

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM COFFEA

VI — DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO E DO ENDOSFERMA EM *Coffea arabica* L. (*)

A. J. T. Mendes

INTRODUÇÃO

O primeiro trabalho citológico em Café foi feito por von Faber (1). Usando material de *C. arabica* e *C. liberica*, determinou em ambas as espécies $2n = 16$, o que está em desacordo com as investigações recentes de Krug (8) e Mendes (13), pois *C. arabica* tem $2n = 44$ e *C. liberica* tem $2n = 22$. Se bem que falho sob este ponto de vista, von Faber descreveu o óvulo muito acertadamente e não achou "nenhuma particularidade interessante" na formação do endosperma nas espécies de *Coffea*.

Ultimamente, porem, surgiram discussões em torno de certos pontos sobre os quais von Faber não havia deixado dúvida: a) em relação à constituição do óvulo (integumento, nucelo, "integumento-nucelo" ou integumento e nucelo?); b) em relação ao macrosporo funcional (chalsal ou micropilar?); e c) em relação ao desenvolvimento da semente (esta seria constituída por um endosperma ou por um perisperma?).

a) O óvulo

O conceito emitido por von Faber (1) sobre a constituição do óvulo de *C. arabica* L. é certo: constitui-se por um nucelo muito fino, de uma só camada de células cobrindo a célula-mãe do macrosporo; em volta desse nucelo desenvolve-se um grande e único integumento, que é atravessado por uma tênue micrópila.

Houk (4) diz ser o óvulo de *Coffea* constituído por um tecido no qual não se diferencia um *integumento* de um *nucelo*; esse tecido deveria ser encarado como um *integumento-nucelo*.

Faltou a Houk o estudo inicial do desenvolvimento do óvulo, pois é nesse ponto que se pode observar muito distintamente um nucelo de poucas células rodeado por um integumento que se desenvolve grandemente. No óvulo já desenvolvido, as células do nucelo desaparecem devido à compressão exercida contra o integumento, pelo saco embrio-

(*) O original em inglês deste trabalho foi publicado em "American Journal of Botany", vol. 28, n.º 9, pág. 784-789, novembro de 1941. O autor agradece ao dr. A. J. Eames, de Cornell University, Ithaca, N. Y., pela revisão do manuscrito em inglês.

nário que no seu interior se desenvolve. Nessa ocasião, portanto, se torna muito difícil interpretar a constituição do óvulo, se não se viu antes a degenerescência do nucelo.

Não podemos, portanto, estar com Houk; temos que voltar ao velho conceito de von Faber, e neste ponto estão conosco Graner (5, 6), Fagerlind (2), Leliveld (10) e Joshi (7).

b) O macrosporo funcional

Descrevendo a formação do saco embrionário, von Faber mostra que o macrosporocito único dá formação a 4 macrosporos, dos quais três se degeneram, e do "superior" se forma o saco embrionário.

Schnarf (16, 17) afirma que, "segundo von Faber", o saco embrionário se forma a partir do macrosporo micropilar. Graner (5, 6) afirma o mesmo e mostra que, ao contrário, é o *chalasal* que dá formação ao saco embrionário.

Ora, von Faber não usou o termo "micropilar", e se se examinar as suas figuras e se se lembrar de que no óvulo de café a micrópila se dirige "para baixo" em relação ao pedúnculo do fruto, conclue-se que von Faber acertou e que o macrosporo funcional é o *chalasal* (por ele chamado de "superior").

Quanto a este ponto, não há, pois, motivo para discussão. Nós confirmamos aqui o trabalho de von Faber (1) e Graner (5): dos 4 macrosporos formados, os três micropilares se degeneram e o *chalasal* aumenta de volume, transformando-se, após divisões do seu núcleo, num saco embrionário, descrito por Schnarf (18) como do "tipo normal".

c) O endosperma

Von Faber (1), que se demora em considerações sobre vários pontos, ao tratar da formação do endosperma é bastante conciso. Diz, no entanto: "a formação do endosperma nas espécies de *Coffea* não oferece nenhuma particularidade interessante. Os núcleos do endosperma primeiramente formados são grandes e depositam-se no plasma ao redor da parede".

Houk (3) levanta outra questão sobre este ponto: poucas células do endosperma seriam formadas, as quais logo se degenerariam; em *Coffea*, então, não existiria um endosperma. Em segunda contribuição, Houk (4) descreve com detalhes a "formação" e a "degenerescência" do endosperma, ao mesmo tempo que o desenvolvimento de um "perisperma".

A velha concepção do endosperma ruiu então, e Krug (9) seguindo a concepção de Houk, passa a adotar o termo "perisperma" em vez de "endosperma", quando quer referir-se à massa da semente.

Os trabalhos de Houk, levados a efeito no Brasil, puseram em campo vários investigadores do estrangeiro, os quais obtiveram resultados que não concordam com os de Houk. Vejamos:

Antes do segundo trabalho de Houk (4), já Mayne (12), trabalhando na Índia, o refuta: o endosperma da semente de café passaria por um longo período de repouso após a fertilização, durante o qual haveria uma considerável atividade de crescimento dos tecidos "nucelares". Mais tarde, o endosperma passaria a se desenvolver e este "tecido nucelar" reduzir-se-ia apenas à "camada interna" da "película prateada" (película que envolve a semente).

Joshi (7), discutindo outros pontos do trabalho de Houk, não traz nada de novo sobre esta questão.

Leliveld (11), que trabalhou nas Ilhas Neerlandesas, verifica que após a dupla fertilização há um certo repouso dentro do saco embrionário durante o qual este apenas aumenta de volume; as células do "integumento" multiplicam-se grandemente durante esse tempo; mais tarde, pelo desenvolvimento do endosperma, o "integumento" se desintegra, seus últimos restos são empurrados para fora e passam a formar finalmente a "película prateada".

