

MORFOLOGIA DOS CROMOSSOMOS NUCLEOLARES EM FASE DE PAQUÍTENO
NO GÊNERO *Coffea* L.

CECÍLIA ALZIRA FERREIRA PINTO MAGLIO

Orientadora: Profa. Dra. Neusa Diniz da Cruz

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP) para obtenção
do título de Mestre.

CAMPINAS

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

- 1983 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

Ao Jean,

Ao Gustavo e

Ao Guilherme

dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Queremos expressar aqui nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, através de incentivo, de auxílio e de sugestões, principalmente:

À Profa. Dra. Neusa Diniz da Cruz, Chefe da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas, por sua orientação, apoio, amizade e a quem devo a minha formação científica.

À Direção do Instituto Agronômico de Campinas pelas facilidades concedidas na execução deste trabalho.

À Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas na pessoa do Eng^o Agr^o Dr. Alcides Carvalho pela autorização na coleta do material das plantas de café em coleção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Mestrado concedidas, permitindo a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Dr. Peter E. Gibbs, do Departamento de Botânica da Universidade de St. Andrews, Escócia, pelas valiosas críticas e sugestões.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas que me apoiaram no decorrer da realização deste trabalho, especialmente ao Dr. William A. Stubblebine pelas correções da parte em inglês.

Aos funcionários da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas, principalmente, ao Sr. Noé González Blanco pelos serviços datilográficos, e à Srta. Eliete Rachel Bulhões Dias pelo auxílio na realização das preparações citológicas.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais da UNICAMP, pelo auxílio e amizade, particularmente à Sra. Maria Odete Pedrosanti pela ajuda na realização das preparações citológicas.

Ao Sr. Abdo Neme Abdo, Chefe da Seção de Desenho do Instituto Agronômico de Campinas, pela ajuda na confecção dos esquemas a nanquim.

À minha cunhada, Maria Elisa Megid Pinto, pela datilografia definitiva e imensa colaboração.

Aos colegas da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas e colegas do curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pelo auxílio e amizade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

São devidos ã minha mãe
Sra. Cecília A.F. de Souza
Pinto pelo cuidado dedica-
do aos meus filhos, sem o
qual este trabalho seria
praticamente impossível.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Algumas considerações sobre o gênero <i>Coffea</i> L.	3
2.2. Análise em paquíteno e cromossomos nucleolares	10
2.3. Nucléolos e cromossomos nucleolares	16
2.3.1. Nucléolos, ploidia e filogenia	16
2.3.2. Cromossomos nucleolares	21
3. MATERIAL	25
4. MÉTODOS	30
4.1. Escolha de material	30
4.2. Coleta e fixação do material	31
4.3. Preparação das lâminas	32
4.4. Desenhos e fotografias	33
4.5. Medidas	33
4.6. Herborização e conservação de sementes	34
5. RESULTADOS	36
5.1. Análise cromossômica	36
5.1.1. <i>C. liberica</i> Hiern	37
5.1.2. <i>C. kapakata</i> Hirsch.	38
5.1.3. <i>C. eugenioides</i> Moore	38
5.1.4. <i>C. dewevrei</i> De Wild et Th. Dur.	39
5.1.5. <i>C. congensis</i> Froehner	40
5.1.6. <i>C. canephora</i> Pierre ex Froehner	40
5.1.7. <i>C. salvatrix</i> Swynn et Phil	41
5.1.8. <i>C. racemosa</i> Lour.	42

5.1.9. <i>C. stenophylla</i> G. Don	43
5.1.10. <i>C. arabica</i> L.	44
5.2. Medidas	44
6. DISCUSSÃO	55
6.1. Número de cromossomos nucleolares e nucléolos	55
6.2. Morfologia dos cromossomos nucleolares empaquíteno.	60
7. RESUMO E CONCLUSÕES	71
8. SUMMARY AND CONCLUSIONS	74
9. BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Coffea* L. vem sendo extensivamente estudadas do ponto de vista genético, citológico, bioquímico, botânico e mais recentemente palinológico, isto devido a sua importância econômica. Apesar dos inúmeros trabalhos que têm sido feitos com a finalidade de estabelecer as posições taxonômicas e as relações de afinidade entre as espécies e as variedades de *Coffea* L., muitas dúvidas ainda persistem sobre o assunto. A classificação de espécies no gênero, baseada quase que somente em caracteres morfológicos, anatômicos e distribuição geográfica, necessita de bases mais consistentes, como requer a taxonomia atual.

Dentro do gênero há provas de proximidade genética e também de semelhanças cariotípicas entre algumas espécies, frente a uma marcada diferenciação morfológica das mesmas.

O número básico de cromossomos para o gênero é $x = 11$, sendo todas as espécies diplóides ($n = 11$), com exceção de uma única delas, *Coffea arabica* L., que é tetraplóide ($n = 22$). A origem dessa última espécie, ainda pouco clara, pode ter ocorrido através de duas possibilidades, autopoliploidia ou alopoliploidia, sendo esta última a de maior aceitação por parte de diversos pesquisadores. Dentro da hipótese da alopoliploidia, várias espécies têm sido sugeridas como possíveis ancestrais de *C. arabica*, dentre elas, *C. canephora* Pierre ex Froehner, *C. liberica* Hiern e *C. eugenioides* Moore são as mais citadas.

Os problemas inerentes à taxonomia e à especiação do gênero *Coffea*, ao lado do grande impulso verificado no desenvolvimento de pesquisas na área da genética e citogenética de certas plantas cultivadas (por exemplo, milho e tomate), principalmente, a partir daquelas baseadas na morfologia de cromossomos, foram a motivação para este trabalho.

O objetivo deste trabalho é apresentar alguns dados que possam dar subsídios sobre a especiação do gênero *Coffea* L., e a origem de *C. arabica*

L., através da análise morfológica de cromossomos nucleolares, na fase de paquíteno, de algumas espécies do gênero introduzidas no Brasil. A análise aqui empreendida, envolvendo apenas os cromossomos nucleolares dessas espécies de *Coffea*, constitui-se ainda em uma introdução a estudos posteriores, mais completos, que envolveriam os complementos integrais das referidas espécies, principalmente de *C. arabica*.

O principal aspecto considerado ao se restringir esta pesquisa aos cromossomos nucleolares é a dificuldade na localização de determinados cromossomos dentro das células; isto porque cromossomos como os de café, mesmo em paquíteno, mostram uma aparente semelhança no aspecto geral, além de ausência de quaisquer características marcantes que possam servir como referencial. Assim, o nucléolo, que nessa fase é bastante conspícuo e mostra-se em constante associação ao respectivo cromossomo nucleolar, serviu como ponto de referência na localização destes cromossomos dentro das células.

Os cromossomos na fase de paquíteno apresentam certas propriedades para se efetuar a análise morfológica, pois, estando os homólogos pareados é possível observar diversas características que são utilizadas para identificar cada cromossomo individualmente como: comprimento relativo dos cromossomos, relação de braços, posição do centrômero, tipo de distribuição da heterocromatina, espessura diferencial ao longo dos cromossomos, presença de possíveis aberrações, constrictões secundárias e zonas satélites.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Algumas considerações sobre o gênero *Coffea* L.

As publicações sobre café, de acordo com CARVALHO (1946), surgiram cerca de dois séculos antes de Linneu que, em 1753, descreveu a única espécie de café conhecida, *C. arabica*. A partir daí novas espécies foram sendo indicadas por vários botânicos como Lamarck em 1783, que descreveu a espécie *C. mauritiana*; Loureiro em 1790, descreveu *C. racemosa* e *C. zanguebariae*; Hiern, em 1876, *C. liberica*; Froenher que descreveu, em 1897, as espécies *C. canephora* e *C. congensis*; De Wildman e Durand, em 1899, *C. dewevrei* e Chevalier que em 1903 descreveu a espécie *C. excelsa*, hoje uma variedade de *C. dewevrei*. Novas descrições foram feitas em 1908 por Pierre, De Wildman e Chevalier, contando o gênero *Coffea* já nessa época cerca de 50 espécies. Por volta de 1930 já haviam sido citadas para o gênero *Coffea* cerca de 120 espécies válidas, número esse que em 1940, em seu primeiro trabalho sobre a classificação do gênero, Chevalier reduziu para 60 (CARVALHO, 1946).

Novos limites para o gênero *Coffea* foram estabelecidos por LEBRUN (1941), WILDMAN (1941) e CHEVALIER (1942 e 1947), sendo que, este último autor, estudando coleções de herbários e diversas plantas no local de origem, efetuou um dos trabalhos taxonômicos mais extensos e completos em *Coffea* L., e ainda o mais usado como referência. Este autor subdividiu o gênero *Coffea* em 4 seções: *Paracoffea* Mig., *Argocoffea* Pierre, *Mascarooffea* Chev. e *Eucoffea* K. Shum emend. que englobam de 60 a 70 espécies consideradas válidas.

A seção *Eucoffea* que inclui os cafés de origem africana, é considerada a mais importante por conter as espécies mais cultivadas como *C. arabica* e *C. canephora*. Essa seção foi dividida por Chevalier em 5 subseções (*Erythrocoffea*, *Pachycoffea*, *Melanocoffea*, *Nanocoffea* e *Mozambicoffea*) com número variável de espécies (CARVALHO *et alii*, 1969).

Segundo CHEVALIER (1947), todas as seções compreendem espécies que são nativas de regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia, e de acordo com THOMAS (1944) e SYLVAIN (1958), as espécies ocupam locais de condições ecológicas bastante diferentes, que abrangem desde locais rochosos de altitude e pouco úmidos até locais sombreados como as margens e interiores de florestas.

LEROY (1967a, 1967b, 1967c) tentou modificar, de certa maneira, a classificação proposta por CHEVALIER em 1947, com a criação do novo gênero *Paracoffea*. Baseando-se em diferentes posições das inflorescências e em algumas características florais, este autor dividiu os cafés em dois grupos, *Coffea* L. e *Paracoffea* Leroy.

CARVALHO & MÔNACO (1967), baseados em dados de hibridações interespecíficas, foram dos poucos pesquisadores a sugerir também, algumas alterações concretas na classificação proposta por CHEVALIER em 1947, além de LEROY (1967b, 1967c), com modificações na posição taxonômica de algumas espécies como *C. kapakata* Hirsch, *C. eugenioides* Moore e *C. stenopylla* G. Don.

Apesar dos vários trabalhos realizados com a intenção de fornecer dados para auxiliar a estabelecer de modo definitivo a posição das espécies dentro do gênero (CARVALHO & MÔNACO, 1967; LONGO, 1972; MEDINA, 1972; CHINNAPPA, 1981) as relações interespecíficas do mesmo permanecem ainda controversas, pois as afinidades verificadas a partir dos caracteres morfológicos e distribuição geográfica contradizem relações de afinidade provenientes de hibridações interespecíficas e análises citológicas de híbridos (CARVALHO & MÔNACO, 1967; MEDINA, 1972) o que leva a considerar a classificação atual um tanto artificial.

Sobre o número cromossômico das espécies de *Coffea* von Faber, em 1912, encontrou $n = 8$ para as espécies *C. arabica* e *C. liberica*; outros autores como Homeyer, em 1932, e Heyn, em 1937, estudando as mesmas espécies, encontraram respectivamente *C. arabica* com $n = 11$ e *C. liberica* com $n = 22$ cromossomos (MENDES, 1938a). Estes últimos dois autores, muito provavelmente, obser-

varam formas haplóides de *C. arabica* e algum tetraplóide natural de *C. liberica*. KRUG (1934), trabalhando com diversas variedades de *C. arabica* e com as espécies *C. canephora*, *C. excelsa* e *C. congensis*, verificou $n = 22$ cromossomos para todas as variedades de *C. arabica* e $n = 11$ para as demais espécies. Efetuando contagens cromossômicas em algumas espécies de café, MENDES (1938a) confirmou os dados obtidos por Homeyer em 1938 e KRUG em 1934, em relação ao número básico de cromossomos para o gênero $x = 11$.

As espécies de *Coffea* são autoimcompatíveis (MENDES, 1949; CONAGIN E MENDES, 1961; MEDINA & CONAGIN, 1959; MÔNACO, 1972) e diplóides, $n = 11$, exceto *C. arabica* que é autocompatível (KRUG & CARVALHO, 1951) e a única tetraplóide do gênero, com $n = 22$. Segundo FERWERDA (1976) as relações de compatibilidade nas espécies de *Coffea* seriam provavelmente através de um sistema oposto de alelos S. Em *C. arabica* a herança é dissômica, observando-se na meiose somente a formação de bivalentes, (KRUG & MENDES, 1943; MENDES, 1950⁽¹⁾, MENDES, 1958; MEDINA, 1950; CARVALHO *et alii*, 1969), com poucos casos de anormalidade no pareamento (GRASSIAS & KAMMACHER, 1975). A espécie *C. arabica* foi considerada por CARVALHO (1952) um alopoliplóide de origem antiga, devido a falta de semelhança entre os haplóides dessa espécie com os respectivos híbridos interespecíficos de formação recente. O comportamento de alguns híbridos interespecíficos com *C. arabica* e o modo de herança de alguns fatores duplicados indicam que essa espécie possui a estrutura de um alopoliplóide de segmento (CARVALHO *et alii*, 1969).

Apesar da maioria dos pesquisadores no assunto defenderem a origem alopoliplóide de *C. arabica*, KRUG e MENDES (1940) baseados em alguns aspectos observados na microsporogênese de híbridos triplóides entre *C. arabica* e *C. canephora*, aventaram também a possibilidade de sua origem por autopoliploidia. MENDES & BACCHI (1940) observaram, na microsporogênese de um di-haplóide de *C. arabica*, que em 71% das células em metáfase I havia de um a seis bivalentes, o

(1) MENDES, A.J.T.

que deu margem a dúvida na afirmação da origem se por autopoliploidia ou por alopoliploidia para *C. arabica*.

A origem da espécie *C. arabica* é bastante controversa, sendo um aspecto frequentemente abordado por muitos pesquisadores interessados na filogenia de *Coffea*.

THOMAS (1944) admite que *C. arabica* tenha, talvez, se originado de *C. eugenioides*, pois, esta espécie, segundo ele, se parece com *C. arabica*, porém em tamanho menor.

CRAMER (1957) sugere que *C. canephora* e *C. eugenioides* têm alguma relação com a origem de *C. arabica* devido à distribuição geográfica dessas espécies e à similaridade de morfologia de certas formas de *C. eugenioides* com algumas mutantes de *C. arabica*. Este autor sugere ainda, que *C. arabica* poderia ter se originado através da hibridação natural de *C. eugenioides* e *C. congensis*.

Narasimhaswamy & Vishveshwara (1961 apud CARVALHO & MÔNACO, 1967) consideram *C. liberica* e *C. eugenioides* como os ancestrais de *C. arabica* pelo exame de um ramo tetraplóide de um híbrido entre ambas espécies que se apresentou fenotipicamente similar à *C. arabica*.

Do cruzamento entre *C. dewevrei* e *C. eugenioides*, FERNIE (1966) também obteve uma planta que possuía grande semelhança com *C. arabica*.

CARVALHO & MÔNACO (1967), analisando híbridos de diversas espécies, chegaram à conclusão que as espécies de *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. congensis* poderiam provavelmente ter participado na origem de *C. arabica*.

LONGO (1972), efetuando análises bioquímicas que envolviam compostos flavonóides em algumas espécies de *Coffea* com objetivos filogenéticos, verificou que *C. liberica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* eram as mais próximas à *C. arabica* nesse aspecto. Frente a esses resultados e aos dados anteriormente

obtidos por outros autores nas áreas de citologia, de genética e de hibridações interespecíficas, a autora sugeriu que tais espécies teriam participado na origem de *C. arabica*.

GRASSIAS & KAMMACHER (1975), observando algumas irregularidades na conjugação cromossômica em três diferentes variedades de *C. arabica* como presença de alguns cromossomos não pareados, presença de bivalentes em associação secundária e formação de multivalentes, questionaram o tipo da poliploidia desta espécie. Avaliando seus dados frente a outros existentes, esses autores também chegaram à conclusão que a estrutura mais provável de *C. arabica* é a de um alotetraplóide de segmento, formado pela junção de dois genomas, onde alguns cromossomos conservam grande similaridade.

CHARRIER (1978) estudou várias espécies originais da seção *Mascarocoffea* (plantas essas que têm interesse por apresentarem frutos sem cafeína) e as relações de afinidade destas com as espécies da seção *Eucoffea*, através de cruzamentos entre algumas espécies de ambos os grupos. Foi verificado que alguns híbridos entre *C. arabica* e espécies diplóides da seção *Mascarocoffea* obtiveram sucesso comparável aos híbridos anteriormente obtidos entre *C. arabica* e algumas espécies diplóides da seção *Eucoffea* e maior sucesso que alguns híbridos formados entre espécies diplóides de ambas as seções. A partir dessas observações o autor salientou que, na alopoliploidia de *C. arabica*, um dos genomas dessa espécie poderia estar presente tanto numa das espécies da seção *Eucoffea* como numa das de *Mascarocoffea*. Desse modo a síntese de *C. arabica* requereria além da presença de um segundo genoma mais diferenciado, que poderia ser encontrado em gêneros ou subgêneros próximos, também um sistema genético de regulação de pareamento que favorecesse o comportamento dissômico da espécie *C. arabica*.

BERTHOU *et alii* (1980), através de análises na variação de DNA mitocondrial caracterizado em eletroforese nas espécies *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. arabica*, verificaram que as duas últimas espécies apresentam o mesmo

genoma mitocondrial, o qual diferenciava-se daquele obtido para *C. canephora*. Esses dados, segundo os autores, corroboram a hipótese que uma espécie diplóide próxima a *C. eugenoides* poderia ter dado origem a *C. arabica*; entretanto, o fato do DNA mitocondrial ser um marcador não nuclear, levou-os a sugerir que *C. arabica* e *C. eugenoides* poderiam ser, portanto, descendentes de um ancestral comum semelhante a *C. eugenoides*.

HÖFFLING & OLIVEIRA (1981), analisando as afinidades serológicas entre algumas espécies de *Coffea*, verificaram que *C. arabica* apresenta, neste aspecto bioquímico, maior afinidade por *C. congensis* e *C. eugenoides* e em menor grau por *C. canephora*. Esses autores sugerem, através desses dados, a possibilidade das duas primeiras espécies terem participado da formação de *C. arabica*.

As espécies do gênero *Coffea* apresentam um comportamento meiótico normal, com formação constante de bivalentes; o número de quiasmas quase igual, encontrado nas espécies estudadas da seção *Eucoffea*, indicam alguma proximidade genética entre as mesmas (MENDES, 1950⁽¹⁾; MENDES, 1950⁽²⁾; MEDINA, 1950 e 1952; CONAGIN, 1961; MEDINA & RIJO, 1969; e MEDINA *et alii*, 1977). Essa proximidade é confirmada também nas análises citológicas de híbridos interespecíficos onde foi verificada uma alta frequência na formação de bivalentes (MEDINA, 1972).

