

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM *COFFEA*

XIII — OBSERVAÇÕES PRELIMINARES EM *COFFEA ARABICA* L. VAR. *RUGOSA*
K. M. C. (1)

DIXIER M. MEDINA

Engenheiro agrônomo, Secção de Citologia, Instituto Agronômico de Campinas

1—INTRODUÇÃO

A variedade *rugosa* de *Coffea arabica* L. foi descrita por Krug, Mendes e Carvalho (4), baseando-se as observações em um cafeeiro encontrado no antigo cafézal da Estação Experimental Central de Campinas. Esta planta, que recebeu o número 134, tem sido propagada por enxertia, dela existindo vários exemplares na coleção de cafeeiros dessa Estação Experimental. Difere da variedade *typica* da espécie principalmente por apresentar porte menor, ramos longos e pendentes com internódios curtos, fôlhas oblanciadas de lâmina coriácea e de um verde bem escuro, muito ondulada na superfície superior e rugosa na face inferior, flores menores, floração pequena e frutificação baixa (4). Para aquêles que estão familiarizados com as variedades de café, as fôlhas do *rugosa* lembram, pela sua textura, as da variedade *bullata* de *C. arabica* com suas formas hexaplóide ($2n=66$) e octoplóide ($2n=88$).

Os dados até agora obtidos pela Secção de Genética do Instituto Agronômico, embora insuficientes, devido à escassez de florescimento, têm indicado que a variedade *rugosa* parece ser fértil nos cruzamentos com outras variedades de *C. arabica*. Tanto nas progênies como nos híbridos obtidos, até agora não se encontrou nenhum cafeeiro exatamente igual ao original.

Duas hipóteses foram então formuladas, e que poderiam explicar a não transmissão desse caráter :

a) A planta seria uma quimera citológica, sendo a rugosidade das fôlhas consequência da existência de camadas de células com número múltiplo de cromossômios, não tendo sido afetada a camada geradora dos gametas ; b) Uma quimera genética, ocorrida em camada geradora que toma parte na formação das fôlhas e não na dos gametas.

Satina e Blakeslee (8), por meio de quimeras periclinais em *Datura*, puderam determinar três camadas geratrizes dos diversos tecidos da planta, sendo que a primeira delas é responsável pela epiderme e a segunda, entre outras funções, toma parte na formação dos gametas. As três camadas contribuem para a formação da fôlha.

(1) Trabalho apresentado à Segunda Semana de Genética, realizada em Piracicaba, de 8-12 de fevereiro de 1949.

Frost e Krug (2), trabalhando com quimeras citológicas em *Citrus*, encontraram, no mínimo, três camadas geratrizes; só as duas primeiras entram na formação das fôlhas.

Dermen (1) verificou também três camadas histogênicas em macieiras.

Quanto ao cafeeiro, nada se sabe ainda a êste respeito. O presente trabalho é o resultado dos estudos levados a efeito no sentido de verificar a primeira hipótese atrás citada, isto é, a existência ou não de quimera citológica. Essa pesquisa também contribuiria para o estudo das camadas histogênicas em *Coffea arabica*.