Fagerlind (2), aparentemente desconhecendo o trabalho de Leliveld, e trabalhando na Europa com material colhido em Java, também refuta a idéia de Houk sobre a não existência de um endosperma em *Coffea*; verifica que após a fertilização há um grande desenvolvimento dos tecidos do "integumento" e da "chalasa"; depois um endosperma real passa a consumir gradualmente esses tecidos e toma o seu lugar. O seu material, no entanto, não se prestou para um estudo detalhado do desenvolvimento do endosperma.

Desde que a questão sobre a existência ou não do endosperma em *Coffea* foi levantada por investigador (Houk) que fez parte deste Instituto Agrônomo; e desde que investigadores estrangeiros isolados trazem provas citológicas para a existência do endosperma, cabia a este Instituto reinvestigar a questão e decidí-la de uma vez por todas.

A questão foi então atacada, tanto pelo lado genético como pelo lado citológico. Finalmente, tanto umas como outras investigações revelaram plenamente a existência de endosperma em *C. arabica* L. A prova genética já foi publicada por Krug e Carvalho (10), fornecida por um interessante e único fenômeno conhecido de xenia em *Coffea*. A prova citológica ficou a nosso cargo, e o presente trabalho visa apresentar os dados obtidos nas pesquisas que foram levadas a efeito durante o ano de 1940, no Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo, em Campinas.

MATERIAL E MÉTODO

Os ovários usados neste estudo foram colhidos nos anos de 1936 e 1940; como tínhamos em mira, a princípio, somente o estudo do desenvolvimento do saco embrionário, o material colhido em 1936 consistia unicamente em botões de diversos tamanhos e de flores no dia da abertura. O material colhido em 1940 destinava-se ao estudo da fertilização e desenvolvimento do endosperma e do embrião; para

isso, grande número de flores foi marcado (*) sobre diversas plantas da espécie *C. arabica* L. var. "*semperflorens*" e "*typica*", na data da abertura. Diariamente, a princípio, e depois a tempos mais espaçados, fomos colhendo os ovários dessas flores (os últimos colhidos foram de 10 em 10 dias).

Apenas colhido, o ovário era incontinenti fixado em "Craf" (Randolf, 14); os ovários velhos eram antes submetidos a uma dissecação para que o fixador penetrasse melhor; quando os ovários já eram muito grandes, apenas os óvulos, retirados de seu interior, eram fixados.

Após a fixação por 24 horas, lavagem em álcool a 70%, desidratação e inclusão em parafina pelo método do álcool butílico, o material era cortado ao micrótomo a uma espessura de 10 a 14 microns, dependendo da idade do ovário.

Na grande maioria dos casos, a coloração dos cortes foi feita pela hematoxilina de Heidenhain, mas algumas vezes usamos o violeta cristal.

Os desenhos foram feitos à câmara clara, usando-se oculares "Leitz" 3x e 20x e uma objetiva "Zeiss" 90x, de acordo com a explicação que mais adiante fazemos das figuras.

OBSERVAÇÕES

O desenvolvimento do saco embrionário se dá enquanto o botão está ainda fechado; numa flor aberta ele já está em geral completamente formado, sendo raros os casos em que nessas flores se encontrem estados intermediários. As figuras 1 e 2 mostram dois desses estados, observados em flores abertas.

No saco embrionário pronto para a fertilização, os dois núcleos polares podem apresentar-se fundidos ou isolados. Se bem que esta fusão preceda à fertilização, parece que a polinização a apressa, pois em flores não polinizadas podem eles conservar-se independentes cerca de quinze dias.

Se por deficiência de polen ou qualquer outro motivo não se processar a fertilização, o saco embrionário permanece intacto por um tempo variável; parece, porém, que mais comumente se desintegra nos primeiros quinze dias.

Em várias flores encontramos sacos embrionários com número anormal de antípodas (em número de seis várias vezes); a figura 3 ilustra um caso em que os 3 núcleos que formariam as antípodas estão se dividindo ainda uma vez.

Desde que haja conveniente polinização, no mesmo dia da abertura da flor um tubo polínico penetra no saco embrionário (fig. 4). Essa penetração se dá pela micrópila: uma das sinérgidas desaparece à sua passagem e ele vai introduzir-se entre a oosfera e o núcleo secundário do saco embrionário (figs. 5 e 6).

(*) Agradecemos aqui ao sr. Célio N. Antunes pela marcação do florescimento de diversas plantas da var. "*semperflorens*".

Algumas vezes desaparecem as duas sinérgidas nessa ocasião; outras vezes o tubo polínico se desvia mais, e ambas permanecem intactas. Raras vezes o tubo polínico prossegue para baixo pela parede do saco embrionário, sem se introduzir entre a oosfera e o núcleo secundário do saco embrionário.

Este núcleo, resultante da fusão dos dois núcleos polares, é de recente constituição; a sua periferia irregular e seus dois nucléolos são vestígios da fusão.

Nas preparações coloridas pela hematoxilina, o tubo polínico apresenta-se enegrecido em toda a sua extensão, exceto em dois pontos próximos à extremidade; aí o tubo se engrossa consideravelmente, apresentando duas cavidades muito visíveis (figs. 5 e 6), por onde parece desprender-se os dois gametas.