CARVALHO & MÔNACO (1967) verificaram, através de hibridações artificiais que, de um modo geral, algumas espécies da mesma subseção se cruzam mais facilmente. Também híbridos vigorosos de espécies de diferentes subseções são ainda obtidos com certa frequência. Híbridos férteis entre espécies alopátricas, assim como de espécies simpátricas foram obtidos, indicando a existência de um mecanismo especial de isolamento reprodutivo que evita a extinção dessas espécies como unidades.

(1) MENDES, A.J.T.

(2) MENDES, C.H.T.

O único estudo mais completo sobre a morfologia dos cromossomos de *Coffea* foi feito por BOUHARMONT (1959) que, estudando os cromossomos somáticos de cerca de 10 espécies do gênero, incluindo aqueles da espécie tetraplóide *C. arabica*, verificou que entre os vários cariótipos analisados há uma grande uniformidade de tamanho e forma nos cromossomos das espécies. Devido a essa semelhança foi possível a construção de um cariótipo médio padrão, denominado pelo autor de ideograma do gênero *Coffea*, do qual foi possível identificar realmente apenas quatro cromossomos dos 11 constituintes do complemento do gênero. BOUHARMONT (1963) estudou a morfologia dos cromossomos somáticos de mais seis espécies do gênero *Coffea*, cujos ideogramas foram comparados com aqueles das 10 espécies anteriormente analisadas. Dessa comparação o autor concluiu mais uma vez que realmente não havia diferenças entre os vários ideogramas observados no gênero. KRUG (1934), contando os cromossomos de quatro espécies e cinco variedades de *Coffea*, observou que *C. excelsa* Chev. (atual *C. dewevrei* Wild et Dur.) apresentava cromossomos ligeiramente maiores. MENDES (1938b), de posse desta informação, efetuou um trabalho sobre a morfologia dos cromossomos somáticos dessa espécie, onde verificou que os mesmos, embora pouco maiores que os das demais espécies, eram ainda muito pequenos (1,5 a 3,5 μ). Este autor conseguiu separá-los em três classes (A, B e C), de acordo com o tamanho, porém apenas os três maiores, constituintes da classe A, puderam ser distinguidos na sua morfologia; os oito restantes dificilmente se diferenciavam uns dos outros.

Num trabalho realizado por CRUZ (1972) em aneuplóides da cultivar Mundo Novo de *C. arabica*, ficou demonstrado a necessidade de identificar os cromossomos em falta ou excesso nessas plantas de café, para uma possível associação com a morfologia das mesmas. A falta de identificação desses cromossomos restringe, de certa forma, o prosseguimento da pesquisa e a utilização de aneuplóides no melhoramento como no caso da associação de genes aos cromossomos e a transferência de alguns caracteres desejáveis de uma espécie ou variedade para outra, por meio da substituição de cromossomos através de plantas monossômicas ou nulissômicas.

Após várias pesquisas com algumas espécies de *Coffea*, MEDINA *et alii* (1977) chegaram à conclusão que o estudo de cariótipos de cromossomos somáticos da maneira convencional, o estudo de quiasmas nas espécies individuais e do comportamento meiótico em híbridos interespecíficos, não constituem critérios tão valiosos para estabelecer relações entre as espécies do gênero *Coffea* L. Os mesmos sugerem que, talvez, a análise de cromossomos em paquíteno ou mesmo, a comparação de cromossomos somáticos através de técnicas de bandamento, possam fornecer bases para uma melhor caracterização das espécies e das relações entre as mesmas.

Em vista dessas informações é importante a identificação dos cromossomos das várias espécies do gênero *Coffea* L., de uma maneira mais detalhada, e que permita uma análise mais cuidadosa das características cromossômicas individuais. A identificação desses cromossomos é interessante não só para estudos genéticos como por exemplo a localização de genes, como também para estudos filogenéticos, podendo neste aspecto constituir-se num dado comparativo, adicional aos demais existentes.

2.2. Análise em paquíteno e cromossomos nucleolares

A identificação de cromossomos é feita habitualmente a partir da morfologia de cromossomos somáticos em metáfase. Em organismos onde os cromossomos são extremamente pequenos e cujo cariótipo é do tipo simétrico (Levitzky, 1931 *apud* STEBBINS, 1971), a identificação dos cromossomos na fase de metáfase, por técnicas comuns de coloração, torna-se bastante difícil.

A elaboração de novas técnicas nesse campo por CASPERSON *et alii* (1969) possibilitou teoricamente a identificação de cromossomos metafásicos em mitose, mesmo quando pequenos. A identificação de cromossomos segundo tais técnicas é feita através do reconhecimento de faixas heterocromáticas e eu-

cromáticas, que formam padrões específicos e constantes para cada um deles, as denominadas bandas. HSU (1973), num trabalho de revisão, relata a seqüência, a partir de CASPERSON *et alii* (1969), do surgimento das mais variadas e aprimoradas técnicas citológicas aplicadas para diferenciar longitudinalmente os cromossomos e usadas com a finalidade de reconhecer individualmente cada cromossomo dentro de determinado complemento.

Um tipo de análise utilizado na identificação de cromossomos, que emprega a técnica de esmagamento e menos sofisticada que as usadas para bandamento, é feito na fase de prófase da meiose, mais precisamente, na fase de paquíteno. As análises de morfologia cromossômica, nesse estágio da meiose, têm interesse exatamente em plantas onde os cromossomos mitóticos em metáfase são pequenos, porque em paquíteno os cromossomos ainda não atingiram seu grau máximo de condensação e, portanto, apresentam-se bem mais longos do que os mesmos em mitose. Além disso, nessa fase quando o pareamento se completa (SWANSON, 1957; RHOADES, 1961 e MOENS, 1964), é possível, segundo BURNHAN (1962), obterem-se informações tais como: comprimento total dos cromossomos, relação de braços, posição do centrômero, tipo de distribuição da heterocromatina (padrão de cromômeros), espessura diferencial da cromatina ao longo dos cromossomos, constricções secundárias, zonas satélites e "knobs" (grandes cromômeros sub-terminais ou terminais bastante evidentes usados como marcadores ou como ponto de referência na identificação de cromossomos).

A análise em paquíteno fornece ainda elementos para se conhecer o grau de homologia cromossômica, a presença de aberrações e possíveis desvios dos modelos cromoméricos em híbridos (hibridações estruturais), possibilitando uma abordagem na origem e na classificação de espécies (OURENCHY, 1963).

A partir do clássico e pioneiro trabalho de morfologia de cromossomos em paquíteno, realizado em milho por McCLINTOCK (1929), uma sucessão de trabalhos, utilizando esse mesmo tipo de análise cromossômica com a finalidade de obter dados mais acurados sobre a morfologia de cromossomos, foram realiza-

dos em vários gêneros como: *Lycopersicon* (BARTON, 1950); *Solanum* (GOTTSCHALK, 1951, 1954; YEH & PELOQUIN, 1965b); *Secale* (LIMA DE FARIA, 1952); *Plantago* (HYDE, 1953); *Hordeum* (SARVELLA *et alii*, 1958); *Mesithea* (ROY & SINGH, 1958); *Saintpaulia* (ERLICH, 1958), *Cynodon* (OURENCHY, 1963), *Rubus* (BAMMI, 1965), *Dichanthium* (ROY *et alii*, 1965), *Hibiscus* (MENZEL, 1966), *Oryza* (SEN, 1963; CHU, 1967); *Phaseolus* (DE & KRISHNAN, 1966a; KRISHNAN & DE, 1965; 1970); *Medicago* (BUSH & CLEVELAND, 1968; GILLIES, 1968, 1970a, 1970b, 1971, 1972a, 1972b, 1972c); *Ipomoea* (KRISHNAN *et alii*, 1969; MAGOON *et alii*, 1972), *Linum* (LOBANA *et alii*, 1972), *Prunus* (WHELAN, 1969; JELENKOVIC & HARRINGTON, 1972), *Pennisetum* (LOBANA & GRILL, 1973), *Ricinus* (JELENKOVIC & HARRINGTON, 1973 e PARIS *et alii*, 1978; PARIS, 1981), *Beta* (YU, 1977), *Crotalaria* (GUPTA & GUPTA, 1978); *Physalis* (VENKASTERWARALU & RAO, 1977; 1979a; 1979b).

Desses trabalhos informações as mais diversas foram obtidas, dentre as quais algumas delas a partir dos cromossomos nucleolares. Assim, através de observações e experimentações ainda em cromossomos de milho na fase de paquíteno, McCLINTOCK (1934) conseguiu, praticamente, determinar grande parte das informações básicas acerca das relações entre cromossomos nucleolares e nucléolos e destes com o complemento cromossômico.

Em tomate (*Lycopersicon*), $2n = 24$, LESLEY & LESLEY (1935) e LESLEY (1938) foram dos primeiros pesquisadores a utilizarem a presença destacada dos cromossomos nucleolares, associada à morfologia em paquíteno, e verificar que raças silvestres de tomate apresentavam cromossomo nucleolar somente com pequenos satélites e que algumas raças cultivadas exibiam heteromorfia nesses cromossomos, heteromorfia essa restrita ao tamanho do satélite. Segundo esses autores, foi observada uma correlação entre o tamanho do satélite e o tamanho do nucléolo, porém não foi observada qualquer relação entre heteromorfia do satélite e os caracteres fenotípicos externos das plantas. Ainda em tomate, BROWN (1949) tentou estabelecer a morfologia, em paquíteno, do complemento, entretanto a identificação desse complemento limitou-se somente ao bivalente nucleolar;

mais tarde BARTON (1950), com o mesmo objetivo, foi quem identificou todos os 12 bivalentes desse complemento. Com o conhecimento adquirido sobre estes cromossomos, após a identificação dos mesmos na fase de paquíteno, foi possível não só a elaboração de uma chave para classificação dos cromossomos de tomate por KHUSH (1963), como também logo após KHUSH & RICK (1966, 1967a, 1967b) localizarem vários genes em determinados cromossomos e até em determinados braços dos mesmos.

MAGOON & SHAMBULINGAPPA (1961) efetuaram estudos cariomorfológicos em *Sorghum propinquum* ($2n = 20$) pelo fato desta espécie apresentar, com relação às outras espécies de *Halepensis* ($2n = 40$) na qual está incluída, uma concordância quanto aos caracteres morfológicos e uma discordância quanto ao número de cromossomos. Com relação à outra subseção *Arundinacea* ($2n = 20$), a mesma espécie apresenta discordância morfológica frente a uma concordância no número e morfologia cromossômicas. Através da morfologia em paquíteno desses cromossomos foi constatado que citologicamente também havia uma diferença importante quanto a última subseção com relação a morfologia do cromossomo nucleolar. Em todas as espécies de *Arundinacea* o cromossomo nucleolar era o menor do complemento e em *S. propinquum* era o maior do complemento. Através dessa diferença e de outros dados disponíveis, foi possível avaliar o papel de *S. propinquum* na origem das espécies com $2n = 40$ cromossomos do gênero *Sorghum*.

YEH & PELOQUIN (1965a), analisando a morfologia em paquíteno de plantas haplóides de *Solanum tuberosum* ($2n = 24$) para empregá-la em estudos comparativos, constataram uma variação na morfologia do cromossomo nucleolar (cromossomo II do complemento), também restrito ao comprimento do satélite. Foram encontrados quatro tipos distintos de comprimento de satélite, sendo que essa variação ocorria intra e interespecificamente. Os autores sugeriram que o heteromorfismo do cromossomo nucleolar poderia ser usado como marcador citológico. Isso porque foi constatado a falta de ocorrência de quiasma no braço curto desse cromossomo II, local onde se localiza o satélite; devido à facilidade de re-

conhecimento, esse cromossomo também poderia auxiliar a detecção de pareamento preferencial em espécies tetraplóides.

KRISHNAN & DE (1965) e DE & KRISHNAN (1966a, 1966b), num estudo cariomorfológico comparativo feito nos estádios de paquíteno da meiose e da metáfase somática em *Phaseolus aureus* e *P. mungo*, notaram um fenômeno interessante no comprimento cromossômico, mais precisamente através dos cromossomos nucleolares, nesses dois tipos de divisão celular. Nestas duas espécies, consideradas próximas, os dois cromossomos nucleolares de cada uma delas ocupavam diferentes posições no cariótipo nos dois tipos de divisão, devido a diferentes valores para o comprimento relativo e proporção de braços. Entretanto, a análise do híbrido entre essas espécies revelou que um dos bivalentes nucleolares desse híbrido era formado por dois cromossomos homólogos, sendo um de cada uma das espécies, mas que exibiam comprimento intermediário entre o comprimento dos cromossomos parentais isolados. Esse dado mostrou que as diferenças observadas no comprimento médio e na proporção de braços não deveriam constituir-se em pontos relevantes na diferenciação dessas espécies.

KRISHNAN & DE (1965, 1968, 1970), DE & KRISHNAN (1966a, 1966b) realizaram uma série de análises em paquíteno no gênero *Phaseolus* ($x = 11$), onde os cromossomos somáticos também são pequenos, envolvendo duas espécies e uma tetraplóide, além de um híbrido entre as duas diplóides. Constataram a presença de alguns cromossomos em comum às três espécies o que, juntamente com os dados sobre a sinapse e o tipo de pareamento entre os bivalentes associado ainda à informação dos caracteres morfológicos, permitiu o esclarecimento sobre a origem da espécie tetraplóide, no caso um aloploiplóide. Do mesmo trabalho ficou ainda comprovada a ocorrência de supressão da função organizadora do nucléolo de um dos cromossomos nucleolares desse aloploiplóide,

MAGOON *et alii* (1969), analisando a morfologia dos cromossomos em paquíteno de uma cultivar de *Manihot esculenta* ($2n = 36$), verificou a presença de três cromossomos nucleolares em funcionamento o que levou os autores

a suporem que os tipos considerados diplóides seriam na verdade poliplóides, em vista do número máximo de cromossomos nucleolares serem dois em espécies diplóides. A constatação também de tipos cromossômicos repetitivos dentro do complemento confirmou essa suposição, tendo os autores então postulado, a partir das observações, que os atuais tipos de mandioca cultivada seriam na verdade alopoliplóides, devido a regularidade e o comportamento diplóide da meiose. Concluíram ainda que seria um alopoliplóide de segmento devido à semelhança morfológica entre os cromossomos, embora já diferenciados geneticamente. Portanto, as formas parentais seriam diplóides com $x = 9$, com dois cromossomos nucleolares cada uma. A observação de apenas três cromossomos nucleolares ao invés de quatro seria atribuída à supressão do organizador nucleolar desse quarto cromossomo, que foi apontado pelos autores como sendo provavelmente o cromossomo XII pela semelhança morfológica com os outros três observados.

KAMALA (1976) verificou que, embora não houvesse correspondência entre o número de nucléolos e ploidia e nem entre número de nucléolos e cromossomos nucleolares em quatro espécies do gênero *Bassica*, havia entretanto uma correspondência nítida entre o número de cromossomos nucleolares e nível de ploidia. O conhecimento detalhado da morfologia em paquíteno dos cromossomos nucleolares dessas espécies, aliado à constatação de tal correspondência, permitiu o esclarecimento de certas relações filogenéticas entre essas quatro espécies, da natureza alopoliplóide de duas delas e o modo de origem de alguns cromossomos nucleolares por meio de translocações recíprocas.

WU (1978) identificou todos os cromossomos de *Sorghum nitidum* na fase de paquíteno, incluindo um cromossomo acessório constituinte do complemento dessa espécie. Baseado na similaridade morfológica entre esse cromossomo e o cromossomo nucleolar, e de posse de algumas informações sobre cromossomos acessórios, o autor conseguiu sugerir um provável meio de origem desse cromossomo acessório.

PARIS *et alii* (1980) e PARIS (1981), comparando a morfologia dos cromossomos em paquíteno de dez raças de *Ricinus comunis* ($2n = 20$), gênero mono-

específico, verificaram que dentre os dez bivalentes, apenas dois cromossomos responsáveis pela organização do nucléolo, os cromossomos II e VII do complemento, exibiam variações estruturais na heterocromatina do braço menor e na posição da constrição nucleolar de um desses cromossomos entre as várias raças. Foi constatado entretanto, que tais variações não eram indicativas das afinidades taxonômicas a esse nível.

Frente a similaridade dos cromossomos somáticos das várias espécies do gênero *Coffea* bem como o pequeno tamanho desses cromossomos, como foi verificado por BOUHARMONT (1959, 1963) e MENDES (1938b), torna-se quase certo que a identificação desses cromossomos, através da fase paquíteno e ou utilizando técnicas de bandamento no seu reconhecimento, traria, a exemplo dos fatos anteriormente citados, alguns conhecimentos novos sobre a citogenética das espécies de *Coffea*.

2.3. Nucléolos e cromossomos nucleolares

2.3.1. Nucléolos, ploidia e filogenia

As pesquisas realizadas e os dados atualmente disponíveis que versam sobre a organização estrutural, funcional e bioquímica do nucléolo e das relações desta organela com os cromossomos nucleolares são extremamente extensos. Consequentemente será citado aqui apenas alguns aspectos do assunto que de certo modo estariam mais relacionados com o trabalho desenvolvido.

As relações entre cromossomos nucleolares e nucléolos, em termos gerais funcionais, baseiam-se no fato de que estes cromossomos são particulares, dentro de um determinado complemento, por possuírem regiões específicas, geralmente coincidentes com as constrições secundárias desses cromossomos, onde ocorrem além da formação do nucléolo, a localização dos genes que codificam o ácido

ribonucléico ribossômico (rRNA) o qual, por sua vez, tem importante papel na síntese de proteínas (BUSH & SMETANA, 1970; SYBENGA, 1972; JORDAN & LUCK, 1976).

As primeiras observações sobre o nucléolo datam de 19781, porém o fato do nucléolo estar relacionado a determinados cromossomos do complemento só começou a ser conscientizado após 1912, quando Navashin observou, pela primeira vez, em *Galtonia*, os denominados satélites cromossômicos associados ao nucléolo (GATES, 1942). O primeiro pesquisador no entanto, a observar mais concretamente a relação entre nucléolos e cromossomos foi Latter, em 1926, em células mãe de *Lathyrus* (GATES, 1937).

HEITZ (1931), observando a fase de telófase em plantas de diversos gêneros, verificou que o nucléolo era formado nessa fase de mitose, em cromossomos portadores de satélite e ainda, na região do filamento dos satélites ou constrições secundárias, consideradas pelo autor como sinônimos funcionais. Este autor considerou que o número de nucléolos formados no núcleo em telófase dependia do número de cromossomos portadores de satélites presentes no complemento.

McCLINTOCK (1934), através de experimento envolvendo o cromossomo nucleolar de *Zea mays*, demonstrou também a existência dessa relação entre nucléolos e cromossomo nucleolar, além de confirmar a formação do nucléolo na fase de telófase a partir de um corpo heterocromático localizado próximo à constrição secundária e não na própria constrição como afirmou HEITZ (1931). A autora verificou, entre outras observações, que cada complemento monoplóide possuía pelo menos um cromossomo particular responsável pela formação do nucléolo.

