerescência, com saco embrionário completamente degenerado ( $\times 225$ ).

é hipertrofiada, mais vacuolizada e funciona possivelmente como um haustório. A outra parte é o corpo do pró-embrião, em forma de escudo, possivelmente originário da célula terminal. Nesta fase é fácil distinguir-se ao microscópio, mesmo sob pequenos aumentos, o pró-embrião em crescimento, pois êle se constitui de células bem menores que as envolventes do endosperma, em grande atividade de multiplicação e, além disso, com o citoplasma intensamente pigmentado.

A marcha do crescimento do óvulo, do endosperma e do embrião, até os 142 dias após a fertilização, pode ser apreciada através dos dados contidos no quadro 4.

Verifica-se que o óvulo e o endosperma crescem, nos primeiros 45 dias, numa velocidade aparentemente igual, tanto que um e outro, nesse período, atingem um volume cêrca de três vêzes o volume inicial, considerado, no caso do endosperma, como inicial o volume do saco embrionário. Nos 15 dias seguintes o óvulo já cresce ligeiramente mais rápido, para depois, dos 60 aos 107 dias, tomar um impulso muito maior: torna-se então cêrca de 35 vêzes maior, enquanto o endosperma ainda tem um volume apenas igual a cinco vêzes o volume inicial.

No período seguinte, dos 107 aos 142 dias, o óvulo atinge um tamanho que é cêrca de 1500 vêzes o inicial; o endosperma, nesse período, cresce também rapidamente, atingindo, porém, apenas cêrca de 230 vêzes o volume inicial.

Como, para os exames citológicos, a colheita de material fôra feita sòmente até os 142 dias, não dispomos de dados relativos ao crescimento volumétrico após êsse ponto.

O endosperma é ainda nuclear aos 107 dias; a célula-ôvo, por sua vez, permanece indivisa. Aos 142 dias o endosperma é celular observando-se então as primeiras divisões da célula-ôvo das quais resultará o embrião.

QUADRO 4. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre o desenvolvimento do endosperma e do embrião, relacionadas com o volume do óvulo, do saco embrionário e do endosperma. Pl. 63 polinizada pela pl. 975 e vice-versa

Idade do óvulo	Estado de desenvolvimento		Volume do óvulo	Volume do S. Embrionário ou do Endosperma
	do endosperma	do embrião		
15 dias -----	?	"Célula-ovo"	0,055	0,000126
	12	"	0,057	0,000596
	Núc. Prim.	"	0,058	0,000189
	4	"	0,061	0,000403
	4	"	0,068	0,000356
	11	"	0,069	0,000408
	13	"	0,070	0,000189
	Núc. Prim.	"	0,075	0,000115
			M = 0,064	0,000298
			I = 1(*)	I
30 dias -----	7	"	0,089	0,000596
	12	"	0,096	0,000843
	8	"	0,104	0,000843
	6	"	0,121	0,000916
	8	"	0,130	0,000843
			M = 0,108	0,000808
		I = 1,7	2,7	
45 dias -----	16	"	0,147	0,000602
	10	"	0,182	0,000869
	20	"	0,193	0,001210
			M = 0,174	0,000893
			I = 2,7	2,9
60 dias -----	10	"	0,226	0,000989
	15	"	0,236	0,001110
	8	"	0,308	0,001435
	8	"	0,396	0,001147
	7	"	0,472	0,001147
	10	"	0,577	0,001911
			M = 0,369	0,001289
		I = 5,7	4,5	
107 dias -----	?	"	1,204	0,001989
	17	"	1,335	0,001047
	12	"	1,670	0,001728
	15	"	1,670	0,001309
	11	"	1,681	0,001047
	?	"	2,074	0,001414
	12	"	2,225	0,000838
	14	"	2,513	0,001047
	7	"	2,655	0,001730
	20	"	3,142	0,001257
	10	"	4,241	0,004031
			M = 2,218	0,001589
			I = 34,6	5,3
142 dias -----	Mtas. células	Pró-embr. bicelular	49,218	0,005840
	"	"Célula-ovo"	83,776	0,014137
	"	Pró-embr. bicelular	84,823	0,021206
	"	Pró-embr. multicelular	91,106	0,130374
	"	"Célula-ovo"	102,102	0,102887
	"	Pró-embr. multicelular	178,024	0,086394
			M = 98,174	0,068900
		I = 1532	251	

(\*) Tomando-se as médias dos volumes aos 15 dias como "Índice" 1, os índices de aumento correspondentes às demais idades vão indicados no quadro.