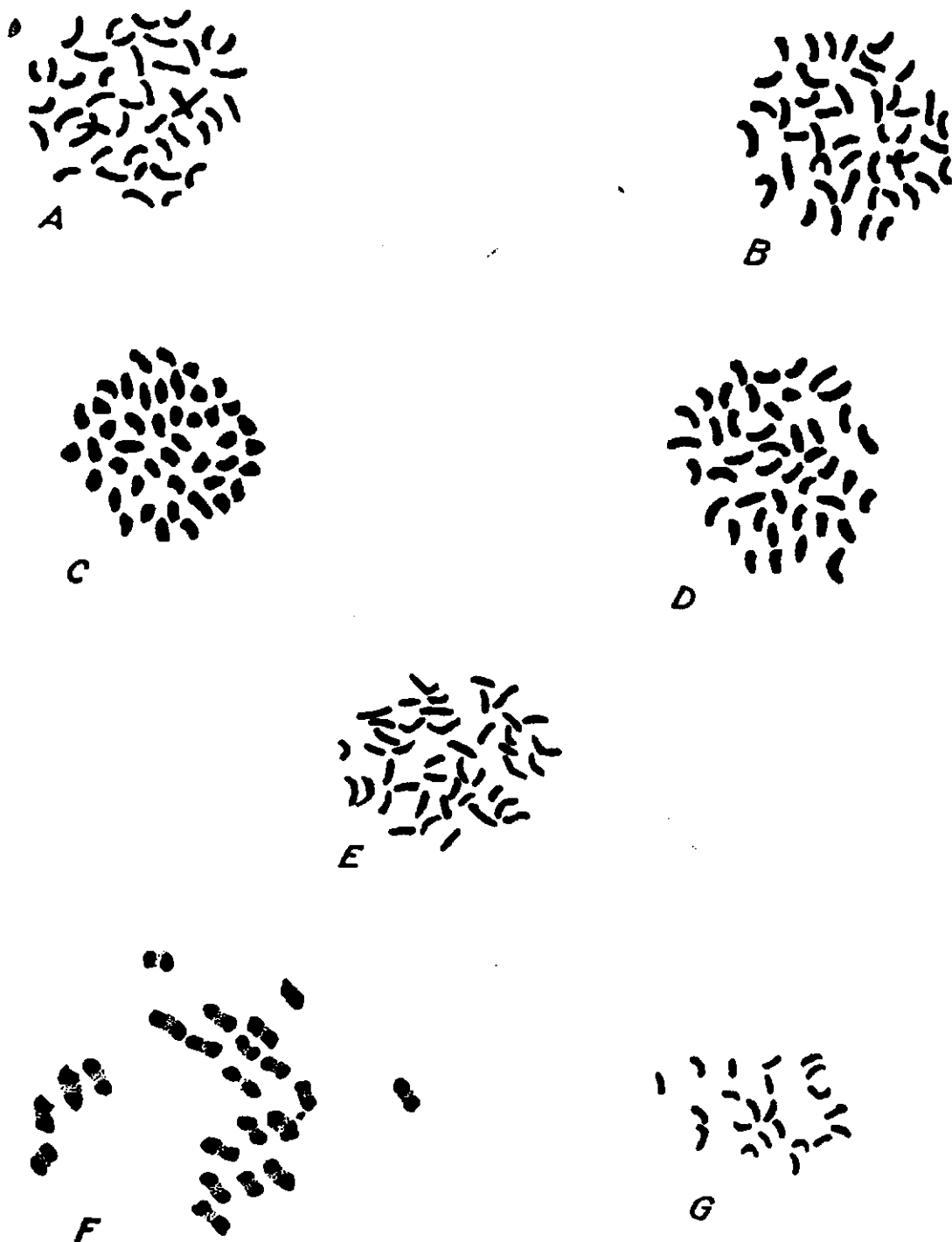
2—MATERIAL E MÉTODO

2.1—FÔLHAS

Gemas foliares e fôlhas novas foram colhidas e fixadas imediatamente de uma das seguintes formas: a) diretamente em "Craf" (6) durante vinte e quatro horas; b) prefixação em "Carnoy" (clorofórmio — três partes; álcool absoluto — duas partes; ácido acético glacial — uma parte), vinte e quatro horas e subsequente transferência para "Craf" por mais vinte e quatro horas. Após a fixação, o material foi lavado em álcool a 70%, procedendo-se em seguida à infiltração pela parafina, através de uma série com álcool butílico. Os cortes foram feitos com a espessura de 6 a 10 micra e a coloração pela hematoxilina de Heidenhain ou pelo violeta cristal. De fôlhas desenvolvidas da variedade *rugosa* e de uma planta da variedade *bourbon* foram também feitas lâminas para comparação de sua estrutura anatômica, sendo o material tratado da mesma forma anterior. As melhores lâminas foram obtidas com o material prefixado em "Carnoy" e colorido pela hematoxilina.

Além do método acima, utilizou-se ainda, para contagem de cromossômios, o da coloração rápida de fôlhas novas pelo método do carmim acético (5). O material foi colhido diretamente em "Carnoy", onde permaneceu durante algumas horas ou até o dia seguinte, sendo daí transferido para uma solução alcoólica de HCl a 17%, durante 4 minutos. O excesso de ácido foi retirado por uma rápida passagem em "Carnoy" e em seguida foi o material pôsto em novo recipiente com "Carnoy". As fôlhas foram retiradas uma a uma e colocadas numa gôta de carmim acético sôbre uma lâmina, que foi aquecida lentamente até o material tornar-se escuro. A seguir enxugou-se o material e a lâmina com um pedaço de papel chupão e adicionou-se novamente, à lâmina, uma gôta de carmim. Depois de esmagar levemente a fôlha com uma agulha de ferro, foi colocada sôbre ela uma lamínula. A lâmina de novo foi aquecida, fazendo-se pressão sôbre a lamínula com uma rôlha, de modo que o tecido se desagregasse e as células se apresentassem numa só camada.