A maioria das espécies, segundo SYBENGA (1972), apresentam um nucléolo ou cromossomo nucleolar por genoma havendo, no entanto, algumas delas que mostram mais de um complemento considerado monoplóide como, por exemplo, *Plantago* (HYDE, 1953), *Ricinus* (PARIS *et alii*, 1978) e *Sorghum* (GARBER, 1947) entre outros gêneros.

GATES (1942), através de um trabalho de revisão, tentou demonstrar que o nível de ploidia das espécies e mesmo alguns aspectos sobre relações filogenéticas, poderiam ser esclarecidos em diversos gêneros, através de estudos comparativos envolvendo somente o número de nucléolos presentes nos complementos. Através dessa revisão o autor defendeu a hipótese de que cada espécie possuiria um número determinado de nucléolos e que, em gêneros poliplóides, as espécies mostrariam um aumento no número deles ou de regiões organizadoras que corresponderia ao aumento do número de complementos cromossômicos monoplóides presentes.

Vários autores têm verificado que tal hipótese nem sempre é verdadeira, como DE WET (1953) que, analisando tal relação em espécies poliplóides de *Danthonia*, verificou que o número de nucléolos não correspondia ao grau de poliploidia. O autor observou não mais que quatro nucléolos mesmo em espécies 8-plóides e 12-plóides e atribuiu tal falta de correspondência a uma tendência de poliplóides retornarem ao estado diplóide.

CROSBY (1957), através da análise de micronúcleos em meiose, verificou que dos 21 cromossomos do complemento de *Triticum* hexaplóide havia apenas quatro cromossomos do complemento com função organizadora do nucléolo e que, em células a nível hexaplóide, nem todos eram aptos a essa função.

Desde então, através de vários outros trabalhos, tem sido constatado que o número de nucléolos por si só nem sempre é um indicativo seguro do nível de ploidia. Também, segundo BUSH & SMETANA (1970) e SYBENGA (1972) o número de nucléolos isoladamente não deveria ser considerado como dado específico, haja visto as variações observadas intra e interespecificamente em plantas e animais de um modo geral. Segundo esses autores o número de nucléolos poder ser alterado quando ocorrem modificações no *locus* responsável por sua organização, o que pode levar à formação de nucléolos supranumerários espalhados por diversos *loci* e em vários cromossomos do complemento.

McCLINTOCK (1934) observou a multiplicidade das regiões organizadoras do nucléolo em condições especiais, como na ausência de cromossomo nucleolar em grãos de pólen de milho, onde, então, eram formados vários nucléolos pequenos espalhados junto aos vários cromossomos.

JAIN (1957) induziu, através de tratamento com altas temperaturas em plantas de *Lolium*, irregularidades na condensação de cromossomos meióticos relacionadas com a formação de nucléolos supranuméricos. Foram observados vários nucléolos ligados a um só cromossomo e vice-versa, e ainda outros totalmente isolados. Tal anormalidade foi atribuída à inativação do locus do organizador nucleolar, devido a altas temperaturas.

MARKS (1957) constatou que em *Oxalis dispar* ($2n = 12$), espécie com grande número de cromossomos telocêntricos, devido a seleção e a alta taxa de quebras cromossômicas, o número máximo de nucléolos era igual a dez e quando em menor número esses apresentavam-se em tamanhos variados. Segundo o autor, os cromossomos nessa espécie não apresentavam organizadores nucleolares específicos.

MISRA & SHASTRY (1967) atribuíram a presença de nucléolos supranumerários, observados apenas em espécies mais evoluídas de *Oryza*, ao alto grau de mudanças estruturais cromossômicas a que, presumivelmente, foram submetidas essas espécies.

MORGAN (1971), utilizando o nucléolo como marcador citológico para a região organizadora do nucléolo do cromossomo VI de *Zea*, verificou a existência de uma diferença na localização dos cromossomos homólogos em células pré-meióticas e células pré-mitóticas. A observação de dois nucléolos na maioria das células em interfase somática foi atribuída a uma distância maior dos organizadores nucleolares e não à falta da fusão nucleolar; a observação de um único nucléolo em todas as células pré-meióticas confirmou a proximidade desses or-

organizadores devido a uma convergência dos homólogos na pré-meiose e talvez a ocorrência de fusão devido também à proximidade desses organizadores.

JOTTERAND & FISCHBERG (1974) constataram que, em *Xenopus borealis* (sapo), a ocorrência de uma translocação recíproca acarretou a presença de um organizador nucleolar e respectivo nucléolo adicionais ao número normal.

LEVIN (1973) constatou, em híbridos interpopulacionais no gênero *Phlox*, uma relação entre o nível de hibridação nessas populações e o número e incidência de nucléolos supranuméricos. Segundo o autor, tais nucléolos seriam a manifestação da multiplicidade dos organizadores nucleolares, os quais ficariam normalmente latentes, porém ativados em condições perturbatórias, como por exemplo, uma taxa elevada de hibridação. Segundo ele, isto não seria um resultado direto da hibridação, mas a atuação da mesma na fragmentação e dispersão a longo prazo, de uma determinada região organizadora.

VERMA & RAINA (1981) atribuíram a presença de nucléolos supranumerários ou acessórios em *Crotolaria agatiflora*, entre outros fatos, ao resultado da alta taxa de cruzamento entre cinco subespécies desse gênero. Segundo tais autores, uma mudança no sistema regulatório da célula, causado pela hibridação, implicaria na ativação de organizadores nucleolares latentes. No entanto, não consideraram que a presença desses múltiplos organizadores fosse devida a hibridação.

A ocorrência de supressão da função organizadora do nucléolo, observada pela primeira vez por NAVASHIN (1933) em híbridos interespecíficos do gênero *Crepis*, também pode ter como conseqüência, erros na interpretação do número de nucléolos ou de cromossomos nucleolares. A ocorrência de supressão tem sido observada em espécies portadoras de genomas híbridos e geralmente implica em relações de dominância, bem como no desaparecimento de *loci* organizadores de um dos genomas e, conseqüentemente, a não formação de nucléolos, como foi observado em híbridos de *Drosophila* (BICUDO, 1982), *Hordeum* (KASHA & SADASIVAIAH,

1971), *Phaseolus* (KRISHNAN & DE, 1968), *Ribes* (KEEP, 1962, 1971), *Salix* (WILKINSON, 1944), *Solanum* (YEH & PELOQUIN, 1965a), *Triticum x Aegilops* (FLAVELL & O'DELL, 1979) e *Xenopus* (HONJO & REEDER, 1973).

2.3.2. Cromossomos nucleolares

O número de nucléolos e o número de cromossomos associados ao nucléolo usados isoladamente não têm sido considerados dados valiosos em estudos comparativos, visando a avaliação de relações filogenéticas entre certos taxons. Entretanto, sendo os cromossomos nucleolares bastante conspicuos dentro de uma célula por terem como referência o próprio nucléolo ou por geralmente possuírem satélites, eles têm sido insistentemente utilizados como parâmetros na avaliação de variações e diferenciações cariotípicas entre linhagens, variedades, espécies ou grupos taxonômicos maiores e têm sido úteis principalmente como marcadores citológicos.

MISRA & SHASTRY (1967), em um estudo cariomorfológico em diferentes variedades de *Oryza sativa*, constataram grande variação na morfologia dos cromossomos nucleolares e na capacidade dos mesmos em organizar o nucléolo. Em variedades bem próximas, os cromossomos nucleolares ocupavam diferentes posições nos ideogramas, alguns sem satélite ou com estes diferindo em tamanho.

Segundo BOUGOURD & PARKER (1976), em várias espécies e populações naturais de *Allium*, têm sido observadas variações no número de cromossomos nucleolares e certo polimorfismo das regiões organizadoras do nucléolo.

SATO *et alii* (1980), através da técnica de bandamento-C em cromossomos somáticos de *Nothoscordum fragrans* ($2n = 18 + 1$), verificaram a presença de seis cromossomos acrocêntricos, com regiões organizadoras do nucléolo em seus braços curtos, sendo que tais regiões também possuíam morfologia distinta.

KOUL & WAFI (1980) registraram a ocorrência de polimorfismo cromossômico a nível interespecífico, varietal e mesmo clonal em duas espécies de gênero *Fritillaria*, polimorfismo esse restrito principalmente à posição do centrômero e ao tamanho e número das regiões organizadoras do nucléolo. O número de regiões organizadoras do nucléolo nessas espécies correspondia diretamente ao número de nucléolos os quais, por sua vez, variavam em tamanho em vários núcleos. Os autores consideraram a variabilidade destes cromossomos como a fonte principal de evolução desse gênero.

Embora em muitos trabalhos as diferenças morfológicas do cromossomo nucleolar tenham sido apenas constatações, em outros trabalhos de caráter comparativo, essas diferenças têm se mostrado de grande utilidade na distinção de espécies.

Segundo HO & KASHA (1972), a única diferença visível entre os cariótipos de *Medicago sativa* e *M. falcata*, espécies semelhantes morfológicamente e que apresentam complementos homeólogos devido ao pareamento observado no híbrido entre elas, foi observada no cromossomo nucleolar; *M. sativa* possui cromossomos nucleolares com satélites e *M. falcata*, assim como o híbrido entre elas, apresentam esses cromossomos sem esse apêndice.

WAINES & KIMBER (1973) utilizaram-se da análise e posterior comparação do número e do tamanho dos satélites dos cromossomos nucleolares, em algumas espécies dos gêneros *Triticum* e *Aegilops*, com o objetivo de avaliar a ocorrência de variações cariotípicas intra e interespecificamente. Através dessa análise os autores consideraram questionáveis alguns esquemas filogenéticos e evolucionários estabelecidos para esses dois gêneros.

ARORA (1978), também num estudo cariomorfológico de caráter comparativo envolvendo várias espécies do gênero *Verbena*, verificou que os cariótipos se diferenciavam mais marcadamente pelo número de cromossomos com organizadores nucleolares e pelas posições dos centrômeros, sendo que essa diferencia-

ção citológica correlacionava-se também com a diferenciação morfológica das espécies. A presença de seis cromossomos nucleolares no complemento de uma espécie poliplóide com dois tipos de satélites (um localizado em braço curto e outro tipo em braço longo), forneceu indicações sobre a origem dessa espécie a partir de duas espécies distintas.

BOUHARMONT (1959) dedicou, em seu trabalho sobre a morfologia dos cromossomos de algumas espécies do gênero *Coffea*, um ítem aos cromossomos nucleolares por ele denominados de cromossomos satelíferos. O autor já havia observado nessa data a existência de diferenças interespecíficas marcantes na morfologia desses cromossomos nas espécies por ele estudadas. Tais diferenças foram observadas em cromossomos somáticos, em metáfase, e relacionavam-se tanto à presença e à forma dos satélites, quanto ao comprimento da constrição secundária, e até mesmo ao tamanho dos cromossomos portando satélites. Quanto à relação número de cromossomos nucleolares e ploidia, BOUHARMONT (1959) verificou a presença de um ou dois desses cromossomas em espécies diplóides não especificadas, e um máximo de quatro na espécie tetraplóide, *C. arabica*.

Enquanto MEDINA (1950) observou na microsporogênese de *C. arabica* dois a três bivalentes nucleolares, MENDES (1950)⁽¹⁾ verificou de um a quatro; em ambos os casos havia a presença de um único nucléolo.

Para as espécies diplóides outros autores, além de BOUHARMONT (1959), observaram também certa variação. Assim na microsporogênese de *C. canephora*, MENDES (1950)⁽²⁾ constatou a presença de um bivalente nucleolar ligado a um nucléolo. Da mesma maneira MEDINA (1952) confirmou esses resultados para *C. dewevrei*.

(1) MENDES, A.J.T.

(2) MENDES, C.H.T.

MEDINA & RIJO (1969) observaram uma variação de um a quatro bivalentes nucleolares para *C. stenophylla* e *C. salvatrix*, entretanto na primeira espécie predominaram células com apenas um desses bivalentes e na segunda dois. Nessas duas espécies foram vistos ainda diversos nucléolos, estando cada um deles associado a um ou mais bivalentes.

Na microsporogênese de *C. eugenioides* e *C. racemosa*, MEDINA *et alii* (1977) notaram o predomínio de células com dois bivalentes ligados a um nucléolo e em *C. kapakata* apenas um desses cromossomos.

Como deve ser notado, a diversidade de informações que puderam ser obtidas através de análises citogenéticas envolvendo as regiões organizadoras de nucléolo e os próprios cromossomos responsáveis pela formação desta organela justifica, em parte, um estudo sobre a morfologia em paquíteno dos cromossomos nucleolares do gênero *Coffea*.

3. MATERIAL

Botões florais foram coletados de dez espécies pertencentes ao gênero *Coffea* L. e que compõem parte da coleção de plantas de café introduzidas na Seção de Genética no Centro Experimental do Instituto Agrônomo, Campinas. Dessas dez espécies utilizadas nove são diplóides com $2n = 22$, e uma tetraplóide, *C. arabica* L. com $2n = 44$, que representa a única espécie poliplóide do gênero.

As espécies analisadas neste trabalho, de acordo com a classificação de CHEVALIER (1947), pertencem às quatro subseções da seção *Eucoffea* como segue:

1. subseção *Erythrocoffea*: *C. congensis* Froehner, *C. Canephora* Pierre ex Froehner, e *C. arabica* L.;
2. subseção *Pachycoffea*: *C. liberica* Hiern e *C. dewevrei* De Wild et Dur.;
3. subseção *Mozambicoffea*: *C. racemosa* Lour., *C. salvatrix* Swynn et Phil;
4. subseção *Melanocoffea*: *C. stenophylla* G. Don, *C. eugenioides* Moore.

A classificação específica aqui adotada também segue esta classificação, porém com algumas modificações propostas por CARVALHO & MÔNACO (1967) para as espécies *C. eugenioides* e *C. kapakata*. Segundo CHEVALIER (1947), a espécie *C. eugenioides* pertence à subseção *Mozambicoffea* e a espécie *C. kapakata*, ao gênero *Psilanthopsis* gênero monoespecífico contendo essa única espécie, porém de acordo com CARVALHO & MÔNACO (1967) a primeira espécie pertenceria à subseção *Erythrocoffea* e a segunda à subseção *Mozambicoffea* de *Coffea*.

A procedência do material estudado é diversa no sentido de algumas espécies não terem vindo diretamente do local de origem para o Centro Expe-

rimental do IAC. Algumas são provenientes de outras coleções como a do Horto Florestal de Rio Claro - SP, formada por EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, e outras procederam de coleções de outros países ou ainda, de países onde foi realizado o período de quarentena.

Assim, as plantas estudadas de *C. congensis* (nº de introdução desconhecido), *C. canephora* (nº 801) e *C. dewevrei* (nº 63) são provenientes da coleção do Horto Florestal de Rio Claro - SP, sendo originárias de Java. A introdução de *C. eugenioides* (nº 1098-7) foi feita através de algumas mudas vindas dos EE.UU. da América do Norte, sendo originárias da África, porém de local desconhecido. As plantas de *C. arabica* (s/ número) pertencem à cultivar Arabica (ex-Nacional) que corresponde à variedade *arabica*, a primeira a ser introduzida no Brasil, sabendo-se apenas que as plantas existentes descendem de plantas da antiga coleção de café do IAC. A planta de *C. liberica* (RP 254) é proveniente de Cravinhos - SP. A planta da espécie de *C. stenophylla* (nº 1070-13) foi trazida para o IAC sob a forma de sementes pelo Dr. W. Cowgill, da Guatemala. A representante da espécie *C. racemosa* (nº 1193-3-2) é proveniente de sementes enviadas de Moçambique pelo Dr. Anibal Jardim Bittencourt. A espécie *C. salvatrix* (nº 1288) foi introduzida sob a forma de sementes, procedentes do Centro Nacional de Investigações de Café em Chinchiná, Caldas, Colômbia; e a planta da espécie *C. kapakata* (nº 1102) é procedente de Iangambi, Stanleyville, Congo.

O material testemunha referente a essas espécies foi herborizado e introduzido nos herbários do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais da Universidade Estadual de Campinas (UEC), e no herbário da Seção de Botânica do Instituto Agrônomo, Campinas, (IAC), sob a forma de ramos, com botões, flores e frutos, sendo que cada exsicata contém ainda uma amostra de sementes.

A relação das espécies estudadas, bem como a classificação das mesmas, número de cromossomos, número da planta de acordo com o código usado na Seção de Genética, procedência dessas plantas e número de introdução nos herbários da UEC e do IAC, estão resumidos na Tabela 1.

O mapa indicando a distribuição geográfica das espécies estudadas (Figura 1), baseado numa publicação de CARVALHO & MÔNACO (1967), foi refeito e atualizado. Segundo seus autores originais, esse mapa teria sido baseado nos trabalhos de LEBRUN (1941) e CHEVALIER (1947), constando ainda que, os limites de distribuição nele assinalados são apenas aproximados.

TABELA 1. Classificação, número cromossômico, código de identificação na coleção da Seção de Genética do IAC, procedência e número de introdução no herbário da UEC e do IAC das espécies do gênero *Coffea* utilizadas no trabalho.

Seção	Subseção	Espécie	Nº cromossômico (n)	Código da Coleção	Procedência	Nº de introdução nos herbários da UEC e IAC
		<i>C. arabica</i> L. var. <i>arabica</i> L. (cultivar Arabica)	22 - Krug (1934)	-.-	-.-	UEC - 14.069 - IAC - 25.032
	<i>Erythrocoffea</i> Chev.	<i>C. canephora</i> Pierre ex Froehner	11 - Krug (1934)	801	Java - Rio Claro, SP	UEC - 14.068 - IAC - 25.031
		<i>C. congensis</i> Froehner	11 - Krug (1934)	-.-	Java - Rio Claro, SP	-.-
		<i>C. eugenioides</i> * Moore	11 - Doughty (1939) apud Bolkhouskikh et al'it, 1969), e Bouharmot (1959)	1098-7	África - USA	UEC - 14.067 - IAC - 25.030
	<i>Melanocoffea</i> Chev.	<i>C. stenophylla</i> G. Don	11 - Fagerlind (1937) e Lebrun (1941)	1070-13	Guatemala	UEC - 14.061 - IAC - 25.024
<i>Eucoffea</i>		<i>C. kapakata</i> * Hirsch.	11 - Leliveld (1938) apud Sybenga, 1960)	1102-8	Congo	UEC - 14.063 - IAC - 25.026
	<i>Mozambicoffea</i> Chev.	<i>C. racemosa</i> Lour.	11 - Silva (1956)	1193-3-2	Moçambique	UEC - 14.064 - IAC - 25.027
		<i>C. salvatrix</i> Swynn e Phil.	11 - Medina e Rijo (1969)	1288	Colômbia	UEC - 14.062 - IAC - 25.025
		<i>C. deweyrei</i> De Wild et Dur	11 - Krug (1936)	63	Java - Rio Claro, SP	UEC - 14.065 - IAC - 25.028
	<i>Pachycoffea</i> Chev.	<i>C. liberica</i> Hiern	11 - Fagerlind (1937) e Mendes (1938a)	RP254	Cravinhos, SP	UEC - 14.066 - IAC - 25.029

* Segundo CHEVALIER (1947), a espécie *C. eugenioides* pertence a subseção *Mozambicoffea* e *C. kapakata* pertence ao gênero *Petalanthopsis* sob o nome *Petalanthopsis kapakata*. Na classificação apresentada no quadro acima foram adotadas as modificações propostas por Carvalho e Mônaco (1967) para ambas as espécies.