Estes unem-se simultaneamente um à oosfera e outro ao núcleo secundário do saco embrionário (fig. 5). Antes dessa dupla fertilização pode-se notar que a oosfera tem um nucléolo e o núcleo secundário do saco embrionário tem um ou dois; após a fusão, o zigote apresenta de início dois nucléolos e o núcleo primário do endosperma pode apresentar dois ou três, muitas vezes de diferentes tamanhos. Detalhe da fertilização de um núcleo secundário do saco embrionário é apresentado na figura 7. Na figura 6 esse núcleo fertilizado apresenta dois nucléolos, sendo um maior e provavelmente resultante da fusão de dois outros (dos núcleos polares).

Realizada a dupla fertilização, o citoplasma do saco embrionário começa a se encher de vacúolos. Grandes, mas não numerosas inclusões aparecem no citoplasma do zigote; aliás, estas inclusões foram vistas também em oosferas de sacos embrionários que aparentemente não haviam sido fecundados, alguns dias após a abertura das flores; não são visíveis, no entanto, num saco embrionário recentemente constituído e não fertilizado. As antípodas também se enchem de vacúolos e colorem-se cada vez mais intensamente pela hematoxilina; vão degenerando, tornando-se menores e, finalmente, desaparecem; são visíveis, todavia, ainda 15 dias após a fertilização. A sinérgida, que se conserva intacta à passagem do tubo polínico, desaparece dentro de oito dias.

Durante esses oito dias, o zigote aumenta bastante de volume, e, finalmente, com o desaparecimento das sinérgidas, localiza-se no lugar destas, junto à micrópila (fig. 8). Dezoito a vinte dias após a fertilização, no máximo, é que se começa a notar nessa célula a passagem de dois nucléolos a um único.

A fusão dos nucléolos do núcleo primário do endosperma se dá dentro de 8 dias; porém, nas preparações de ovários de 15 a mais dias, e também mais tarde no endosperma em desenvolvimento, é comum se contar 3 nucléolos.

A cavidade do saco embrionário não experimenta aumento sensível de volume nos primeiros 8 dias. Daí por diante, porém, o seu volume aumenta em todos os sentidos, comprimindo assim as células do tecido

que a envolve. Esse aumento de volume pode ser apreciado a partir da figura 9. Esta e a figura 10 representam dois sacos embrionários dezessete dias após a fertilização; em ambos nota-se o desaparecimento das antípodas e das sinérgidas; na figura 10 nota-se também o desaparecimento da oosfera. O núcleo volumoso com 3 nucléolos mostra bem que foi fertilizado; o não aparecimento da oosfera sugere que a fertilização foi incompleta, isto é, a oosfera não foi fertilizada. Como resultado disso é de se esperar que se desenvolva uma semente com endosperma normal e desprovida de embrião.

Após a fecundação, e enquanto lentamente se operam as primeiras transformações no saco embrionário fertilizado, o integumento que o envolve aumenta rapidamente de volume por multiplicação de suas células, formando uma espécie de "perisperma" transitório. Este aumento de volume pode ser notado exteriormente pelo aumento do diâmetro do ovário, que já se vai apresentando como um frutinho verde. Por outro lado, o aumento de volume do saco embrionário se faz à custa das camadas mais internas desse tecido, que degeneram pela compressão que experimentam.

A figura 11 mostra um saco embrionário 24 dias após a polinização, no qual o núcleo do endosperma ainda não se dividiu; o saco embrionário representado na figura 12 é de um ovário colhido 21 dias após a abertura da flor; nele o endosperma já se apresenta bi-nucleado. Esta primeira divisão do núcleo do endosperma se dá entre 21 a 27 dias após a abertura das flores.

Por essa ocasião, o citoplasma se condensa em torno do núcleo do endosperma, e, como consequência, há um colapso das células internas do tecido que envolve a cavidade; há assim uma invasão de parte do saco embrionário por células estranhas. Estas, alongadas e, às vezes, enegrecidas pela degenerescência, foram erradamente interpretadas por Houk (4) como células do endosperma em degenerescência.

Vários estágios bi-nucleados do endosperma foram examinados e em nenhum deles se verificou a formação de uma membrana celular entre os dois núcleos. Somente uma vez conseguimos examinar um endosperma tetra-nucleado (fig. 13), e isso num ovário colhido 27 dias após a abertura da flor. Nesse caso já se podiam ver as membranas celulares entre os 4 núcleos.

Endospermas de ovários colhidos 40 dias após a abertura da flor tinham 8 células; os de 45 dias tinham 16 células; os de 30 dias tinham 12, 16, 24 e 36 células; os de 60 dias tinham 44, ± 90 e ± 120 células. Num endosperma de 50 dias encontramos núcleos aparentemente em repouso, outros em divisão, e células recentemente formadas.

Os núcleos resultantes das primeiras divisões se colam à parede das células, principalmente do lado da parede do saco embrionário. Na figura 14 vê-se um endosperma de 50 dias, com 16 células, das quais dois núcleos são visíveis junto à parede do saco embrionário.

O endosperma em desenvolvimento novamente passa a comprimir as células do tecido envolvente, que lhe vai cedendo lugar. A contagem

das células do endosperma já se torna difícil aos 70 dias ; por essa ocasião, no entanto, ele ainda apresenta a forma de um pequeno balão, no interior do "perisperma".

Daí por diante nota-se que o crescimento do endosperma se dá pelas suas células mais externas, que passam a formar um meristema muito ativo. Graças à intensa multiplicação destas células, o endosperma se vai espalhando pelo espaço que era antes ocupado pelo "perisperma" ; as células internas deste tecido se vão comprimindo e desaparecendo. Em ovários cortados 3 meses e meio após a abertura das flores, o endosperma se apresenta muito desenvolvido (fig. 17), ocupando quase todo esse espaço.