## 3.3 — FLÔRES CASTRADAS E NÃO POLINIZADAS

As observações sôbre o estado do saco embrionário em flôres castradas foram feitas em material colhido a partir de 15 dias após a abertura das flôres. Os dados confirmam aquêles já apresentados em trabalho anterior (4).

Do quadro 5 pode-se inferir que a degenerescência dos sacos embrionários não fertilizados tem início antes de decorridos 15 dias da abertura das flôres. Nesta data, de 32 óvulos interpretados, apenas cinco se mantinham intactos; os restantes estavam em degenerescência ou já degenerados.

A desintegração das células do saco embrionário começa em geral pelas antípodas, cujos núcleos se tornam amebóides, cheios de pigmentações, até se reduzirem a manchas escuras; ao mesmo tempo as células perdem a turgidez, diminuem de tamanho e se deformam. As sinérgidas desaparecem, às vêzes concomitantemente com as antípodas; outras vêzes, porém, duram mais tempo; os primeiros sinais de degenerescência são as pigmentações que aparecem na base das mesmas e que se colorem intensamente pela hematoxilina (fig. 4, B).

QUADRO 5. — *Coffea Dewevrei*. Pl. 63. Observações sôbre o saco embrionário de flôres castradas e não polinizadas

Dias decorridos após a abertura das flôres	Óvulos examinados	Estados do saco embrionário				
		não degenerado	em degenerescência	degenerado	degenerado mais óvulo degenerado	anormal ou de difícil interpretação
n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º	n.º
15.....	32	5	22	2	-----	3
30.....	33	2	7	24	-----	
45.....	32		3	29	-----	
60.....	24			22	-----	2
107.....	14				14	
Total ...	135	7	32	77	14	5

A oosfera e os núcleos polares são os elementos que resistem mais. Porém, aos poucos a oosfera vai se deformando e se tornando cada vez menos evidente; os núcleos polares, fundidos ou separados, vão se tornando amebóides, o citoplasma perde a sua vacuolização e vai desaparecendo.

Trinta dias após a abertura das flôres, quase todos os sacos embrionários estão degenerados; encontram-se ainda, porém, vestígios dos núcleos polares e da oosfera e em alguns casos, a cavidade vazia sem vestígio algum das estruturas degeneradas.

Em óvulos mais velhos, de 45 e 60 dias, nota-se que a cavidade do saco embrionário diminuiu muito, tendo sido preenchida por células grandes com aspecto de degeneradas. Isto significa possivelmente que o óvulo começou a se desintegrar e as células caem na cavidade do saco embrionário.

O óvulo cresce ligeiramente, durante os 30 primeiros dias, como nos óvulos fertilizados; as medições feitas aos 45 e 60 dias mostram que não há ulterior desenvolvimento (quadro 6). O exame dos ovários que ainda não haviam caído aos 107 dias mostra invariavelmente o óvulo degenerado ou em degenerescência (fig. 4, C).

QUADRO 6. — *Coffea Dewevrei*. Observações sôbre o estado do saco embrionário, seu volume e o volume do óvulo. Ovários de flôres castradas e não polinizadas da pl. 63

Idade do óvulo	Saco Embrionário	Volume do óvulo	Volume do S.E.
15 dias -----	em-degen. inicial	$mm^3$	$mm^3$
		0,018	0,00011
		0,020	0,00014
		0,024	0,00016
		0,032	0,00012
		0,075	0,00014
		0,082	0,00014
		0,082	0,00019
		0,106	0,00014
			M = 0,055
	I = 1	1	
30 dias -----	em-degen. adiantada	0,093	0,00012
		0,113	0,00014
		0,135	0,00013
		M = 0,113	0,00013
		I = 2	1
45 dias -----	degen. completamente	0,092	-----
		0,132	-----
		M = 0,112	-----
		I = 2	-----
60 dias -----	"	0,084	-----
		0,087	-----
		0,089	-----
		0,123	-----
		0,137	-----
		M = 0,104	-----
	I = 1,8	-----	

## 4 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Levando em conta o número relativamente grande de óvulos examinados (quadro 1), pode se dizer que em *C. Dewevrei* os estados iniciais da megasporogênese se prolongam bastante.