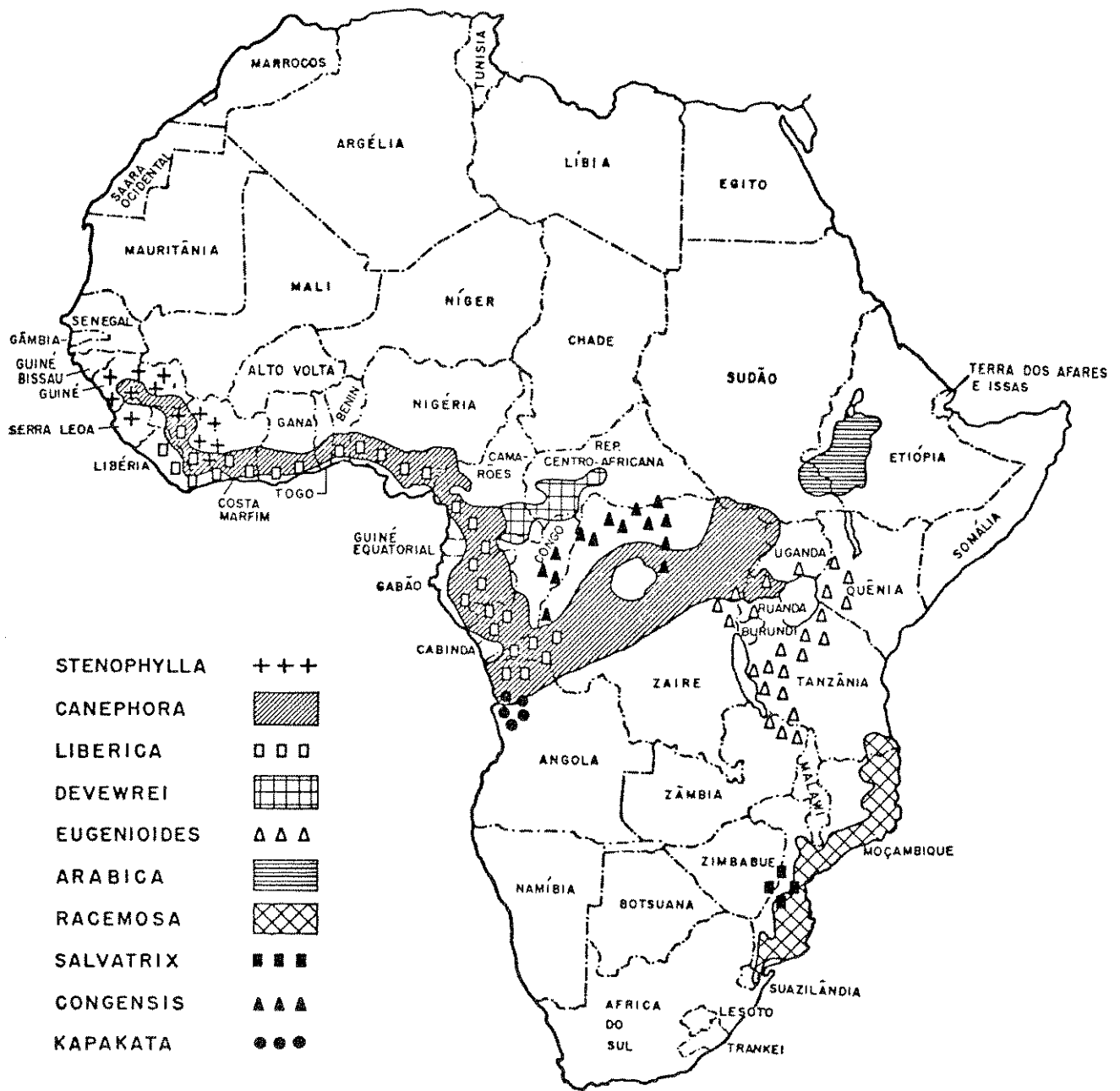


FIGURA 1. Distribuição geográfica de dez espécies do gênero *Coffea* L., Seção *Eucoffea*.

(Baseado em CARVALHO & MÔNACO, 1967).

4. MÉTODOS

4.1. Escolha de material

Os botões florais foram coletados, para cada espécie, sempre de uma única planta, a qual, representava a primeira introdução da espécie no Instituto Agronômico de Campinas.

A adoção de tal procedimento deve-se a três pontos principais:

- 1) A continuidade de todo o processo meiótico e consequentemente da fase de paquíteno, implica em variação na morfologia dos cromossomos no que diz respeito, principalmente, ao número de cromômeros e comprimento cromossômico. Como um dos objetivos do trabalho foi também testar o caráter morfologia em paquíteno como parâmetro taxonômico em *Coffea* (são escassos os registros na bibliografia para esse caráter "morfologia em paquíteno" em taxonomia a nível de espécie), a variação desse caráter entre as espécies seria desejável para a própria caracterização específica. Inicialmente, a constância desse dado nas várias células analisadas teve que ser avaliada a partir de uma planta apenas por espécie tentando reduzir ao máximo o número de variáveis;
- 2) O ideal para cada espécie seria analisar separadamente uma amostra de indivíduos da espécie, de mesma ou diferentes introduções e diferentes variedades, para concluir sobre a morfologia em paquíteno para a espécie considerada. Infelizmente, mais uma vez a restrição a uma única planta se fez porque a fase de paquíteno em *Coffea* é muito difícil de ser obtida nas coletas e observada em lâminas. Como por exemplo pode ser citado o caso da planta de *C. salvatrix* onde foram

elaboradas cêrca de 50 lâminas por dia, durante cerca de seis meses. Durante esse tempo de análises somente foi conseguido o número de cromossomos que consta na Tabela 2. Assim a análise de várias plantas para cada uma das espécies seria quase impossível frente ao tempo determinado para a elaboração de uma tese;

- 3) Finalmente, o fato da maioria das espécies serem autoimcompatíveis, leva à consideração de que a progênie dessas plantas, que foram inicialmente introduzidas, poderia ser provavelmente híbridos entre variedades ou talvez subespécies. Com isso não é possível avaliar com certeza, até que ponto essas possíveis hibridações também poderiam alterar a morfologia desses cromossomos.

4.2. Coleta e fixação do material

O processo de coleta consistiu em manter ramos, contendo botões em fase pré-meiótica, em uma câmara úmida até o momento apropriado para a fixação. Para isso uma amostra de estames de poucos botões eram submetidos a uma rápida fixação prévia, em lâminas contendo carmim acético, afim de se efetuar exames periódicos das células mães de pólen ao microscópio para garantir a coleta de botões na fase meiótica desejada, a fase de paquíteno médio. Esses exames periódicos foram realizados a intervalos de tempo variáveis de acordo com o estágio do botão. Houve certa dificuldade em coletar o material no estágio ideal de paquíteno, ou seja, não muito inicial, pois no material com pouco tempo de fixação, os cromossomos ficam menos evidentes. Além disso, sendo a fase de paquíteno uma fase relativamente rápida, não é possível uma fixação prévia demorada, o que facilitaria a caracterização da fase com mais precisão. Obtida a fase desejada os botões de aspecto semelhante em tamanho e cor ao analisado e

de mesma inflorescência eram fixados em Carnoy após ter sido retirado dos mesmos o perianto. Esse fixador era trocado cerca de três vezes em 48 horas, sendo em seguida o material resfriado até cerca de -20°C para ser armazenado.

4.3. Preparação das lâminas

A técnica de preparação das lâminas para a análise cromossômica foi a de esmagamento de anteras em solução de carmim propiônico (SWAMINATHAN, MARGOON & MEHRA, 1954), com ligeiras modificações de acordo com as necessidades exigidas pelas plantas de café. Os botões a -20°C podem permanecer estocados no Carnoy por alguns anos. Vinte e quatro horas antes da preparação das lâminas os botões eram transferidos para outro fixador resfriado à mesma temperatura e constituindo de álcool etílico absoluto e ácido propiônico na proporção 3:1 respectivamente, saturado com acetato férrico. A estocagem não foi feita neste fixador porque o mesmo promove indistintamente a oxidação do material causando escurecimento do citoplasma das células mães de pólen e, portanto, dificultando a visualização dos cromossomos. Após os botões terem permanecido por 24 horas neste novo fixador, as lâminas eram preparadas. Para isso eram esmagadas duas ou três anteras sobre uma lâmina contendo poucas gotas de carmim propiônico, operação essa executada com o auxílio de um bastão de vidro para evitar a oxidação do material. O excesso de material, células de tecidos diferentes das células mães de pólen era retirado da lâmina para garantir um melhor achatamento da célula e bom espalhamento dos cromossomos. A seguir uma lamínula era colocada sobre o material, então era aquecida a preparação levemente para depois ser pressionadas lâmina e lamínula fortemente enquanto quentes, afim de acentuar o espalhamento das células. Dependendo do estado do material coletado os cromossomos não se espalhavam bem, formando então uma massa picnótica de cromatina ao lado do nucléolo. Poucas lâminas foram preparadas de cada vez, pois, sendo de duração temporária, mantinham-se em boas condições por uma semana aproximadamente.

A seguir as lâminas eram examinadas ao microscópio óptico comum, em contraste de fase.

Para cada uma das plantas foram analisadas, em média, cerca de 200 células.

4.4. Desenhos e fotografias

Somente os cromossomos nucleolares que apresentaram-se com bom espalhamento e totalmente isolados tiveram suas posições marcadas na lâmina, e posteriormente foram desenhados sendo alguns deles fotografados em fotomicroscópio Zeiss com contraste de fase. Os desenhos de cada bivalente nucleolar na fase de paquíteno foram feitos com auxílio de uma câmara clara e em contraste de fase com as seguintes combinações ópticas no microscópio: ocular 15x, objetiva 100x, optovar 1,6x, num aumento total de 1.400 vezes. Vários autores aplicaram diferentes métodos de desenho, de acordo com a natureza dos cromossomos paquítenicos com que trabalharam (MAGOON *et alii*, 1967). LIMA DE FARIA (1952, 1954) ilustrou os cromossomos de *Agapanthus* e centeio com uma série de cromômeros em fibrilas de diferentes intensidades de coloração. Esse método foi seguido para café, porém com algumas modificações. Neste método, principalmente a imagem do cromossomo nucleolar é traçado no seu comprimento total, sendo depois acrescentado o padrão cromomérico, estrutura e localização do centrômero, segmentos heterocromáticos e eucromáticos, e a região de inserção do nucléolo, inclusive o próprio nucléolo.

4.5. Medidas

Quanto às medidas dos cromossomos, as técnicas de esmagamento na elaboração das lâminas permite que o cromossomo permaneça quase que totalmente

num único plano, tornando o processo de medida razoável quanto a erros. As medidas foram tiradas a partir dos desenhos feitos com câmara clara. Primeiramente calculou-se a relação de escala, a seguir os cromossomos foram divididos em pequenas retas para serem medidas e em seguida adicionadas, obtendo-se assim o comprimento total dos mesmos.

As medidas de comprimento total, braço maior e menor, foram efetuadas a partir de desenhos de células em um mesmo estágio de desenvolvimento. Convém mencionar que para medidas do comprimento total dos cromossomos e do cálculo da proporção de braços foi excluída a medida referente ao segmento do satélite.

Para cada uma das espécies ficou deliberado tomar 30 medidas em média para cada cromossomo nucleolar com as quais seria calculado estatisticamente o intervalo de confiança. Devemos ressaltar que, devido a problemas com a coleta de material, não foi possível cumprir esse número total de medidas para todas as espécies, mas somente aqueles números que constam na Tabela 2.

Na classificação dos cromossomos nucleolares, quanto à posição do centrômero, foi utilizada a nomenclatura de LEVAN *et alii* (1964). Segundo a mesma, os cromossomos com proporção de braço (braço longo/braço curto) entre os valores de 1,0 a 1,7 foram denominados metacêntricos (m) de 1,7 a 3,0 de submetacêntricos (sm) e de 3,0 a 7,0 subtelocêntricos (st). Além disso, a combinação destes termos foi utilizada quando os cromossomos apresentavam proporções de braços com valores intermediários às categorias acima mencionadas.

4.6. Herborização e conservação de sementes

As plantas utilizadas no trabalho foram herborizadas de maneira usual, procurando-se formar exsicatas as mais completas possíveis, isto é, com flores, frutos e sementes.

Quanto à conservação de sementes, o processo envolveu a fermentação em água das sementes obtidas de frutos maduros, para que as mesmas ficassem livres da mucilagem do mesocarpo. A seguir, esse material permaneceu na estufa para desidratação e em seguida foi acondicionado em envelopes, fazendo parte das exsiccatas introduzidas no herbário.

5. RESULTADOS

5.1. Análise cromossômica

Os cromossomos nucleolares das plantas do gênero *Coffea* analisadas apresentaram algumas características comuns. A primeira delas com relação à posição e constituição do centrômero. Em todas as espécies analisadas, o centrômero apresentou-se com aspecto eucromático (região fracamente colorida) e localizado, na maioria delas, numa posição que divide os bivalentes em dois braços desiguais (região submetacêntrica e subtlocêntrica dos cromossomos). Uma exceção foi encontrada no cromossomo nucleolar da planta que representa a espécie *C. congensis*, e num dos dois cromossomos nucleolares da espécie *C. racemosa*, que apresentaram centrômero localizado na região mediana.

Outros aspectos comuns observados em todas as espécies foram a presença de duas regiões heterocromáticas (região fortemente colorida) que la-deiam o centrômero e que são constituídas por cromômeros mais ou menos distintos, formando o padrão cromomérico dos cromossomos, e a parte terminal desses bivalentes que apresentam-se como fios acromáticos sem final distinto, e onde não foi constatado quaisquer cromômeros maiores e diferenciais, somente ocorreu uma exceção a isso no cromossomo nucleolar de *C. kapakata*, que apresentou um "knob" subterminal.

Finalmente, também comum é a localização da região de inserção nucleolar no braço menor desses cromossomos, todos eles bastante heterocromáticos, e que diferem entre si apenas no número, tamanho e disposição dessas massas heterocromáticas que compõem essa região.

Convém ressaltar que foi observado apenas um único nucléolo por célula ligado a seu respectivo cromossomo nucleolar, tanto nas plantas das espécies diplóides como na da espécie poliplóide, *C. arabica*.

Na descrição a seguir, de cada um dos cromossomos nucleolares, será ressaltado apenas as características específicas a cada um deles, os quais praticamente se diferenciam pelo padrão cromomérico, pelo comprimento total do cromossomo e pela relação de braços.

5.1.1. *C. liberica* Hiern (págs. 46, 51, 53)

O padrão cromomérico da planta de *C. liberica* caracteriza-se por duas regiões heterocromáticas (fortemente coloridas) que ladeiam o centrômero e estão assim constituídas: no braço menor, partindo do centrômero em direção ao nucleolo, é observada a primeira região heterocromática onde podem ser visualizados quatro cromômeros maiores. Em continuação a estes, mais próximo ao nucleolo, há outros cromômeros menores que se evidenciam conforme o grau de contração do cromossomo. Em seguida a estes cromômeros localiza-se a região organizadora do nucleolo, constituída por duas massas heterocromáticas separadas entre si por uma constrição secundária telomérica. Uma dessas massas heterocromáticas, a localizada mais terminalmente e denominada satélite, assumiu diversos aspectos de acordo com a posição que o cromossomo encontrava-se no momento do esmagamento.

A segunda região heterocromática localiza-se no braço mais longo do cromossomo. Partindo-se da região proximal em direção à terminal notam-se quatro cromômeros distintos, dois mais próximos entre si que separam-se dos outros dois, também próximos, por um pequeno segmento eucromático. Segue-se a estes cromômeros a parte terminal do cromossomo (Figura 2, desenhos A, B e C; Figura 7, fotomicrografia 1 e interpretação 1A; Figura 9, esquema A).

5.1.2. *C. kapakata* Hirsh. (págs. 46, 51, 53)

O cromossomo nucleolar dessa planta apresenta padrão cromomérico que pode ser assim definido: no braço menor, entre o centrômero e a região de inserção nucleolar, ocorre a primeira região heterocromática, que possui seis cromômeros ao todo, três maiores e três menores, separados por um pequeno segmento eucromático. Em seguida, evidencia-se a região de inserção nucleolar como uma massa heterocromática grande (satélite) em relação aos cromômeros constituintes do cromossomo. Esse satélite apresenta-se com aspecto similar nas diversas células analisadas e constantemente pareado.

No braço maior está a segunda região heterocromática que apresenta a partir do centrômero, oito cromômeros, cinco deles médios e três outros menores, sendo os dois grupos separados por um segmento eucromático. Localizado próximo à região terminal e completamente isolado, há um cromômero grande e bastante característico que identifica prontamente o bivalente nucleolar de *C. kapakata*; seguindo-se a este cromômero há a parte final eucromática do cromossomo (Figura 2, desenhos D, E, F e G; Figura 7, fotomicrografia 2 e interpretação 2A; Figura 9, esquema B).

5.1.3. *C. eugenoides* Moore (págs. 46, 53)

De uma maneira geral o cromossomo nucleolar da planta da espécie *C. eugenoides* mostrou o mesmo aspecto básico encontrado nas espécies anteriores; há duas regiões nas proximidades do centrômero constituídas da seguinte maneira: no braço menor contam-se cerca de seis cromômeros, três maiores e três menores, formando dois grupos separados por pequeno segmento eucromático. A região nucleolar localizada neste braço, terminalmente, mostra-se também heterocromática e constituída de um satélite que apresentou-se não pareado em algumas células.

No braço maior, a partir do centrômero em direção à parte terminal, notam-se ao todo cerca de cinco cromômeros, dois bastante próximos entre si, um mais afastado, seguido por outros dois menores e por uma série de cromômeros quase imperceptíveis tanto pelo tamanho como pela sua fraca coloração (Figura 2, desenhos H, I e J; Figura 9, esquema E).

5.1.4. *C. dewevrei* De Wild. et Dur. (págs. 47, 53)

O padrão cromomérico do cromossomo nucleolar dessa planta está constituído por cromômeros razoavelmente distintos, dispostos particularmente neste cromossomo de maneira gradual, ou seja, os maiores cromômeros situam-se próximos ao centrômero, tornando-se cada vez menores em direção à parte terminal no braço maior e em direção à zona do satélite do braço menor.