O endosperma de 4 meses já substitue o "perisperma" em toda a sua extensão, exceto numa última camada que fica, finalmente, envolvendo o endosperma ; esta camada é formada por um extrato de células achatadas e no fruto maduro toma o aspecto de uma película translúcida, conhecida por "película prateada".

Quanto ao embrião, só começa a se desenvolver muito depois do endosperma. Pelo exame das figuras 11 e 14 pode-se ver que, enquanto as células do endosperma se vão multiplicando, o zigote continua em estado de repouso, numa extremidade desse tecido em desenvolvimento. A sua primeira divisão se processa 60 a 70 dias após a abertura da flor.

A primeira divisão do zigote se dá no sentido transversal, diferenciando-se as duas células filhas pelo tamanho ; uma, a "basal", que se volta para o lado da antiga micrópila, é grande e dotada de enorme vacúolo ; a outra, a "apical", é menor e se coloca sobre esta. Uma delas (julgamos que seja a apical) divide-se ainda uma vez transversalmente ; resulta daí um proembrião com 3 células, uma das quais se comprime entre a basal e a apical. A terceira divisão no proembrião se dá nesta célula apical, mas agora no sentido longitudinal. A figura 15 mostra um proembrião em que os núcleos da célula apical já se dividiram, mas uma membrana celular ainda não apareceu.

Esta primeira divisão no sentido longitudinal constitui o início do desenvolvimento do embrião propriamente dito ; ao que parece, as outras duas células do embrião — a mediana e a basal (ou unicamente a basal), passarão a formar o suspensor.

As fases posteriores do desenvolvimento do embrião e do suspensor, devido à rapidez com que se processam as divisões e à crescente dificuldade de se trabalhar com o material, não foram vistas em detalhe.

O embrião tem a forma de um escudo 3 meses e meio (105 dias) após a abertura da flor (fig. 17). Na figura 16 pode-se observar o suspensor, numa semente de 4 meses (120 dias). Numa semente de 143 dias, em que o endosperma já está completamente desenvolvido e o "perisperma" reduzido a uma "película prateada", diferenciam-se no embrião os cotilédones (fig. 18).

Nota-se, então, a formação de uma fenda interna por toda a extensão do endosperma, e a partir do local em que o embrião se aloja.

Numa semente de 160 dias encontra-se um embrião completo, no qual se diferenciam dois (às vezes três e quatro) pequenos cotilédones e um hipocotilo.

Durante o processo da germinação, os cotilédones se tornam verdes e se desenvolvem pelo interior da fenda de que tratamos acima.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No tocante à constituição do óvulo e ao desenvolvimento do saco embrionário, já apresentamos, na introdução, o que de notável tem sido discutido. Em resumo, pode-se concluir que o óvulo de *C. arabica* L. é constituído, a princípio, por um tênue nucelo, em volta do qual cresce um único e grande integumento. Dentro desse nucelo diferencia-se um macrosporocito que por duas divisões sucessivas produz 4 macroporos, dos quais 3 se degeneram, enquanto o chalasal dá origem ao saco embrionário. Num óvulo já bem desenvolvido desaparece o nucelo devido à compressão sofrida pelas suas células ao se formar o saco embrionário. Um óvulo velho é constituído, pois, por um grande integumento, no interior do qual se aloja um saco embrionário.

A formação de um número anormal de antípodas no saco embrionário de *Coffea* foi considerada por Leliveld (11) como uma das manifestações da não fertilização; nós encontramos, várias vezes, sacos embrionários assim anormais; a figura 3, por exemplo, ilustra um caso em que os 3 núcleos que formariam as antípodas se estão dividindo mais uma vez; como não se notam aí vestígios de que esses núcleos já tivessem feito parte de antípodas uma vez constituídas, parece-nos que a formação de número anormal de antípodas se dá antes da formação de um saco embrionário normal, e, portanto, não depende da falta de fertilização.

O fenômeno da dupla fertilização pode ser examinado, de modo que não podem prevalecer dúvidas (Houk, 4) sobre se há ou não a fertilização do núcleo do saco embrionário. Ocasionalmente, a dupla fertilização pode ser incompleta, pois, às vezes, se encontram sementes com embrião normal e aparentemente desprovidas de endosperma, ou ainda sementes com endosperma normal, mas desprovidas de embrião; estas anormalidades podem ser devidas a uma fertilização incompleta, e a figura 10, apresentando um saco embrionário no qual a célula-ovo degenerou, tem o dom de robustecer esta hipótese. Segundo Leliveld (11), nos casos normais, a fecundação se realiza 30 a 50 horas depois da abertura das flores. Nas flores por nós colhidas, verificamos que esse fenômeno pode ocorrer ainda nas primeiras 12 horas após a abertura, podendo, no entanto, retardar alguns dias.

Os fenômenos que se passam no saco embrionário após a fertilização sucedem-se, a princípio, lentamente, não havendo propriamente um repouso segundo cita Leliveld (11). O integumento que então envolve o saco embrionário aumenta de volume; este aumento não vai avante, todavia, se não houver a fertilização; segundo Leliveld, isto era independente da fertilização.

Como acabamos de dizer, é o *integumento* e não o *nucelo* (ao contrário do que pensa Mayne, 12) que passa a formar o grande tecido que envolve o endosperma em formação. No decorrer das nossas "Observações", chamamos este tecido de "perisperma", pois não é tecido resultante de fecundação; entretanto, como não provem do nucelo, é discutível se se pode assim chamar um tal tecido.