Na espécie *C. arabica* a maior parte dos sacos embrionários já está completa no dia da abertura das flôres (5), enquanto que em *C. Dewevrei* é nessa ocasião que termina a megasporogênese e se inicia a formação do saco embrionário. Comparando-se com a outra espécie diplóide *C. canephora*, na qual êsse estudo também foi feito (8), vê-se que esta última ocupa uma posição intermediária entre aquelas duas, pois que embora não havendo sacos embrionários completos no dia da abertura das flôres, todos êles estão completos três dias depois.

Observações feitas sôbre a penetração do tubo polínico no estilo haviam mostrado que na espécie *C. Dewevrei*, nas polinizações entre plantas compatíveis, os tubos polínicos alcançavam a base do estilo 24 horas após a polinização (4). Nas observações efetuadas no decorrer dêste trabalho, porém, só se viu tubo polínico no interior do saco embrionário do sexto dia em diante. É difícil compreender como, tendo levado apenas 24 horas na parte mais longa do caminho, gaste o pólen muito mais tempo para chegar ao saco embrionário.

Se, de acôrdo com as primeiras observações, devemos concluir que o estigma e o estilo da flor já estavam receptivos no dia da abertura, é possível admitir-se que na micrópila a reação fôsse desfavorável nesse dia, pois que então a formação do saco embrionário apenas se inicia.

Em vista disso, é possível que: a) o tubo polínico, estando na base do estilo 24 horas após a abertura da flor, seja capaz de se manter em boas condições até o momento propício para a fertilização; e b) ao contrário, êle não se mantenha intacto e se desintegre; mas então o estigma e o estilo permaneceriam receptivos para outros grãos de pólen que penetrassem dias depois encontrando condições mais apropriadas.

De acôrdo com a segunda suposição, a fertilização dar-se-ia também por meio do pólen de flor aberta dias mais tarde, depositado sôbre o estigma de flor que se abriu em data anterior.

Para se obter uma confirmação dêste ponto seria suficiente fazer polinizações das mesmas plantas (clones já sabidamente compatíveis) em duas ocasiões : ao dia da abertura das flôres da planta-mãe e alguns dias mais tarde. A diferença no pegamento das polinizações provaria a segunda hipótese. Concordando com essas conjecturas está o fato de

comumente, em nossos trabalhos de cruzamentos, encontrarem-se estigmas túrgidos, brancos, aparentemente receptivos quatro a cinco dias depois da polinização, quando se deveriam retirar das flôres as proteções de papel.

Por outro lado, sabemos que há pegamento nas polinizações feitas no dia da abertura das flôres, o que indica provávelmente que também é possível ao tubo polínico esperar que se complete a formação do saco embrionário. Aliás, em todos os cruzamentos compatíveis que constam em (4) e que, portanto, produziram frutos, as polinizações foram efetuadas no dia da abertura das flôres ou no dia seguinte.

Com relação ao desenvolvimento do endosperma observa-se que em *Coffea arabica* (5) o endosperma de quatro núcleos pode tornar-se celular. Em *Coffea Dewevrei* a transformação do endosperma em celular se dá geralmente quando já existe um maior número de núcleos; foi visto um só caso de endosperma com sete células. Tanto numa como na outra espécie trata-se de endosperma "não celular" (10).

O processo de desenvolvimento do endosperma e do embrião em *C. Dewevrei* é bem mais lento que na espécie *arabica*: enquanto que nesta espécie encontram-se 12, 16, 24 e 36 células do endosperma em óvulos de 30 dias e 120 células em óvulos de 90 dias (5), em *Coffea Dewevrei* encontrou-se endosperma de 7-20 núcleos em óvulos de 107 dias (quadro 4). Aos 120 dias completa-se o desenvolvimento do endosperma em *C. arabica* var. *typica* (5); aos 145, na var. "Mundo Novo" da mesma espécie (5); em *C. Dewevrei*, aos 142 dias o endosperma ainda está em desenvolvimento inicial e só pode ser identificado ao microscópio.

O mesmo atraso se dá com o desenvolvimento do embrião; a primeira divisão da célula-ovo foi vista em material de 60-75 dias em *C. arabica* (5, 6), seguida por uma multiplicação rápida das células, completando-se o desenvolvimento do embrião aos 160 dias. Em *C. Dewevrei* a célula-ovo divide-se a primeira vez aos 142 dias. O estado mais avançado encontrado nesta idade é o de pró-embrião em desenvolvimento (quadro 3).