Neste padrão de disposição existe uma região de transição, principalmente no braço maior, entre a região heterocromática próxima ao centrômero e a região eucromática terminal, onde se torna difícil tanto a visualização como a contagem dos cromômeros nela presentes.

O braço menor apresenta-se mais heterocromático que nas demais espécies. A partir do centrômero foi observado que a distribuição da heterocromatina inicia-se por um cromômero de tamanho médio seguido por cerca de cinco cromômeros de tamanhos progressivamente menores, sendo os mais próximos ao centrômero densamente coloridos e constantemente visíveis, enquanto os outros mais distais, próximos à região nucleolar, são menores e quase indistintos. Ainda neste braço localiza-se a região organizadora do nucléolo seguida do satélite que, em *C. dewevrei*, não se mostrou pareado em algumas das células analisadas, como pode ser visto nos desenhos A, B e C da Figura 3; e esquema F da Figura 9.

O braço maior apresenta cromômeros com sequência de tamanho progressivamente menor em direção à parte terminal, a qual é bem mais acentuada que

no braço menor. Partindo do centrômero nota-se um cromômero razoavelmente destacado dos demais que o seguem e que se apresentam de aspecto irregular e de coloração menos intensa (Figura 3, desenho A, B e C; Figura 9, esquema F).

5.1.5. *C. congensis* Froehner (págs. 47, 53)

O bivalente nucleolar de *C. congensis* apresenta em um dos braços um número maior de cromômeros que no outro, e que estão dispostos de maneira gradual a partir do centrômero em direção à zona satélite.

A região organizadora do nucléolo mostra duas massas heterocromáticas, pouco maiores que os cromômeros constituintes do cromossomo, intercaladas pela constrição secundária.

No outro braço há um pequeno número de cromômeros, dois de tamanhos semelhantes próximos entre si e situados junto ao centrômero delimitando-o, sendo seguidos por outros dois, quase imperceptíveis. Neste mesmo braço é observado ainda, já na parte terminal acromática, um pequeno cromômero isolado, mas bem evidente (Figura 3, desenhos D, E e F; Figura 9, esquema D). Devemos ressaltar que tanto o padrão cromomérico como as medidas do cromossomo nucleolar desta espécie foram efetuados em poucas células pelo fato do único exemplar existente na coleção ter sido eliminado.

5.1.6. *C. canephora* Pierre ex Froehner (págs. 47, 53)

No braço menor do cromossomo de *C. canephora*, a região heterocromática é composta de uma série de cromômeros, sendo que três maiores localizam-se imediatamente um após o outro, bem próximo ao centrômero. Seguindo em direção à região organizadora do nucléolo temos uma pequena região eucromática seguida de

mais quatro cromômeros, menores que os anteriores, separados entre si por pequenos segmentos eucromáticos. Finalmente temos a zona satélite que nesta espécie aparece com satélite às vezes pareado outras não (Figura 3, desenhos G, H, I e J; Figura 9, esquema C).

No braço maior, limitado ao centrômero, há dois cromômeros de tamanhos similares próximos entre si, seguidos por sua vez por dois cromômeros menores. Na parte terminal, eucromática, evidencia-se um pequeno cromômero bem individualizado (Figura 3, desenhos G, H, I e J; Figura 9, esquema C).

5.1.7. *C. salvatrix* Swynn et Phil. (págs. 48, 52, 53)

A planta da espécie *C. salvatrix* apresentou dois cromossomos ligados a um único nucléolo. Apesar do número de cromossomos ligados ao nucléolo diferir das outras espécies anteriormente descritas, o aspecto básico dos cromossomos é semelhante, ou seja, também as regiões heterocromáticas estão localizadas próximo ao centrômero e as regiões eucromáticas ocorrem nas partes terminais do cromossomo.

Os dois cromossomos nucleolares de *C. salvatrix* foram denominados I e II e apresentam-se da seguinte maneira; o cromossomo I apresenta as constantes regiões heterocromáticas que no braço maior constitui-se de cinco cromômeros, dois médios e três menores. Após estes cromômeros segue a região terminal acromática. No braço menor, a partir do centrômero, há inicialmente dois cromômeros médios separados por segmento eucromático, seguido por um pequeno cromômero e a região de inserção nucleolar, que se apresenta terminal e que se evidencia por uma massa heterocromática única (Figura 4, desenhos A-I, B-I e C-I; Figura 8, fotomicrografia 3 e interpretação 3A; Figura 9, esquema G-1).

O cromossomo nucleolar II de *C. salvatrix* mostrou o padrão cromômérico mais simples dentre todos os bivalentes nucleolares identificados. O pa-

drão cromomérico desse cromossomo limita-se a dois pequenos segmentos heterocromáticos dispostos um de cada lado do centrômero, sendo que o restante de ambos os braços do cromossomo é totalmente eucromático. O centrômero de aparência eucromática, localiza-se na região submetacêntrica.

A região do organizador nucleolar, em posição terminal, evidencia-se por uma pequena massa heterocromática (Figura 4, desenhos A-II, B-II, C-II; Figura 8, fotomicrografia 3 e interpretação 3A; Figura 9, esquema, H-II).

5.1.8. *C. racemosa* Lour. (págs. 48, 53)

À semelhança de *C. salvatrix*, a planta da espécie *C. racemosa* apresentou também dois cromossomos nucleolares ligados a um nucléolo somente. Esses cromossomos foram igualmente denominados I e II. O cromossomo I, medindo 38,09 micrômetros, o mais longo dos dois cromossomos e também de todos os outros cromossomos analisados, possui centrômero em posição metacêntrica que o divide em dois braços aproximadamente iguais (Figura 4, D-I, E-I, F-I; Tabela 2; Figura 9, esquema I-I).

Os cromômeros que formam as regiões heterocromáticas estão assim sequenciados: a partir do centrômero em direção à parte terminal temos apenas três cromômeros médios separados entre si por pequenos segmentos eucromáticos, seguindo-se a parte terminal acromática; no outro braço, a partir do centrômero em direção à região organizadora do nucléolo, existem quatro cromômeros mais ou menos próximos seguidos por três menores, sendo estes dois grupos de cromômeros separados por pequena região eucromática. Em seguida, ainda podemos constatar dois outros cromômeros bem próximos à região nucleolar, que se apresentam como duas massas heterocromáticas distintas intercaladas pela constrição secundária que neste caso é bem reduzida.

O cromossomo II de *C. racemosa* (Figura 4, D-II, E-II, F-II; Figura 9, esquema J-II), é menor que o cromossomo I e também o menor de todos os bi-

valentes analisados, medindo 21,78 micrômetros (Tabela 2). Esse cromossomo é bem simples quanto ao número de cromômeros que fazem parte das regiões heterocromáticas do cromossomo.

O centrômero de aspecto eucromático separa as duas regiões heterocromáticas, que estão assim formadas; no braço maior há junto ao centrômero, dois cromômeros bem evidentes e dispostos bem próximos um do outro, a seguir temos um segmento eucromático e mais três cromômeros menores localizados quase na parte terminal acromática. No outro braço acham-se apenas cerca de dois cromômeros próximos ao centrômero, seguindo-se uma região eucromática que precede a região de inserção nucleolar formada por um satélite relativamente pequeno que em algumas células não se apresentou pareado.

5.1.9. *C. stenophylla* G. Don (pág. 49)

Para a planta da espécie *C. stenophylla* foi necessário o exame de um número extra de células mães de pólen e de cuja espécie foi realizado um maior número de coletas. Foi verificado que nesta planta ocorre certa variação tanto no número de bivalentes nucleolares como no padrão cromomérico dos mesmos como pode ser observado nos desenhos A, B, C da Figura 5. Entretanto, em um número pouco maior de células analisadas ocorreu a presença de um cromossomo apenas ligado ao nucléolo, cujo aspecto pode ser observado nos desenhos D, E, F, da Figura 5.

Devido a falta de constância no padrão cromomérico e na morfologia geral desses cromossomos, para essa espécie não foi feito o esquema, que no caso representaria a forma definitiva, assim como também não foram tiradas as medidas dos mesmos.

5.1.10. *C. arabica* L. (págs. 50, 52, 53)

Para a planta da espécie tetraplóide foi constatada a presença constante de dois cromossomos nucleolares ligados a um único nucléolo, cujo aspecto básico assemelha-se aos cromossomos nucleolares das demais espécies do gênero, anteriormente descritos.

O bivalente nucleolar I apresenta centrômero de aspecto eucromático e localizado numa posição submetacêntrica. No braço menor desse cromossomo, a partir do centrômero, há cerca de três cromômeros maiores seguidos da região de inserção do nucléolo onde nota-se uma pequena região heterocromática. O braço maior desse cromossomo apresenta junto ao centrômero, três cromômeros maiores, e na parte terminal acromática outros três menores (Figura 6, desenhos de A a F; Figura 8, fotomicrografia 4 e interpretação 4A; Figura 9, esquema L-I).

A presença de um maior número de cromossomos no complemento de *C. arabica* dificultou a obtenção de um número suficiente de cromossomos nucleolares totalmente isolados. Em decorrência disso a localização do centrômero do bivalente nucleolar II não pôde ser devidamente confirmada. No seu comprimento total este bivalente possui cerca de seis cromômeros mais distintos e uma região de inserção do nucléolo, também como uma pequena região heterocromática, que se assemelha a um cromômero terminal (Figura 6, desenhos de A a F; Figura 8, fotomicrografia 4 e interpretação 4A; Figura 9, esquema M-II).

5.2. Medidas

As medidas do comprimento total obtidas para as espécies em estudo, com exceção dos bivalentes nucleolares da espécie *C. stenophylla* devido às grandes variações de morfologia cromossômica observadas, encontram-se na Tabela 2.

O cálculo da proporção de braços não foi efetuado somente para o cromossomo nucleolar II de *C. arabica*, pela dificuldade na localização do centrômero desse cromossomo.

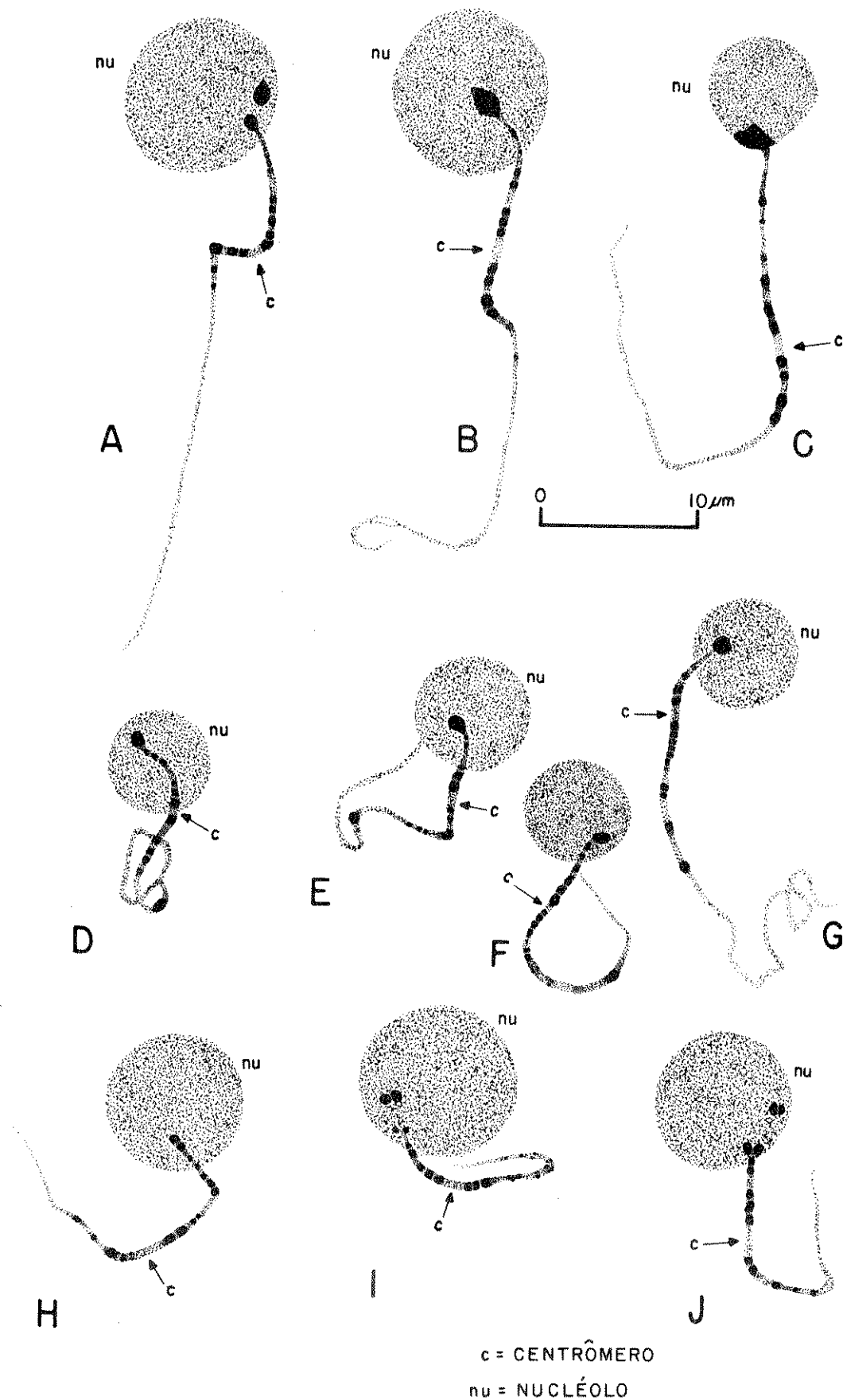


FIGURA 2. Cromossomos nucleolares: desenhos A, B, C, dos bivalentes de *C. liberica* com aspectos diferentes do macrosatélite; desenhos D, E, F, G, de *C. kapakata*, com evidente cromômero diferencial na parte terminal do braço maior; desenhos H, I, J, de *C. eugenioides*, onde deve ser notada a diferença da região de inserção nucleolar em relação a das espécies anteriores.

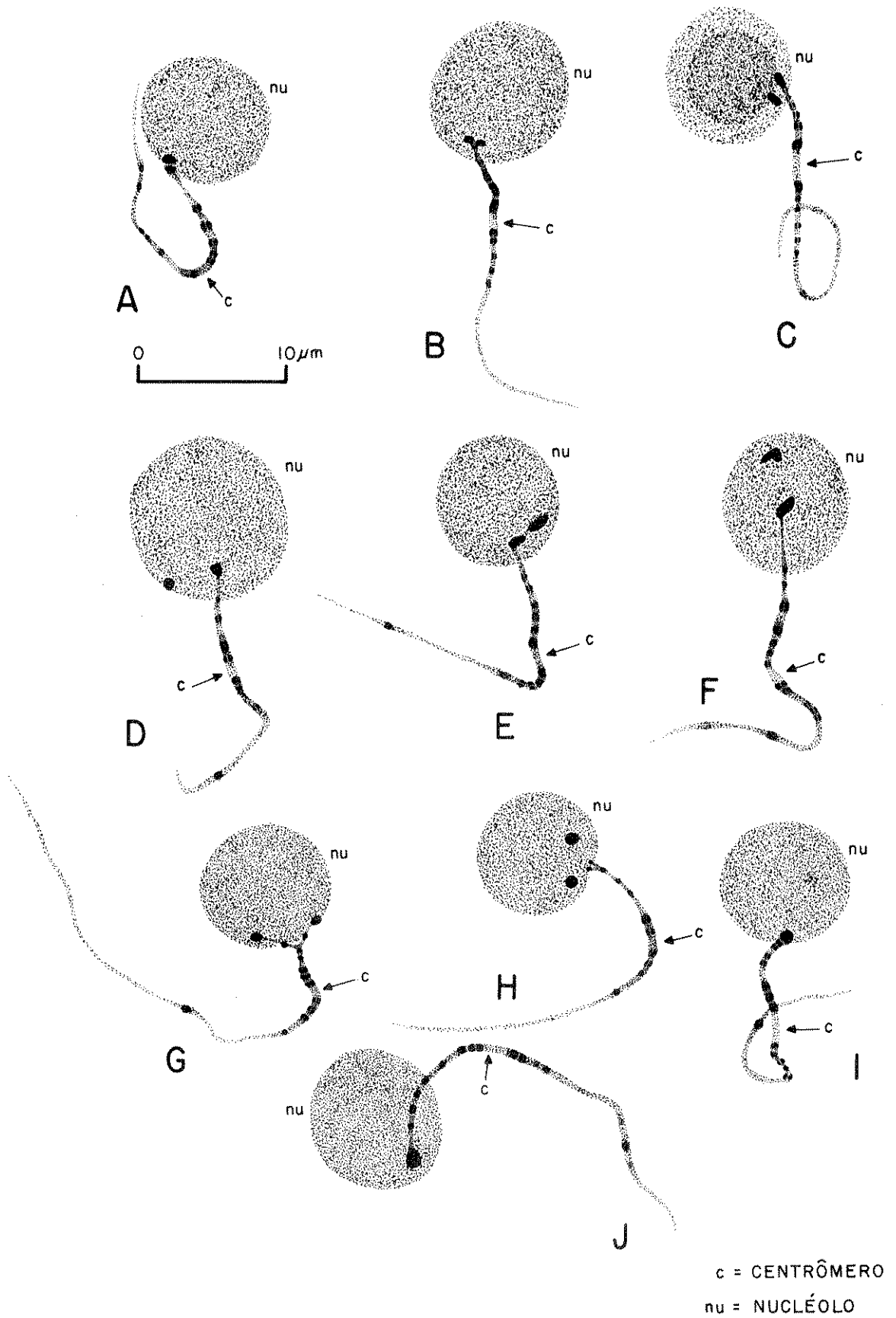
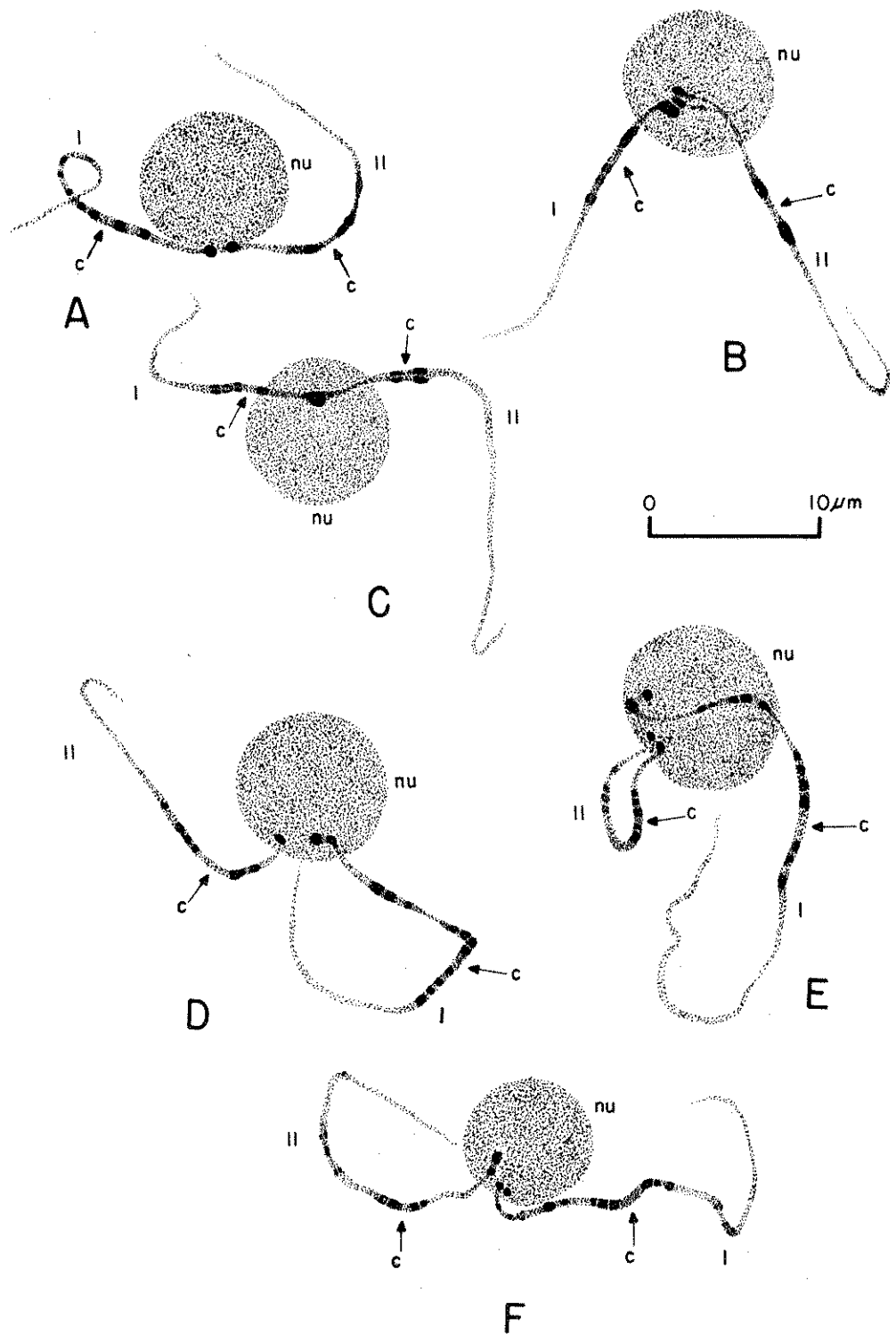