O zigote é a única célula que repousa nos primeiros tempos do desenvolvimento do fruto. O núcleo do endosperma passa a se dividir e o endosperma já é alguma coisa distinta antes que o embrião comece a se diferenciar. Não pensou assim Houk (4). No entanto, devido à confusão feita por esse autor, interpretando células do endosperma como células do embrião, células do integumento como células do endosperma, etc., preferimos não discutir aqui o seu trabalho.

Segundo Leliveld (11), a formação de paredes celulares no endosperma se dá repentinamente, quando o endosperma já tem cerca de 64 núcleos e daí por diante a formação da parede celular se segue imediatamente a cada divisão nuclear. Segundo as nossas observações, parece que, realmente, o endosperma não é celular desde o início; entretanto, não pudemos verificar se a divisão celular se processa após o estágio bi-nucleado ou tetra-nucleado; o que pudemos averiguar, com certeza, foi que o endosperma com 4 núcleos já é celular.

O endosperma de *Coffea* parece ser do tipo nuclear, porque a formação de paredes celulares não foi vista ocorrer na primeira divisão. A correlação entre este tipo de endosperma e o desenvolvimento retardado do embrião está de acordo com a correlação que Rao (15) descreveu entre os tipos de embrião e endosperma.

As primeiras divisões são simultâneas para todos os núcleos, mas o fato de se encontrarem, como encontramos, endospermas com 12, 18 e 20 núcleos mostra que em alguns casos essa simultaneidade é quebrada logo. Encontramos mesmo endospermas com poucas células em que umas estavam com seus núcleos em plena divisão, outras já estavam bem mais adiantadas e outras pareciam repousar.

O endosperma, empurrando e consumindo as células do perisperma, é, finalmente, recoberto por um último estrato de células que constituirá mais tarde a "película prateada". Estamos assim de acordo com Leliveld (11) e Fagerlind (2) e em desacordo com Mayne (12), segundo o qual as células restantes do "perisperma" formariam apenas as camadas internas da película prateada.

Uma semente madura de café constitui-se, então, de uma grande massa de endosperma, recoberta por uma fina "película prateada" originária do integumento, alojando no seu interior um pequeno embrião diferenciado. O "pergaminho" que envolve a semente não faz parte da mesma; ele corresponde ao envoltório da semente do pêsego, pois é o endocarpo do fruto.

SUMMARY

The ovule of *C. arabica* L. consists of a single integument and a small nucellus which disappears as the ovule matures.

Three of the four macrospores resulting from the division of the macrosporocyte, degenerate. The remaining chalazal cell gives rise to a "normal" embryo sac, which is ready for fertilization at the time of the flower opening.

Double fertilization occurs, as a rule, the day the flower opens. The embryo sac then increases in volume and compresses the inner integument cells. The outer cells of the integument, however, multiply actively, giving rise to the "perisperm".

After degeneration of the synergids and antipodals, the zygote stays near the micropyle in a resting stage, while the primary endosperm nucleus divides.

This first division of the endosperm occurs from 21 to 27 days after flower opening. The cytoplasm condenses around the newly formed nuclei, permitting the adjacent tissues to sink into the embryo sac.

Since the separating walls were not seen at the binucleate stage and were present at the four-nucleate stage, it seems that the endosperm belongs to the "nuclear type".

As the number of endosperm cells increases, the "perisperm" cells are again compressed and give more and more room to the new tissue. The first division in the zygote occurs from sixty to seventy days after flower opening, when the endosperm is already multinucleate.

A differentiated embryo develops, with a hypocotyl and two small cotyledons in the ripe seed.

In the ripe seed the "perisperm" disappears almost completely: its remains form the thin "silver skin" which envelops the endosperm.

The parchment layer which envelops the seed is the endocarp.