Se bem que tanto as preparações permanentes como as temporárias tivessem fornecido numerosas figuras, muito bem coloridas, as contagens dos cromossômios, em muitos casos, deram margem a dúvidas. Tentou-se



A — Metáfase em fôlha nova, célula da epiderme inferior, $2n = \pm 43$, hematoxilina, $\times 4\ 200$. B — Idem em célula da 3.^a camada após a epiderme inferior, $2n = \pm 45$, hematoxilina, $\times 4\ 200$. C — Metáfase em célula de fôlha nova, $2n = \pm 46$, nigrosina, $\times 2\ 140$. D — Idem, $2n = 44$, $\times 2\ 140$. E — Metáfase em ponto de raiz, $2n = 44$, hematoxilina, $\times 2\ 140$. F — Metáfase I em c.m.p. mostrando 22II , $\times 2\ 800$. G — Metáfase em microsporo, $n = 22$, $\times 1\ 400$.

também um terceiro processo, recentemente descrito por Rosen (7), de coloração rápida dos cromossômios pela nigrosina. Boas preparações foram obtidas por este processo, porém não se pode dizer que as dúvidas surgidas nas contagens dos cromossômios tenham sido menores que em ambos os outros dois processos.

2.2—RAÍZES

Os atuais exemplares da variedade *rugosa* se acham enxertados sobre outra variedade de *Coffea arabica*. Para obtenção de raízes da haste, estacas foram tratadas com Rizopon B (Estimurhiz B) (3), tendo-se conseguido resultados satisfatórios. Tanto estas raízes como as das plantas obtidas por autofecundação, foram fixadas em "Craf", incluídas em parafina pelo método do álcool butílico, cortadas a 8 micra de espessura e coloridas pela hematoxilina férrica.

2.3—BOTÕES E FLORES

Para o estudo da meiose nas c.m.p. e da mitose nos grãos de pólen, foram colhidos botões, diariamente, durante muito tempo, em uma mistura de três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial. O material foi sempre conservado em refrigerador, somente sendo retirado para uma troca por fixador novo, vinte e quatro horas após a colheita e no momento do exame. As anteras foram coloridas pelo método usual do carmim acético.

Botões grandes foram protegidos com sacos de papel, para evitar contaminação por pólen estranho, por ocasião da abertura; quando as flores se abriram, uma parte foi conservada para estudo de autopolinização e outra foi colhida e levada para o laboratório. Prepararam-se lâminas com um filme de ágar a 0,5% e 15% de sacarose, semeando-se sobre elas o pólen. As lâminas foram conservadas em câmara úmida à temperatura ambiente. Quatro horas depois, já se podiam observar os grãos de pólen germinados. A contagem, porém, foi feita vinte e quatro horas depois.

Os desenhos foram feitos em câmara clara com os aumentos que vão especificados junto às figuras que ilustram o presente trabalho.

3—RESULTADOS OBTIDOS

3.1—ESTUDOS DAS FÔLHAS

Em células da epiderme, do mesófilo e das nervuras, puderam sempre ser verificadas metáfases somáticas com um número de cromossômios próximo de 44 (est. 1—A, B, C e D). Encontraram-se figuras com 42, 43, 44, 45, 46, 47 e 48 cromossômios, porém, apesar das numerosas lâminas examinadas, nunca foi possível confirmar essas contagens, sem deixar dúvidas. Deve-se levar em consideração que os cromossômios de *Coffea arabica* são muito pequenos, oferecendo sérias dificuldades o seu estudo em material impróprio, como uma fôlha em desenvolvimento.

Em cortes longitudinais e transversais de fôlhas do exemplar *rugosa* e do *bourbon* é difícil verificar qualquer diferença, quer no tamanho das células em geral, quer na organização das camadas e tecidos.

3.2—ESTUDO DAS RAÍZES

Tanto em raízes de estacas da planta *rugosa* (est. 1—*E*) como em raízes de plantas provenientes de sementes autofecundadas e não autofecundadas, determinou-se sempre $2n=44$ cromossômios, tendo sido as contagens realizadas em células de tôdas as camadas, desde a epiderme até o cilindro central.

3.3—MICROSPOROGÊNESE E ESTUDO DO PÓLEN

O exame do material colhido para êste estudo revelou, em metáfase I, 22 pares de cromossômios (est. 1—*F*). A distribuição dos cromossômios em anáfase I é normal, não se observando “laggards”. Em metáfase II, verificaram-se 22 cromossômios em cada um dos pólos.