FIGURA 3. Cromossomos nucleolares: desenhos A, B, C, mostrando a disposição de cromômeros em gradiente de tamanho em *C. deweyrei*; desenhos D, E, F, os bivalentes nucleolares de *C. congensis* e desenhos G, H, I, J, mostrando satélites pareados e não pareados de *C. canephora*.



c = CENTRÔMERO
 nu = NUCLÉOLO

FIGURA 4. Cromossomos nucleolares: desenhos A, B, C, correspondendo aos bivalentes I e II da espécie diplóide *C. salvatrix*; desenhos D, E, F, os bivalentes I e II de *C. racemosa*, espécie também diplóide.

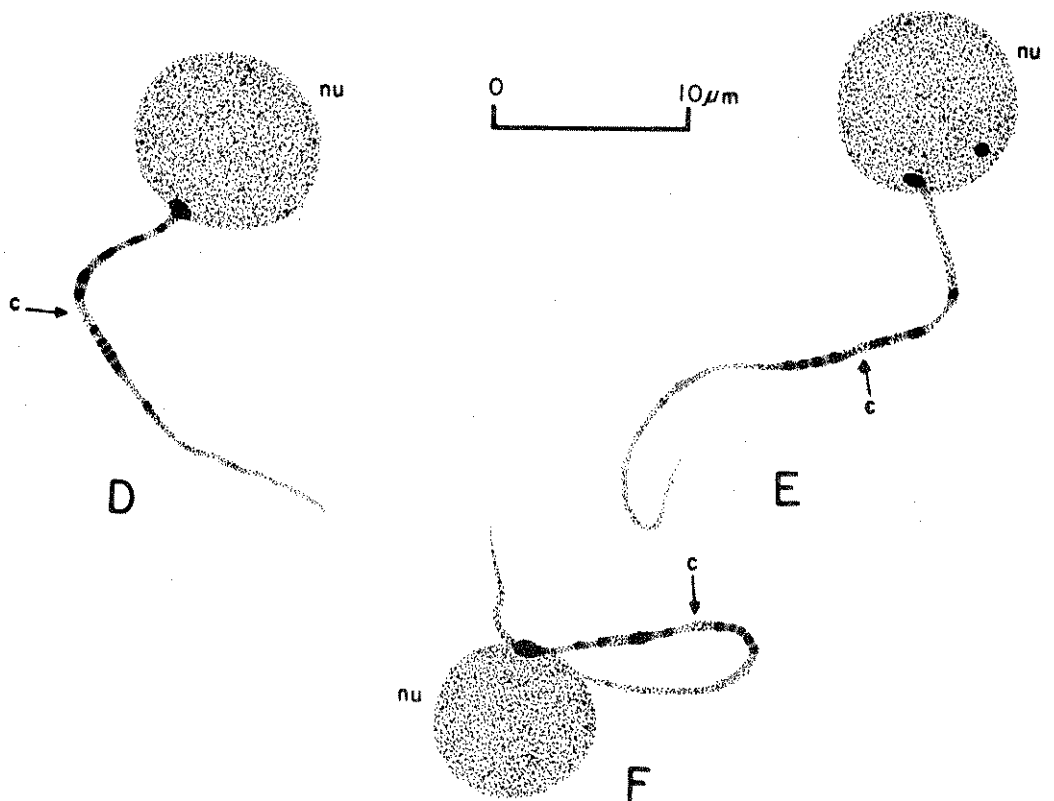
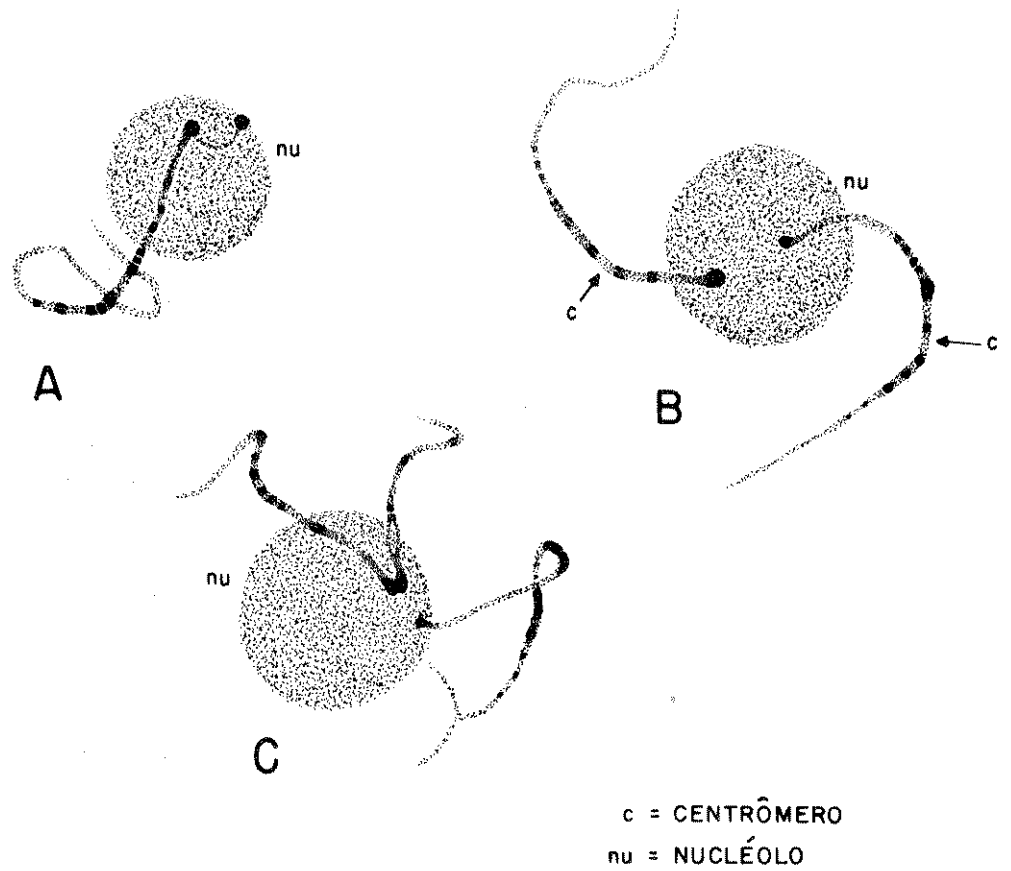


FIGURA 5. Cromossomos nucleolares: desenhos A, B, C, evidenciam a variação no número e no aspecto dos bivalentes de *C. stenophylla*. Desenhos D, E, F, número e morfologia mais comuns observados para os cromossomos nucleolares de *C. stenophylla*.

Bc/5068

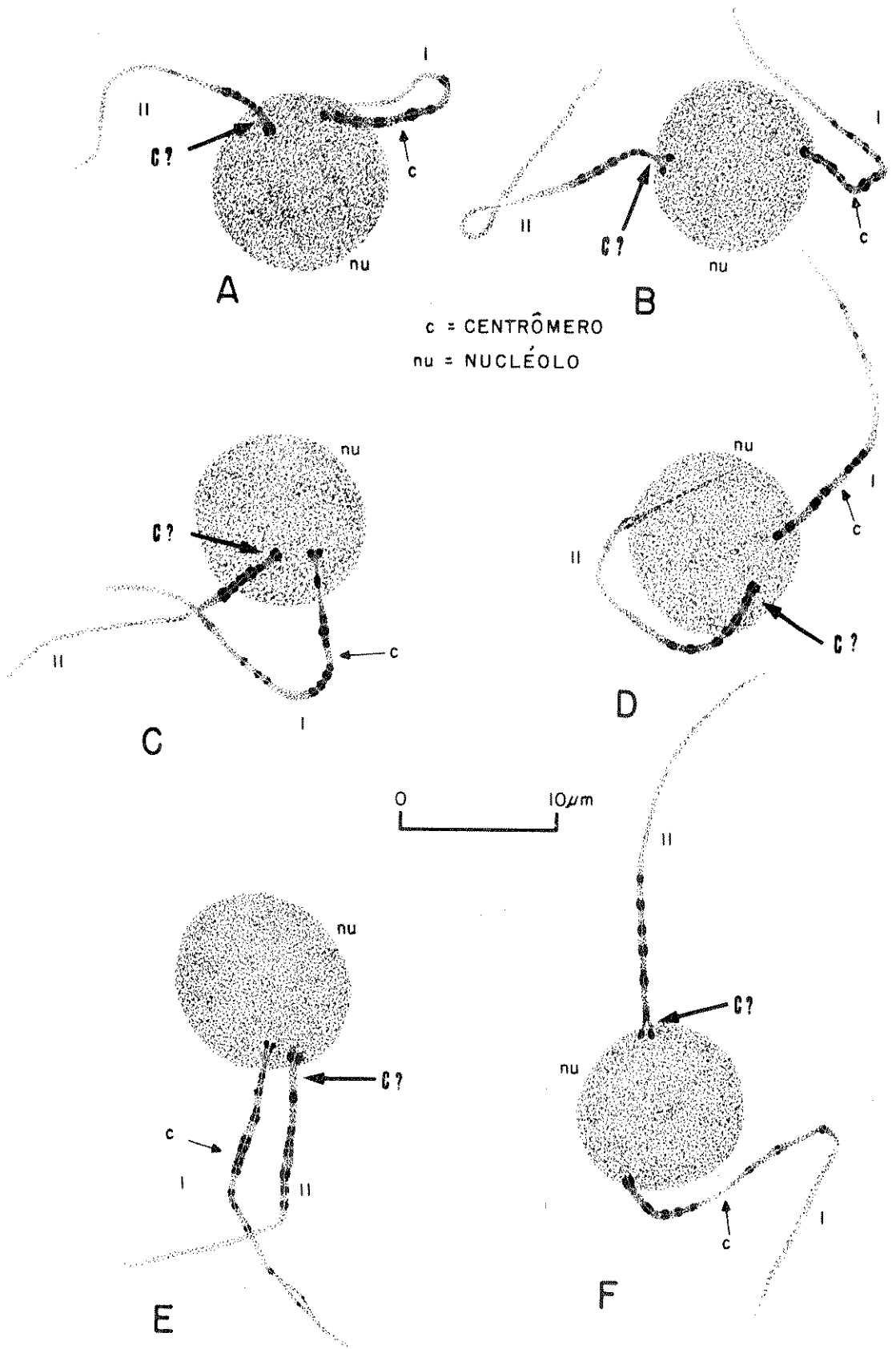
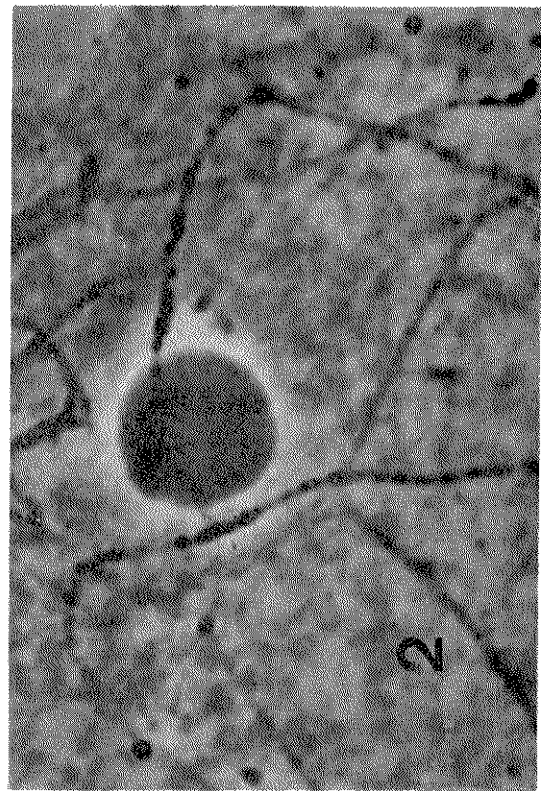


FIGURA 6. Desenhos de A a F, cromossomos nucleolares da espécie tetraplóide *C. arabica* L., mostrando os vários aspectos dos bivalentes I e II.



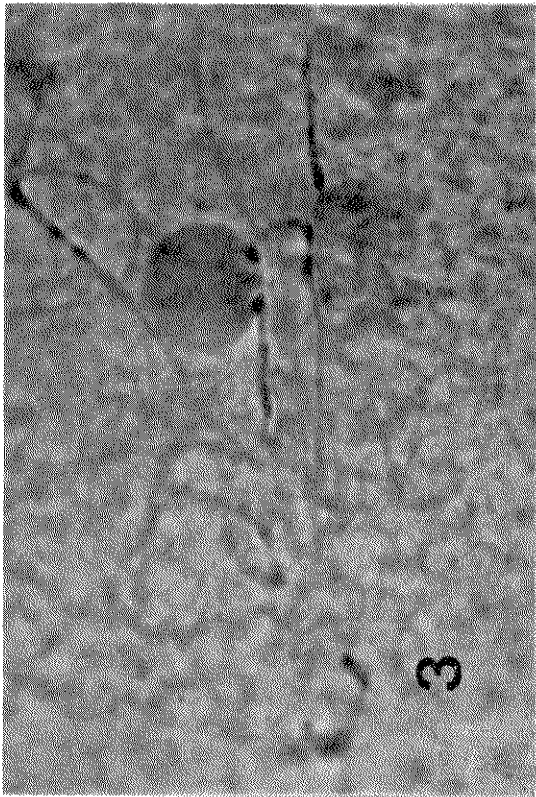
1A

2A

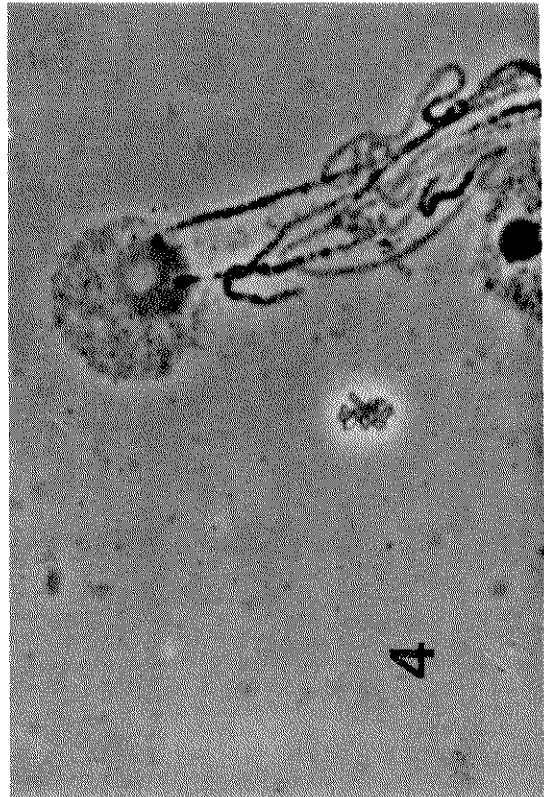
c = CENTRÔMERO
nu = NUCLÉOLO

10 μm

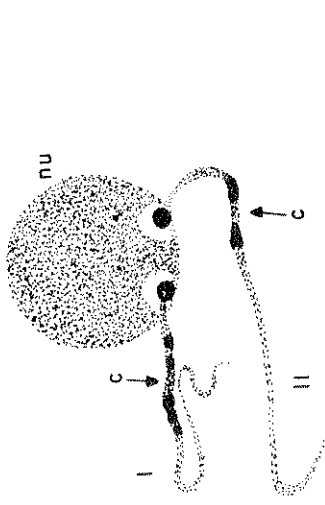
FIGURA 7. Fotomicrografias e interpretação do cromossomo nucleolar de duas espécies de *Coffea* L.: 1 - 1A, *C. arabica* Hiern (X2460); 2 - 2A, *C. liberica* Hiern (X2340), respectivamente.



3



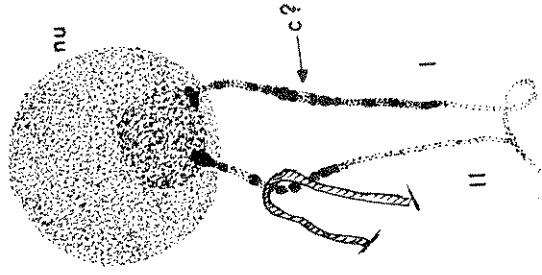
4



3A

c = CENTROMERO

nu = NUCLÉOLO



4A

FIGURA 8. Fotomicrografias e interpretação do cromossomo nucleolar de duas espécies de *Coffea* L.: 3 - 3A, *C. salvatrix* Swynn et Phil.; (X1840), 4 - 4A, *C. arabica* L. (X1800), respectivamente.