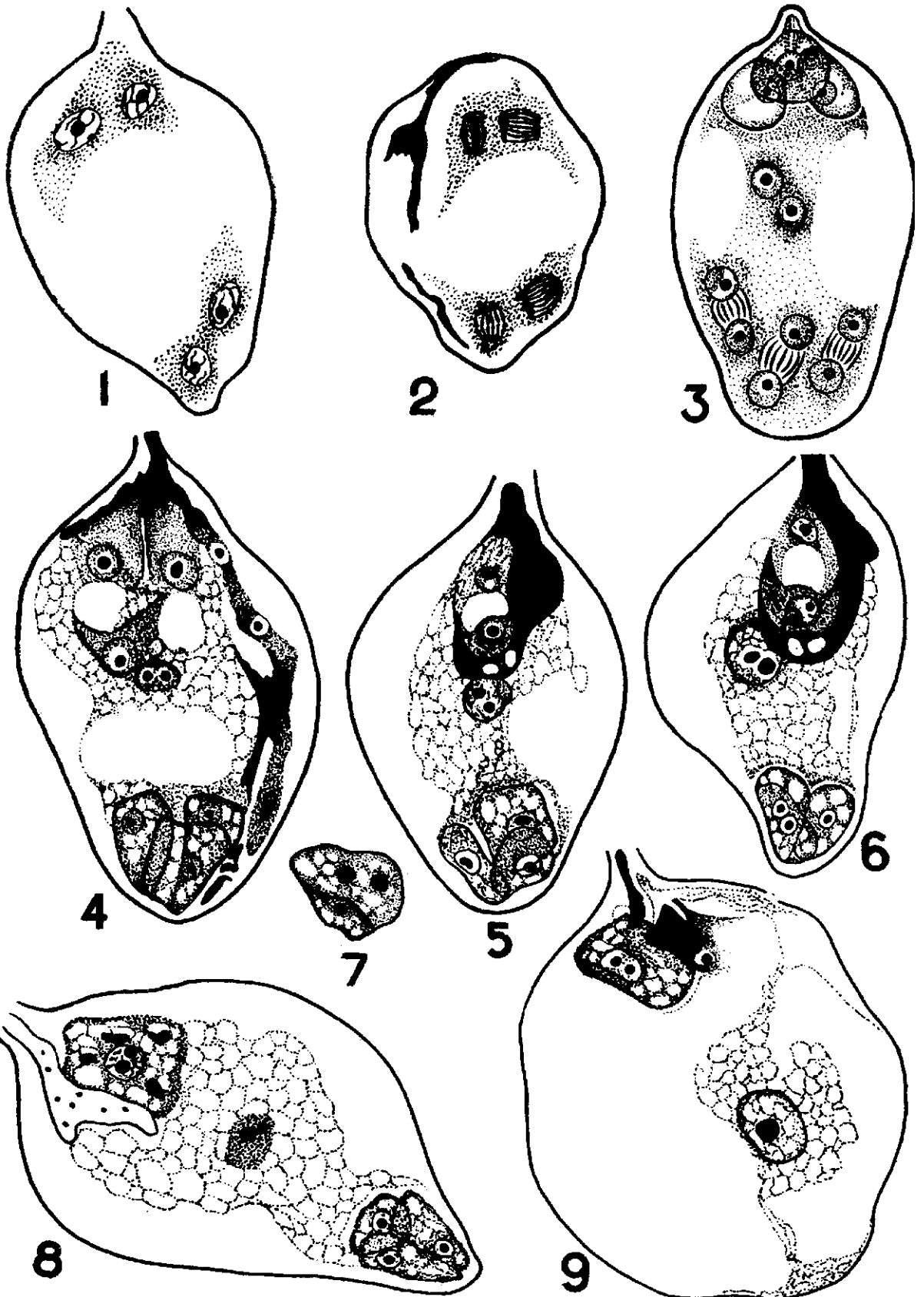
LITERATURA CITADA

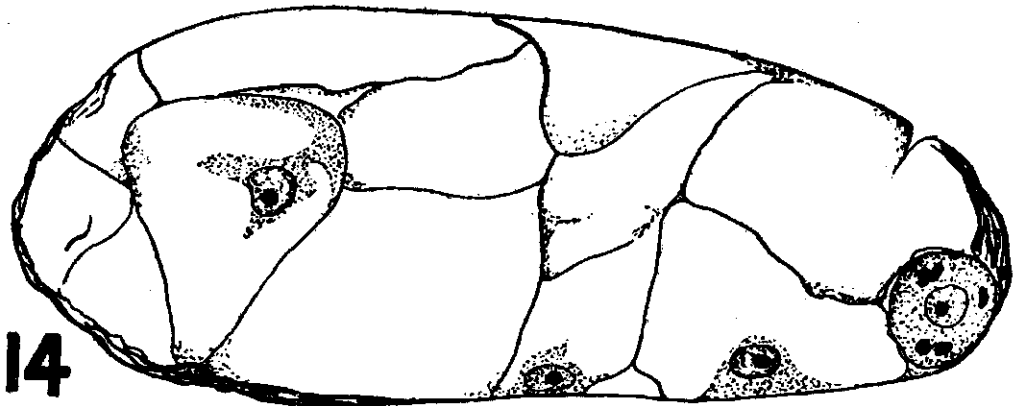
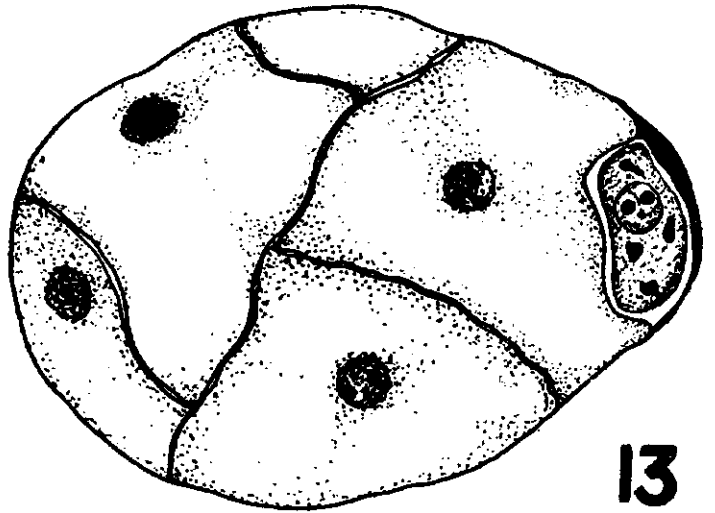
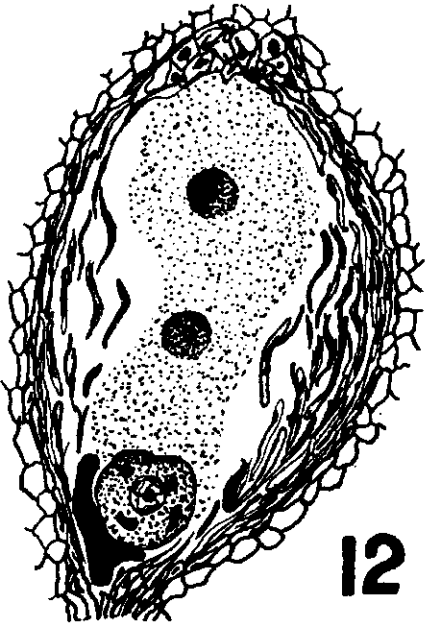
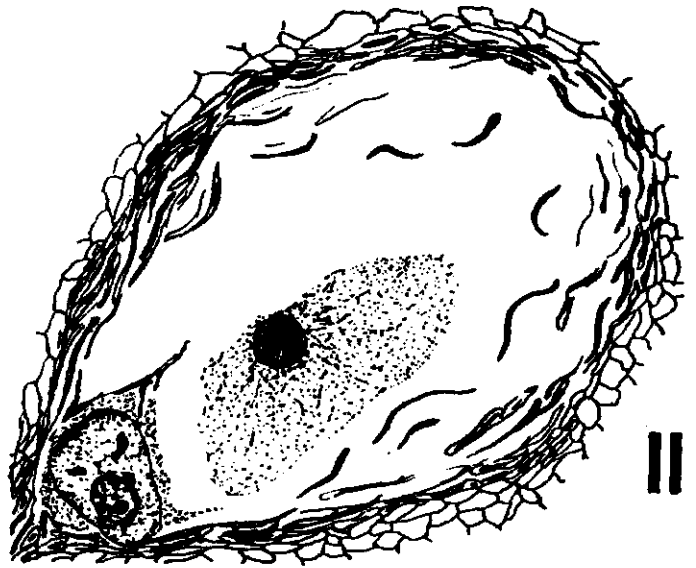
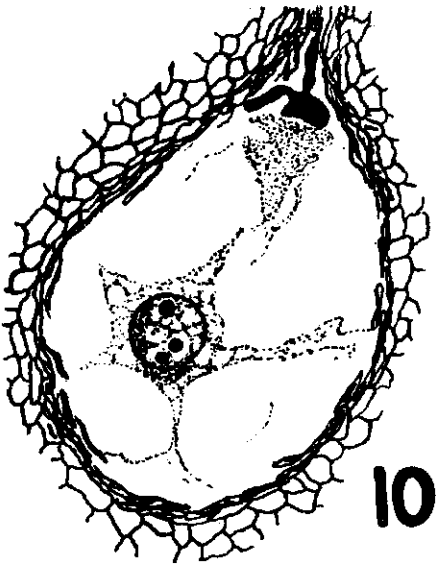
1. **Faber, F. C. von.** Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. Ann. Jard. Buitenzorg 2. ser. **10**(=25):59-160, taf. 1-12. 1912.
2. **Fagerlind, F.** Perisperm oder Endosperm bei *Coffea*? Svensk Botanisk Tidsk. **33** (3):303-309. 1939.
3. **Houk, W. G.** The ovule and seed of *Coffea arabica* L. Science **83** (2159):464-465. 1936.
4. **Houk, W. G.** Endosperm and Perisperm of Coffee with notes on the morphology of the ovule and seed development. Am. Jour. Bot. **25** (1):56-61. 1938.
5. **Graner, E. A.** Megasporogenesis in *Coffea arabica* L. Arquivos do Inst. de Biologia Vegetal, Rio-de-Janeiro **3** (1):69. 1936.
6. **Graner, E. A.** Embriogênese de *Coffea*. I. Desenvolvimento do óvulo em *Coffea arabica* L. Anais da 1.ª Reun. Sulamer. de Bot. **3**:193-202. 1938.
7. **Joshi, A. C.** A note on the morphology of the ovule of Rubiaceae with special reference to *Cinchona* and *Coffea*. Curr. Sci. **7** (5):236-237. 1938.
8. **Krug, C. A.** Beiträge zur Zytologie des Genus *Coffea*. Der Züchter **6**:166-168. 1934.