Vê-se que aos 10 dias após a abertura aparecem os primeiros indícios de degenerescência, representando possivelmente os sacos embrionários que se completaram em data bem anterior, pois que é nessa ocasião que se encontra a maior proporção de sacos embrionários com tubo polínico. Por outro lado, até os 22 dias encontram-se também, no material polinizado, sacos embrionários intactos, que não tendo sido fertilizados não degeneram (quadro 3); aliás, no material não polinizado sacos embri-



nários não degenerados podem ser encontrados aos 30 dias (quadro 5); tanto num como noutro caso deve se tratar de sacos embrionários que tardaram mais a se formar. É comum (quadro 5) que o S.E. degenerere antes de decorridos 15 dias da abertura da flor; considerando-se, porém, que está completa a formação dos S.E. aos oito dias, pode-se deduzir que é possível ao saco embrionário manter-se intacto até por 22 dias, se não fôr fertilizado (30 dias menos 8).

A degenerescência do saco embrionário se processa de forma semelhante, quer se trate de flôres castradas e não polinizadas (quadro 5) ou de flôres polinizadas, porém, não fertilizadas (quadro 3).

Os dados apresentados permitem concluir que o desenvolvimento do óvulo, do endosperma e do embrião depende da fertilização, porém o crescimento que se observa no óvulo nos primeiros 30 dias é independente desse processo.

#### MEGASPOROGENESIS, FORMATION AND DEVELOPMENT OF EMBRIOSAC AND EMBRYO IN *COFFEA DEWEVREI* DE WILD ET TH. DUR.

##### SUMMARY

The embryo sac development in *Coffea Dewevrei* De Wild et Th. Dur. is a slower process than in the other diploid species *C. canephora* and still slower than in the tetraploid species *C. arabica*.

First divisions of functional megaspore begin on the day the flowers open. Very few complete embryo sacs are found in the next day; in general, the embryo sac is complete on the eighth day and from the tenth day on most of them present fused polar nuclei whether fertilization has taken place or not.

Fertilization was observed on the sixth day but was more frequently seen about the tenth day.

Divisions of primary nucleus of the endosperm could be seen from the tenth day on. The endosperm is of "non-cellular" type, its transformation into "cellular" occurring from 22 till 107 days after flower opening. Oosphere maintains itself undivided; its first division was observed on the 142th day, but probably occurred before, since at that time multicellular pro-embryos were also seen.

After fertilization the ovule increases rapidly in volume, and becomes 1500 times larger on the 142th day. Meanwhile the endosperm develops very slowly, its volume increasing 230 times.

Even when fertilization does not occur, the ovule grows during the first 30 days; the embryo sac, however, does not grow and desintegrates rapidly. Afterwards, the ovule tissues also degenerate and the ovary falls down.

## LITERATURA CITADA

1. FABER, F. C. Morphologische-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-arten. Ann. Jard. bot. Buitenz. 2e. série, 25:59-160. 1912. [Bibliofilme copiado]
2. LELIVELD, J. A. Fruchtezetting bij Koffie. Arch. Koffiecult. Ned-Ind. 3:127-164. 1938.
3. MAHESHWARI, P. An introduction to the embryology of angiosperms. New York, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., 1950. 453p.
4. MEDINA, DIXIER M. & CONAGIN, C.H.T. MENDES. Auto-incompatibilidade em *Coffea Dewevrei* (De Wild et Th. Dur.). *Bragantia* 18:[283]-293. 1959.
5. MENDES, A. J. T. Observações citológicas em *Coffea* VI. Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 2:[115]-128. 1942.
6. ———, MEDINA, DIXIER M. & CONAGIN, CÂNDIDA H. T. MENDES. Cito-  
logia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café "Mundo Novo".  
*Bragantia* 13:[257]-279. 1954.
7. MENDES, CÂNDIDA H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero  
*Coffea*. *Bragantia* 9:[35]-41. 1949.
8. ——— Observações citológicas em *Coffea* XVII — O saco embrionário  
em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 10:[105]-111, 1950.
9. RANDOLPH, L. F. A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin  
method in plant cytology. *St. Tech.* 10:95-96. 1935.
10. RAO, V. S. "Nuclear" or "Non cellular endosperm"? *Ann. Bot., Lond.* 23(90) :364.  
1959.