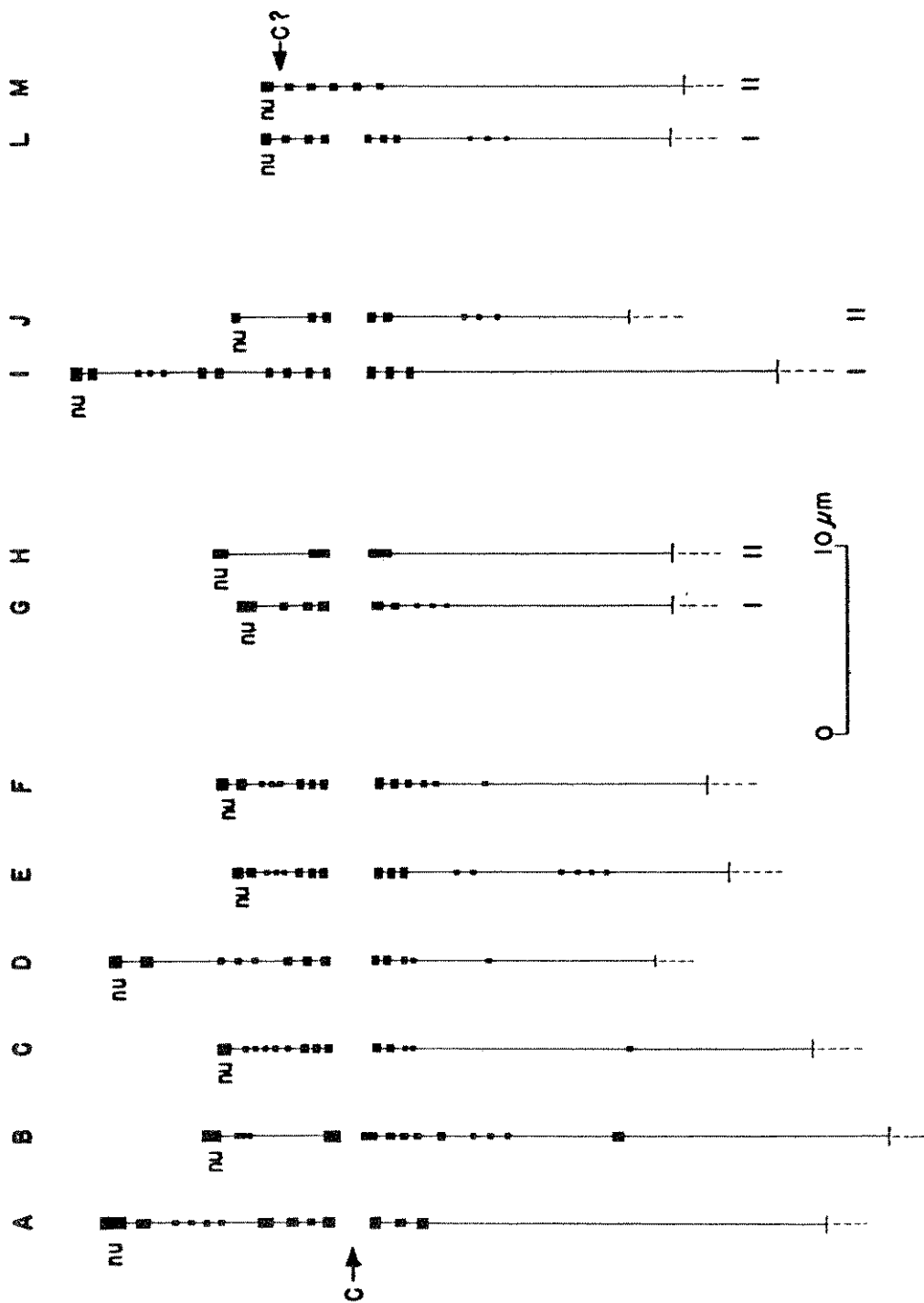


FIGURA 9. Esquemas dos cromossomos nucleolares de nove espécies de *Coffea* L.:

- A) *C. liberica* Hiern
 B) *C. kapakata* Hirsh.
 C) *C. canephora* Pierre ex Froehner
 D) *C. congensis* Froehner
 E) *C. eugenioides* Moore
 F) *C. deweyrei* de Wild et Dur.
 G) - H) *C. salvatrix* Swynn et Phil.
 I) - J) *C. racemosa* Lour.
 L) - M) *C. arabica* L.

nu = região de inserção nucleolar;
 c = centrômero.

TABELA 2. Gênero *Coffea* L. comprimento do cromossomo nucleolar em micrômetros.

Espécie	Nível de ploidia	Nº de cromossomos nucleolares	Nº de cromossomos medidos	Comprimento total	Braço maior (M)	Braço menor (m)	Satélite	Proporção de braços	Posição do centrômero (M/m)
<i>C. arabica</i>	4n	2	8	22,0 ± 2,29	14,75	5,36	0,52	2,26	Sm
		II	8	22,65 ± 2,89	-.-	-.-	0,57	-.-	-.-
<i>C. canephora</i>	2n	1	30	32,17 ± 2,31	25,35	6,82	0,79	3,70	St
<i>C. congensis</i>	2n	1	3	28,50 ± 10,37	16,72	11,11	0,76	1,40	m
<i>C. deweyi</i>	2n	1	8	25,84 ± 4,10	19,52	6,32	0,60	3,08	Sm - St
<i>C. eugenioides</i>	2n	1	11	26,46 ± 4,19	20,90	5,56	0,56	3,75	St
<i>C. kapakpa</i>	2n	1	30	36,39 ± 2,79	29,94	6,45	1,04	4,64	St
<i>C. liberica</i>	2n	1	9	38,04 ± 4,25	26,34	11,69	1,98	2,25	Sm
<i>C. racemosa</i>	2n	2	4	38,09 ± 15,80	23,65	14,44	0,57	1,63	m - Sm
		II	3	21,78 ± 6,06	15,45	6,33	0,50	2,44	Sm
<i>C. salvatrix</i>	2n	2	12	22,92 ± 2,85	17,51	5,41	0,99	3,23	St
		II	7	24,37 ± 2,47	17,53	6,84	0,86	2,56	Sm

m - metacêntrico
Sm - submetacêntrico
St - subtelocêntrico

6. DISCUSSÃO

6.1. Número de cromossomos nucleolares e nucléolos

A constatação mais comum em células vegetais e mesmo animais, é a presença de apenas um cromossomo nucleolar com seu respectivo nucléolo para cada complemento cromossômico. Entretanto, ocasionalmente, algumas espécies consideradas diplóides apresentam mais de um cromossomo nucleolar para cada complemento monoplóide, como é o caso de *Ipomoea crassicaulis* e *I. biloba* (KRISHNAN *et alii*, 1969; MAGOON *et alii*, 1972, respectivamente) *Oryza sativa* (CHU, 1967; MISRA & SHASTRY, 1967), *Prunus persica* (JELENKOVIC & HARRINGTON, 1972), *Ricinus communis* (PARIS *et alii*, 1978 e 1980) e *Sorghum intrans* (GARBER, 1947). Seis das nove plantas, representantes das espécies diplóides de *Coffea* aqui analisadas, mostraram um único cromossomo nucleolar nos seus complementos, o que concorda com o nível de ploidia das mesmas. Entretanto duas delas, a planta de *C. racemosa* e *C. salvatrix* apresentaram, em todas as células analisadas, dois desses cromossomos; e uma terceira planta, a de *C. stenophylla* mostrou um número variável de um a três desses bivalentes associados ao nucléolo.

No caso de espécies diplóides a variação no número de cromossomos ligados ao nucléolo em geral, talvez possa ser atribuída tanto a influências ambientais como genéticas ainda não determinadas, sendo este um assunto que há muito vem sendo estudado. A inconstância no número de cromossomos nucleolares tem sido atribuída à perda do *locus* principal da região organizadora do nucléolo. Em princípio, parece que muitos *loci* em vários cromossomos de um genoma têm a capacidade de formar o nucléolo em condições especiais. Quando ocorre a perda da principal região organizadora do nucléolo, esses vários *loci* se manifestam formando diversos nucléolos pequenos que através de posterior fusão, formam um nucléolo maior ligado a vários cromossomos. Em condições normais esse mecanismo é regrido por relações de dominância, sendo esses vários *loci* normalmente suprimidos

pela principal região formadora de nucléolos (McCLINTOCK, 1934; BUSH & SMETANA, 1970; SYBENGA, 1972).

A diversidade no aspecto e a inconstância dos cromossomos ligados ao nucléolo na planta de *C. stenophylla* (Figura 5, pág.49, desenhos A, B, C), pode sugerir alguma anormalidade relacionada com uma ou várias regiões organizadoras do nucléolo, constituintes do complemento dessa planta.

Já em plantas mutantes de milho, a presença de vários cromossomos ligados a um único nucléolo, foi atribuída à fusão de nucléolos ou à troca de segmentos de cromatina da área responsável pela formação nucleolar entre os vários cromossomos (McCLINTOCK, 1934). Assim, embora as plantas de *C. racemosa*, *C. salvatrix* e *C. stenophylla* mostrem mais de um cromossomo nucleolar, estes mostraram-se sempre ligados a um único nucléolo.

A presença desse único nucléolo por sua vez, pode talvez ter sido devido a fase meiótica em que foram realizadas as análises. Pois, de um modo geral, parece que em células interfásicas, ou seja, na fase entre o final da telófase (onde se visualizam os nucléolos recém-formados) e o início da prófase da divisão seguinte, seria possível observar o número de nucléolos correspondentes ao número de cromossomos nucleolares ou regiões organizadoras do nucléolo. Isto porque, tem sido observado que, principalmente na interfase de células vegetais, animais e mesmo humanas, poderia ocorrer a fusão dos vários nucléolos eventualmente formados na célula, o que então poderia levar a uma interpretação duvidosa do número de nucléolos conforme a fase onde os mesmos fossem estudados (SHARP, 1943; McCLINTOCK, 1934; GATES, 1937; LONGWELL & SVIHLA, 1960; BUSH & SMETANA, 1970; MORGAN, 1971; SYBENGA, 1972; ANASTASSOVA-KRISTEVA, 1977; NICOLOFF *et alii*, 1977; GANI, 1978; PERKINS *et alii*, 1980). Embora em *Coffea* não tenha sido registrado em destaque qualquer outro parecer sobre a ocorrência de fusão entre nucléolos, a presença nas plantas das espécies diplóides *C. racemosa*, *C. salvatrix* e *C. stenophylla* e mesmo na planta da espécie poliplóide *C. arabica* de mais de um bivalente associados a um nucléolo somente, parece sugerir que também nessas plantas de

Coffea a fusão de nucléolos deva ocorrer como um processo natural. Entretanto, tem sido mencionado, principalmente para cromossomos nucleolares acrocêntricos humanos, que a fusão de nucléolos e a persistência dos mesmos durante a metáfase implicaria na ocorrência de alterações cromossômicas, como translocações e aneuploidia (FARAH, 1982).

A sugestão da ocorrência de fusão nucleolar nessas plantas de café, talvez possa ter como apoio observações anteriores feitas na microsporogênese de *C. stenophylla* e *C. salvatrix* (MEDINA & RIJO, 1969) onde foram observados os mesmos números de cromossomos nucleolares aqui registrados, porém ligados ocasionalmente a diversos nucléolos.

Em um estudo sobre a microsporogênese de *C. arabica*, MEDINA (1950) relata um detalhe que também poderia ser considerado uma prova de fusão de nucléolos em café. Nessa espécie a autora observou em micrôsporos recém-formados, ainda na forma de tetrade, além da presença de um nucléolo grande e bem visível, um outro nucléolo menor. Em fase mais adiantada, na qual os micrôsporos já se encontravam separados, a autora verificou a presença de um grande e único nucléolo.

A presença de mais de um bivalente nucleolar em algumas espécies diplóides do gênero *Coffea* foi observada por BOUHARMONT (1959), que não as discriminou, e por MEDINA *et alii*, (1977) em *C. eugenioides*, entretanto não houve concordância de resultados com relação às observações aqui realizadas nessa mesma espécie.

De qualquer maneira, a presença constante de duas associações nucleolares nessas plantas das espécies diplóides, *C. racemosa* e *C. salvatrix*, é de interesse a medida que mostra diferenças entre as várias espécies diplóides analisadas e constituiu uma característica adicional a separá-las das demais.

Outro fato com relação às plantas de *C. racemosa* e *C. salvatrix* é que, ambas foram as únicas que além de apresentarem constância nesse número de associações nucleolares, possuem o cromossomo nucleolar II com tamanho e simpli-

cidade de padrão cromomérico muito próximos (Figura 4, pág. 48, desenhos A, B, C, para *C. salvatrix* e desenhos D, E, F, para *C. racemosa*; Figura 9, pág. 53, esquema H, J). Embora tais dados tenham sido obtidos para uma planta de cada uma dessas espécies, estes parecem coincidir de certa forma com a distribuição geográfica próxima entre as mesmas e isoladas das demais espécies (Figura 1, pág. 29), talvez indicando maior proximidade filogenética entre elas, e que concorda com a atual classificação dessas espécies na subseção *Mozambicooffea*. Além disso, ambas também têm em comum, maior grau de resistência à seca em relação às demais espécies (CHEVALIER, 1947).

Quanto à espécie tetraplóide *C. arabica*, o número de dois bivalentes nucleolares observado, também associados a um nucleólo somente, concorda com o número de cromossomos nucleolares esperado em um tetraplóide segundo a teoria de GATES (1942), que no caso seriam dois. Esse número de associações nucleolares, constante durante as observações, confirma de certa forma a natureza poliplóide de *C. arabica*, embora haja discordância em relação ao número de nucléolos e nível de ploidia. Isto, em princípio, não constitui empecilho maior na interpretação de certos aspectos filogenéticos, haja visto KAMALA (1976) ter determinado a presença de diversos genomas em diferentes espécies de *Brassica* apenas baseando-se na morfologia e no número de cromossomos nucleolares. Embora tenha sido verificado a presença de apenas dois cromossomos nucleolares na planta de *C. arabica* analisada, MEDINA (1950) e MENDES (1950)⁽¹⁾ observaram durante a microporogênese dessa mesma espécie um número variável de um e quatro desses cromossomos, também associados a um único nucleólo.

Sabe-se que, em certos casos, o número de cromossomos nucleolares pode ser realmente o indicativo do nível de ploidia de um taxon. Entretanto, quando se adota tal pensamento, é necessário conhecer previamente o número deles por genoma. Então, se for considerado *C. arabica* como sendo realmente um alopoliploide, como supuseram CARVALHO (1952), CARVALHO & MÓNACO, 1967 e GRASSIAS & KAMMACHER (1975) entre outros, os dados obtidos por MEDINA (1950) e MENDES (1950)⁽¹⁾

(1) MENDES, A.J.T.

sobre o número de associações nucleolares nessa espécie, também devem ser levados em conta ao se abordar somente o aspecto do número de cromossomos nucleolares das espécies que talvez tivessem contribuindo na formação de *C. arabica*. Assim sendo, esses dados mostrando essas variações no número de associações nucleolares em *C. arabica*, nos levam a supor três tipos de combinações entre essas possíveis espécies genitoras: 1) união de duas espécies portando um cromossomo nucleolar cada uma; 2) duas espécies, tendo uma delas um cromossomo nucleolar e a outra dois deles; 3) a união de duas espécies com dois desses cromossomos cada uma. A inconstância, verificada pelos últimos autores, no número de associações nucleolares em *C. arabica* e não registrada durante as nossas observações, aliada ao fato de ser esta espécie considerada alopoliplóide e, portanto, constituída de genomas diferentes, impedem que seja totalmente descartada a possibilidade de estar ocorrendo nessa espécie a supressão da função organizadora do nucléolo, problema esse que tem sido constatado em organismos geralmente com genomas híbridos. Essa supressão de função também pode acarretar alterações nas relações de dominância ou de competição entre as regiões organizadoras dos vários cromossomos nucleolares componentes do novo complemento ou suprimir totalmente a função de algum deles, como foi observado em híbridos vegetais nos gêneros *Crepis* (NAVASHIN, 1933), *Hordeum* (KASHA & SADASIVAIAH, 1971), *Phaseolus* (KRISHNAN & DE, 1968), *Ribes* (KEEP, 1971), *Salix* (WILKINSON, 1944), *Solanum* (YEH & PELOQUIN, 1965a), *Triticum* X *Aegilops* (FLAVELL & O'DELL, 1979), e em híbridos animais como *Drosophila* (BICUDO, 1982) e *Xenopus* (HONJO & REEDER, 1973). Decorrente disso, o número real de cromossomos nucleolares e, conseqüentemente, o número de nucléolos em *C. arabica* independentemente da fusão nucleolar, poderia estar alterado por tal processo, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Esses dois pontos impedem suposições seguras acêrca das espécies genitoras de *C. arabica* baseadas principalmente, ou, somente no número de associações nucleolares visíveis e sem o embasamento no conhecimento morfológico dos possíveis cromossomos nucleolares.

6.2. Morfologia dos cromossomos nucleolares em paquíteno

A importância dos estudos citogenéticos está no fato de que os mesmos muitas vezes, podem constiuir-se em prē-requisitos bāsicos e necessārios às investigações genéticas, principalmente, com relaçaō a plantas de interesse econōmico.

Um dos exemplos deste tipo de estudo ē a anālise morfolōgica dos cromossomos na fase meiōtica de paquíteno onde um nūmero razoāvel de plantas jā tiveram seus cromossomos analisados. É interessante notar de inīcio, que em grupos vegetais a morfologia dos cromossomos em paquíteno pode variar quanto ā distribuiçaō da heterocromatina ao longo do comprimento cromossōmico, ā visualizaçaō e diferenciaçaō dos cromōmeros dentro das regiōes heterocromāticas, ā distinçaō ou nāo de cromātides e, finalmente, quanto ā presença ou nāo de grandes cromōmeros ("knobs") diferenciais, terminais ou nāo. Tem sido possīvel assim enquadrar, com algumas restriçōes, os cromossomos paquitēnicos em categorias com base, principalmente, em padrōes morfolōgicos gerais formados pelo conjunto das caracterīsticas acima.

Em um primeiro padrō de morfologia, denominado de padrō com distribuiçaō proximal da heterocromatina (JELENKOVIC & HARRINGTON, 1972), os segmentos heterocromāticos concentram-se prōximo ao centrōmero do cromossomo, sendo as partes terminais dos braços quase acromāticas, onde com algumas exceçōes (*Lycopersicon*, *Solanum* e *Pennisetum*) nāo ocorrem cromōmeros terminais. Alēm disso, as cromātides, neste padrō, geralmente apresentam-se bem unidas tomando o cromossomo em paquíteno o aspecto de um ūnico fio.