9. **Krug, C. A.** Cytological Observations in *Coffea* — III. Jour. Gen. **34**:399-414. 1937.
10. **Krug, C. A. e A. Carvalho.** Genetical Proof for the existence of Coffee endosperm. Nature **144** (3646):515. 1939.
11. **Leliveld, J. A.** Vruchtzetting Bij Koffie. Archief voor de Koffiecultuur in Ned. Indie, n.º **3**:127-164. 1938.
12. **Mayne, W. Wilson.** Annual Report of the Coffee Scientific Officer. 1936-1937. The Mysore Coffee Exp. Sta. Bull. n.º 16. pág. 6. 1937.
13. **Mendes, A. J. T.** Os cromosômios das Rubiáceas. Instituto Agron. do Estado, Campinas. Bol. Técn. **55**. 11 pág. 1938.
14. **Randolf, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. Stain Techn. **10** (3):95-96. 1935.

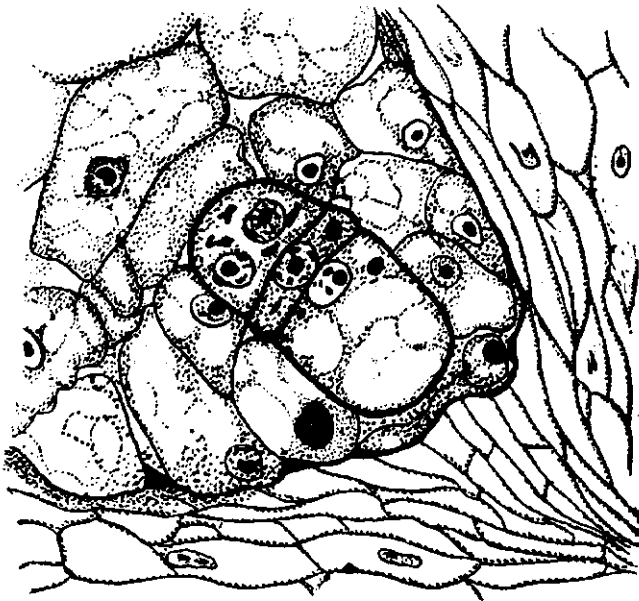
15. Rao, V. S. The correlation between embryo-type and endosperm type. *Ann. of Bot.* n. s. 2(6):535-536. 1938.
16. Schnarf, K. Embryologie der Angiospermen. *Handbuch der Pflanzenanatomie.* II (2):689 pp. 1929.
17. Schnarf, K. Vergleichende Embryologie der Angiospermen. 354 pp. Berlin, 1931.
18. Schnarf, K. Contemporary understanding of embryo-sac development among angiosperms. *The Bot. Rev.* 2(12):565-585. 1936.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