Na primeira divisão somática, ocorrida no microsporo, contaram-se, também, $n=22$ cromossômios (est. 1—*G*). Quando semeado em lâmina preparada com ágar e sacarose, o pólen germina dentro de poucas horas. Depois de vinte e quatro horas, acharam-se 69% de germinação, percentagem essa normal, para *C. arabica*.

4—RESUMO E CONCLUSÕES

A ausência de plantas exatamente iguais ao *rugosa*, na descendência da planta estudada, sugeriu a hipótese de se tratar de uma quimera cromossômica. A rugosidade das fôlhas seria resultante da ocorrência de camadas de células de tamanhos diferentes, com números múltiplos de cromossômios, permanecendo tetraplóide a camada responsável pela formação dos gametas.

O exame de fôlhas novas, em crescimento, revelou que aí não ocorrem camadas com números múltiplos de cromossômios. As melhores contagens feitas mostraram, sempre, números muito próximos de 44 cromossômios.

Estudando-se a microsporogênese, verificou-se que os microsporocitos têm $2n=44$ cromossômios e que os grãos de pólen são formados através de um processo normal, apresentando $n=22$ cromossômios.

As raízes, tanto de estacas de hastes do cafeeiro original como de plantas descendentes dêsse cafeeiro, mostraram, também, que o tecido somático é inteiramente tetraplóide.

De acôrdo com êsses resultados obtidos, pode-se excluir a hipótese de que a planta *rugosa* seja uma quimera, com camadas de células com números múltiplos de cromossômios. Pode-se, igualmente, concluir que o cafeeiro é tetraplóide, tal como as demais variedades de *C. arabica*.

Resta, todavia, a possibilidade de ser o caráter *rugosa* devido a uma mutação gênica, ocorrida em uma ou mais camadas que afetam a fôlha, mas que não entram na formação das células reprodutoras. Esta hipótese, todavia, é difícil de ser posta à prova.

SUMMARY

The *Coffea arabica* L. variety *rugosa* has been characterized as having rugose or roughened leaves. However, progenies of this variety obtained from selfed and open pollinated flowers have not, as observed to date, produced plants with characteristic rugose or definitely roughened leaves. This lack of rugose leaves in the seedling progeny of the variety *rugosa* led to the present cytological investigation to determine whether rugose leaves might be due to differences in the polyploid nature of the component leaf layers.

Chromosome counts were made in cells of tissue obtained from root tips of seedlings and from root tips from stem cuttings, and from very young leaf buds. Chromosomes were also counted in the microsporocytes and in the microspores. The results of the cytological observations indicate that in the plant tissues examined there was an average number of 44 chromosomes.

The counting of chromosomes in the coffee leaf buds was difficult due to the small size of the chromosomes. Observations also showed that microsporogenesis in the variety *rugosa* was normal and that the microspores contained 22 chromosomes.

The results of this investigation show that *Coffea arabica* L. var. *rugosa* is a tetraploid plant, as are several other varieties of *C. arabica* that have been studied. The cytological observations also show that the rugose or rough condition of the leaves is not due to the presence of tissue layers of different polyploid nature.

LITERATURA CITADA

1. **Dermen, Haig.** Chimeral apple sports and their propagation through adventitious buds. Jour. of Hered. **39** : 235-242. 1948.
2. **Frost, H. B. e C. A. Krug.** Quimeras periclinais diplóides-tetraplóides surgidas em forma de variações somáticas em Citrus. Bragantia **4** : 449-474. 1944.
3. **Inforzato, R.** O emprêgo de hormônios no enraizamento de estacas de cafeeiro. Bol. Super. Serv. Café do Estado de São Paulo **21** : 288-293. 1946.
4. **Krug, C. A., J. E. T. Mendes e A. Carvalho.** Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no E. de São Paulo. Bol. Téc. do Instituto Agrônômico de Campinas **62** : 9-57, fig. 1 — 122, est. I — LVIII. 1938.
5. **Mendes, L. O. T.** Investigações preliminares sôbre a duplicação do número dos cromossômios da seringueira pela ação da colchicina. Bol. Téc. do Instituto Agrônômico do Norte **7** : 3-60. 1946.
6. **Randolf, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. Stain Techn. **10** : 95-96. 1935.
7. **Rosen, Gosta von.** The rapid nigrosine-method for chromosome counts applicable to all the growing tissues of the plant. Hereditas **33** : 567-570. 1947.
8. **Satina, S., A. F. Blakeslee and Amos F. Avery.** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. Am. Jour. of Bot. **27** : 805-905. 1940.