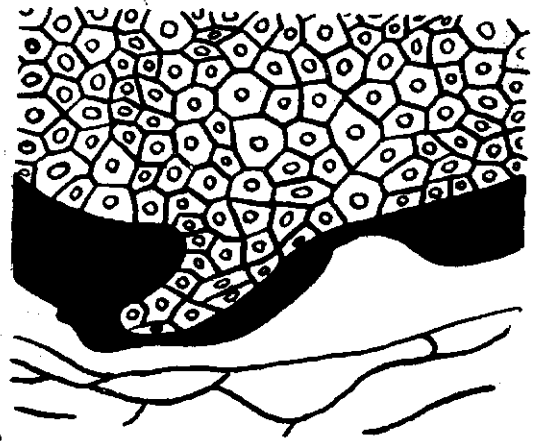
- Figuras 1-18. *Coffea arabica* L. Fig. 1: Saco embrionário tetra-nucleado encontrado em flor aberta. Fig. 2: Saco embrionário passando de tetra- a octa-nucleado, em flor aberta. Fig. 3: Saco embrionário com formação de número anormal de antípodas. Fig. 4: Saco embrionário completo, vendo-se um tubo polínico. Fig. 5 e 6: Saco embrionário no momento de fertilização. Fig. 7: Detalhe da fertilização do núcleo do saco embrionário. Fig. 8: Saco embrionário fertilizado, no qual já desapareceram as duas sinérgidas; o zigote se localiza junto à micrópila. Fig. 9: Saco embrionário fertilizado, no qual já desapareceram também as antípodas. Fig. 10: Saco embrionário fertilizado, no qual também a célula-ovo degenerou. Fig. 11: Saco embrionário 24 dias após a abertura da flor; endosperma uni-nucleado; colapso das células que envolvem a cavidade. Fig. 12: Endosperma bi-nucleado. Fig. 13: Endosperma tetra-nucleado; membranas celulares já separam os quatro núcleos. Fig. 14: Endosperma, 50 dias após a abertura da flor, com muitas células. Fig. 15: Endosperma e proembrião, 70 dias após a abertura da flor. Fig. 16: Detalhe da base de um embrião, mostrando o suspensor, 4 meses após a abertura da flor. Fig. 17 e 18: Cortes transversal e longitudinal em sementes de fruto verde (3 meses e meio a 4 meses); *emb*- embrião; *end*- endosperma; *f*- fenda; *pe*- "perisperma" ("película prateada"); *per*- "pergaminho" (endocarpo).
- Figuras 1 a 6 e 8 a 15: desenhadas à câmara clara com objetiva 90 e ocular 3x, dando um aumento de 630x. Reduzidas para 315x.
- Figura 7: idem, com objetiva 90 e ocular 20x, dando um aumento de 4200x.
- Figuras 17 e 18: desenhadas a mão livre com um aumento de cerca de 20x. Reduzidas para 5x.



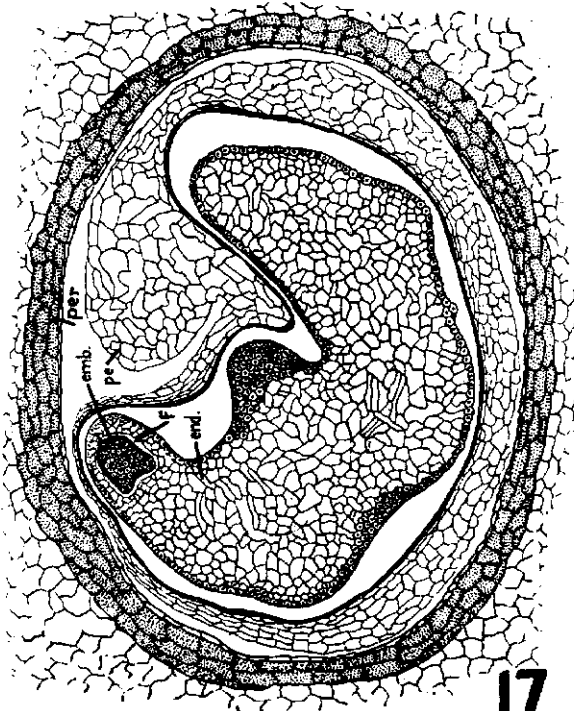




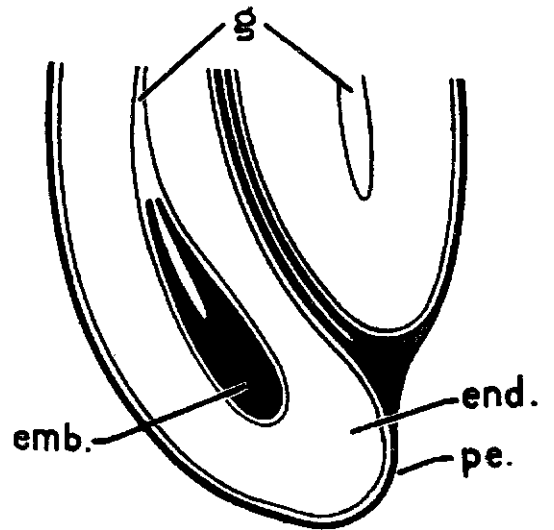
15



16



17



18