O padrō de distribuiçaō proximal de heterocromatina tem sido observado em cromossomos de *Ipomea* (KRISHNAN *et alii*, 1969); MAGOON *et alii*, 1972) *Lycopersicon* (BROWN, 1949; BARTON, 1950), *Manihot* (MAGOON *et alii*, 1969), *Medicago* (CLEMENT & STANFORD, 1963; BUSS & CLEVELAND, 1968; HO & KASHA, 1972), *Pennisetum* (PANTULU, 1967; VENKASTERWARALU & PANTULU, 1968; LOBANA & GRILL, 1973), *Pha-*

seolus (KRISHNAN & DE, 1965; DE & KRISHNAN, 1966a; DANA, 1966) *Physalis* (VENKASTERWARALU & RAO, 1977, 1979a e 1979b), *Plantago* (HYDE, 1953), *Prunus* (JELENKOVIC & HARRINGTON, 1972), *Ricinus* (JACOB, 1956; JELENKOVIC & HARRINGTON, 1973; PARIS *et alii*, 1978), *Rubus* (BAMMI, 1965), *Solanum* (HAYNES, 1964, YEH & PELOQUIN, 1965b; LAM & ERICKSON, 1968; MARKS, 1969; VENKASTERWARALU & BRIRAVAMURTY, 1969; BHIRAVAMURTY, 1975) e outros gêneros.

Em contraste a este tipo de padrão há aquele denominado de padrão com distribuição não proximal de heterocromatina, no qual os segmentos heterocromáticos acham-se espalhados ao longo de todo o comprimento cromossômico e mais freqüentemente apresentam cromômeros diferenciais ao longo do cromossomo ou delimitando suas partes terminais. Neste último padrão as cromátides são observadas de modo distinto.

O padrão de distribuição não proximal tem sido observado em gêneros como: *Cynodon* (OURENCHY, 1963; BRILMAN *et alii*, 1982); *Dichanthium* (ROY *et alii*, 1965), *Mnesithea* (ROY & SINGH, 1958), *Zea* (McCLINTOCK, 1929) e *Saintpaulia* (ERLICH, 1958). Adicionalmente a esses dois padrões, considerados extremos, alguns gêneros como *Agapanthus* (LIMA DE FARIA, 1954), *Hordeum* (SARVELLA *et alii*, 1958) e *Secale* (LIMA DE FARIA, 1952) exibem cromossomos que apresentam um padrão de distribuição de heterocromatina considerado intermediário.

Os cromossomos nucleolares das plantas de *Coffea* analisados, contendo uma série de características como: as duas cromátides sempre unidas, constituindo um fio; cromômeros mais ou menos evidentes e todos geralmente mais próximos ao centrômero formando nesse local regiões heterocromáticas; centrômero conspicuo, destacando-se como uma região eucromática; e braços (com exceção daqueles portando as regiões nucleolares) com extremidade acromáticas alongadas e de difícil percepção, podem ser incorporados na categoria daqueles que apresentam uma distribuição proximal de heterocromatina.

No geral, também foi constatado que os cromossomos nucleolares, dessas plantas de *Coffea*, exibem alguns aspectos em comum, principalmente quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina, localização da região formadora do nucléolo no braço menor, e a constituição e a posição do centrômero.

Além desses aspectos em comum, algumas plantas de espécies distintas morfologicamente mostraram bivalentes nucleolares cujos braços cromossômicos exibiam morfologia praticamente idênticas. Um exemplo é o braço maior dos bivalentes nucleolares de *C. canephora* e *C. congensis* que, embora possuam diferentes comprimentos, exibem o mesmo número e o mesmo padrão de distribuição de cromômeros como pode ser verificado na Figura 3, pág. 47, desenhos D, E, F; Figura 9, pág. 53, esquema D, para *C. congensis*; na Figura 3, pág. 47, desenhos G, H, I, J; Figura 9, pág. 53, esquema C, para *C. canephora*.

De maneira geral as semelhanças entre os cromossomos de espécies de *Coffea* também foram observadas por outros pesquisadores interessados na filogenia do gênero, como BOUHARMONT (1959) que encontrou alto grau de similaridade entre os cariótipos somáticos em várias espécies do gênero por ele estudadas. MEDINA (1972) encontrou, em uma quantidade razoável de células, formação de bivalentes tanto em híbridos de espécies morfologicamente mais semelhantes como em híbridos de espécies mais distintas. Essa afinidade entre as espécies foi observada não somente através de análises citogenéticas, mas também através de estudos filogenéticos baseados na análise bioquímica de flavonóides em frutos de café, feitos por LONGO (1972). Houve inclusive bastante coincidência, nesse aspecto, nos resultados obtidos por essa autora com os resultados deste trabalho com referência à proximidade entre as espécies *C. congensis* e *C. canephora*.

Do mesmo modo as plantas das espécies *C. deweyrei* e *C. eugenoides*, apesar de pertencerem às diferentes subseções *Pachycoffea* e *Erythrocoffea* respectivamente, e apresentarem grandes diferenças morfológicas bem como uma distribuição geográfica distinta (Figura 1, pág. 29), mostraram grande semelhança na estrutura do braço menor entre seus bivalentes nucleolares, inclusive na região

de inserção do nucléolo (Figura 2, pág. 46, desenhos H, I, J; Figura 9, pág. 53, esquema E, para *C. eugenioides*; Figura 3, pág. 47, desenhos A, B, C; Figura 9, pág. 53, esquema F, para *C. dewevrei*).

Esta semelhança é interessante, pois, de cruzamentos feitos por CARVALHO & MÔNACO (1967) entre diferentes espécies dessas duas subseções, o híbrido entre *C. eugenioides* e *C. dewevrei* foi um dos que obtiveram maior sucesso. Da mesma forma REDDY & NARAYAN (1981) verificaram que o comportamento meiótico de progênes híbridas dessas duas espécies revelava alta afinidade cromossômica embora apresentassem baixa fertilidade.

Em contraste a esses casos de semelhança entre regiões de alguns cromossomos houve também casos de singularidade, onde características marcantes tornaram alguns cromossomos nucleolares mais destacáveis e permitiram sua pronta identificação. Neste aspecto, o cromossomo nucleolar da planta de *C. kapakata*, por exemplo, embora exibindo aquelas características em comum com os das demais plantas de outras espécies, mostrou um cromômero diferencial na parte terminal de seu braço maior que o caracteriza (Figura 2, pág. 46, desenhos D, E, F; Figura 9, pág. 53, esquema B; Figura 7, pág. 51, fotomicrografia 2 e interpretação 2A). A propósito sabe-se que esta espécie foi primeiramente descrita como *Coffea kapakata* Hirsch., subseção *Mozambicoffea*, sendo posteriormente transferida por CHEVALIER (1947) para outro gênero próximo de *Coffea*, o gênero *Psilanthopsis*. BOUHARMONT (1959) também apoiou tal classificação baseado em suposta observação de número e morfologia cromossômicas diferentes das demais espécies de *Coffea* por ele analisadas. Entretanto, estudos posteriores desse autor (BOUHARMONT, 1963) revelaram que a espécie anteriormente analisada não se tratava de *C. kapakata*, sendo que tal espécie realmente possuía o mesmo número básico das demais espécies de *Coffea*. Mais tarde CARVALHO & MÔNACO (1959), baseados principalmente na observação de cruzamentos bem sucedidos entre essa espécie e várias outras do gênero *Coffea*, inclusive *C. arabica*, propuseram sua reversão definitiva para o gênero *Coffea*. Deve ser ressaltado que também LONGO (1972), através de análise bio-

química de flavonóides, destacou a alta afinidade de *C. kapakata* às demais espécies de *Coffea* e assim concordou com o fato desta espécie estar bem colocada dentro do gênero *Coffea*.

Independentemente do que foi analisado anteriormente, os resultados aqui obtidos quanto à semelhança da morfologia geral em paquíteno, tanto do cromossomo nucleolar de *C. kapakata* bem como dos demais cromossomos integrantes de seu complemento (dados ainda não publicados) comparativamente às demais espécies de *Coffea*, parecem confirmar a proposição de CARVALHO & MÔNACO (1959) de mantê-la no gênero *Coffea*.

Não sendo também uma exceção quanto ao padrão básico dos cromossomos nucleolares de *Coffea*, inclusive com seu braço menor semelhante ao do bivalente nucleolar da espécie *C. eugenioides*, o bivalente nucleolar de *C. dewevrei* destacou-se dos demais pela presença de uma disposição de cromossomos em gradiente mais acentuada que nos outros cromossomos analisados. Esta disposição é mais facilmente evidenciada no braço maior desse cromossomo, pois no braço menor, a presença da região organizadora do nucléolo interrompe esse gradiente. No entanto, justamente devido a ocorrência desse gradiente, a região de transição entre as regiões heterocromática e eucromática, no caso do braço maior deste cromossomo, torna-se um local de difícil contagem e diferenciação de pequenos cromômeros nela existentes (Figura 3, pág. 47, desenhos A, B e C; Figura 9, pág. 53, esquema F). A disposição de cromômeros em gradiente pode se converter, de certa forma, numa característica útil quando de eventuais determinações de inversões e translocações, as quais seriam facilmente notadas neste tipo de padrão cromomérico, quando da comparação entre complementos normais e aqueles com translocações, como foi ressaltado por LIMA DE FARIA & SARVELLA (1962) em análise de gradiente em cromossomos de *Zea*, *Solanum* e *Salvia*.

Já o cromossomo de *C. liberica*, caracterizou-se por apresentar na região de inserção nucleolar um macrosatélite em contraste com os microsátélites dos bivalentes nucleolares de todas as demais espécies. Ainda, com relação ao

local de inserção nucleolar, essa espécie difere das demais, pois, é possível supor que tal local aqui seja mais subterminal enquanto que, em todas as outras seja terminal; isto devido ao aspecto variado que assumiu a massa heterocromática terminal, considerada como o macrosatélite nas diversas células analisadas (Figura 2, pág. 46, desenho A, B e C; Figura 9, pág. 53, esquema A; Figura 7, pág. 51, fotomicrografia 1 e interpretação 1A). A respeito dos cromossomos nucleolares das plantas de *C. dewevrei* e *C. liberica*, os resultados obtidos de certa forma contêm dados anteriores (LEBRUN, 1941; CARVALHO & MÔNACO, 1967; LONGO, 1972; MEDINA, 1972) que indicaram tais espécies como sendo bastante próximas e que inclusive talvez nem representem espécies diferentes, mas apenas ecótipos distintos. Isto porque, embora pertençam à mesma subseção *Pachycoffea*, comparativamente diferem em seus cromossomos nucleolares quanto à morfologia em paquíteno e comprimento dos mesmos (Tabela 2, pág. 54). Em estudos mais recentes, envolvendo análise de DNA mitocondrial (BERTHOU *et alii*, 1982), também foi constatado que são espécies distintas.

Além desses contrastes verificados no tamanho dos satélites entre as espécies, alguns cromossomos mostraram outras diferenças nesta região pela maneira de como tais satélites mais comumente se apresentaram. Isto porque, em algumas espécies, os dois satélites dos bivalentes apareceram constantemente pareados como em *C. congensis*, *C. liberica* e *C. kapakata*, e na maioria delas estes mostraram-se com pareamento inconstante; ora pareados, ora não. Essa diversidade de aspectos morfológicos observados nos satélites e na região organizadora do nucléolo dos cromossomos nucleolares de *Coffea* vêm confirmar o destaque feito por BOUHARMONT (1959) sobre as diferenças morfológicas interespecíficas nessa região, nas várias espécies de *Coffea* por ele analisadas.

É interessante ressaltar que os dados aqui obtidos, quanto às similaridades e singularidades entre os cromossomos nucleolares devem ser encarados como informações isoladas para essas plantas analisadas e que as comparações feitas talvez possam ou não ser conclusivas para as espécies em questão, ficando

estas dependentes de posteriores estudos complementares. Assim, as relações de afinidade aqui estabelecidas não devem ser generalizadas para a espécie no sentido mais amplo, mas apenas para as plantas das espécies estudadas.

A princípio, parece que também a morfologia dos dois bivalentes da planta, representante da única espécie do gênero, *C. arabica* não é uma exceção à regra quanto àquela encontrada nos cromossomos nucleolares das demais espécies analisadas. Entretanto, não é possível tal afirmação, principalmente quanto ao cromossomo nucleolar denominado II, devido à dificuldade encontrada na localização do centrômero desse cromossomo. Deve ser ressaltado que a falta de localização do centrômero desse bivalente II deveu-se não só ao maior número de cromossomos nas células dessa espécie tetraplóide que dificultou a obtenção de um maior número de cromossomos nucleolares isolados, mas primordialmente ao aspecto desse cromossomo nas células analisadas, desde que não exibiu segmentos eucromáticos com características centroméricas, bem como tamanho e posição comum à maioria dos cromossomos nucleolares das plantas das outras espécies de *Coffea* analisadas, inclusive, também ao bivalente nucleolar I de *C. arabica*.

Assim, a dificuldade na localização do centrômero desse cromossomo II permite efetuar duas suposições a respeito da morfologia desse cromossomo, que se excluem.

Supondo primeiramente que, o centrômero desse cromossomo nucleolar II localize-se mais ou menos numa posição submetacêntrica, a mais comum dentre os outros cromossomos analisados, então deve possuir uma extensão menor e um aspecto diferente daqueles das demais espécies. Neste caso, poder-se-ia considerar os dois bivalentes nucleolares dessa planta semelhantes entre si, pois, independente da posição do centrômero desse bivalente II, eles apresentam um número quase igual de cromômeros (maiores) e um comprimento total bastante próximo (Figura 9, pág. 53, esquema L, M; Tabela 2, pág. 54).

Numa segunda suposição, poderia ser considerado que, se o centrômero desse bivalente II possui uma estrutura eucromática em extensão semelhante a dos demais cromossomos nucleolares analisados, talvez então o mesmo possa estar localizado numa posição singular, ou seja, numa posição terminal junto ao satélite, confundindo-se com uma real(ou pretensa)constricção secundária. Esta segunda idéia baseia-se no fato de que neste cromossomo essa região próxima ao local de inserção do nucléolo é um dos poucos locais que apresenta segmentos eucromáticos mais evidentes e com aspecto mais ou menos semelhante ao dos centrômeros. Portanto, nesta segunda suposição os dois bivalentes nucleolares da planta *C. arabica* não poderiam ser considerados semelhantes entre si.

Sabe-se que os cromossomos nucleolares exercem funções específicas dentro de um determinado complemento e que, devido a isto torna-se característicos para cada espécie (por exemplo, em milho o cromossomo que organiza o nucléolo é o número seis e em tomate é o número dois). Esse aspecto também foi confirmado com relação à maioria das plantas de café analisadas, haja visto a constância na morfologia desses cromossomos para cada uma delas, com exceção de *C. stenophylla*.

Na planta de *C. arabica*, presumindo-se que os cromossomos nucleolares presentes também representem em parte os genomas que constituem essa planta tetraplóide, a confirmação de qualquer uma das suposições feitas a respeito da morfologia em paquíteno do bivalente II, levaria obviamente a duas considerações também diversas a respeito da possível constituição dessa planta alopoliplóide. Caso seja positiva a primeira delas, poderiam ser considerados como provavelmente semelhantes os dois genomas que constituem essa espécie, e que confirmaria dados obtidos por outros autores a respeito (KRUG & MENDES, 1940; MENDES & BACCHI, 1940; CHINNAPPA, 1968; GRASSIAS & KAMMACHER, 1975). Também a esse respeito, segundo CHARRIER (1978), seriam necessários para a origem alopoliplóide de *C. arabica*: 1) ou dois conjuntos cromossômicos bem mais diferenciados do que os encontrados tanto nas espécies da seção *Eucoffea* como da seção *Mascarocoffea*, pois,

estas espécies mostraram-se mais próximas entre si do que com *C. arabica*; 2) ou a intervenção de um sistema que favorecesse o comportamento dissômico verificado nessa espécie, no pressuposto de ter interferido no processo, duas espécies de qualquer uma das seções acima.

Ao estudar o comportamento meiótico de uma planta monossômica de *C. arabica*, originada do cruzamento de um cafeeiro *angustifolia* normal com outro irradiado, ambos com $2n = 44$, MARTINS & CRUZ (1981) verificaram algumas anormalidades como a formação de tetravalentes em paquíteno, diacinese e metáfase I, além da falta de pareamento em alguns segmentos de bivalentes em paquíteno. Estas observações inclusive parecem sugerir que pelo menos na planta analisada a irradiação ou teria interferido num suposto sistema genético que presumivelmente controle o pareamento, ou então, que o cromossomo ausente nessa planta monossômica talvez possa ser o portador de um gene ou genes responsáveis pela organização desse sistema que talvez favoreça o comportamento dissômico verificado em *C. arabica*.

No caso de uma afirmativa quanto à segunda suposição acerca da morfologia do bivalente nucleolar II da planta de *C. arabica* ter-se-ia um indício a mais sobre a condição alopoliplóide dessa planta e naturalmente a presença de genomas bem distintos no seu complemento.

Em ambos os casos fica claro que resta verificar ainda a morfologia em paquíteno não só do cromossomo nucleolar mas também do complemento integral de *C. arabica* e outras espécies diplóides do gênero como também espécies de gêneros próximos de *Coffea* com a finalidade de se esclarecer as possíveis espécies parentais de *C. arabica*.

Nesse sentido, tentando fazer uma comparação baseada no padrão cromômérico dos dois cromossomos nucleolares de *C. arabica* com os das demais espécies diplóides parece claro que o bivalente nucleolar I aproxima-se mais, no aspecto geral, aos cromossomos nucleolares de *C. eugenioides* e de *C. deweyi* (no-

ta-se que estes últimos também têm um braço bastante semelhante) e inclusive aproximam-se no comprimento total (Tabela 2, pág. 54).

O bivalente nucleolar II da planta *C. arabica*, embora sem o centrômero determinado, quando comparado com os cromossomos nucleolares das demais espécies, apresenta apenas uma simplicidade de padrão cromomérico (não a disposição de cromômeros) comparável somente à simplicidade de padrão dos bivalentes nucleolares II das plantas de *C. salvatrix* e *C. racemosa*. Este fato por sua vez, mostrou um ponto em comum às plantas que possuem dois cromossomos nucleolares. Essas três plantas, *C. arabica*, *C. salvatrix* e *C. racemosa* apresentam o segundo cromossomo nucleolar, no caso denominados II, com padrões cromoméricos mais simples, comparativamente aos padrões dos outros cromossomos nucleolares denominados I, dessas mesmas plantas e aos padrões dos outros cromossomos nucleolares das demais plantas de outras espécies (Figura 9, pág. 53, esquemas H, J e M para os cromossomos nucleolares II de *C. salvatrix*, *C. racemosa* e *C. arabica*, respectivamente).

Restritas na sua maioria apenas às espécies da seção *Eucoffea*, a maioria das pesquisas efetuadas com o intento de procurar esclarecer alguns aspectos das relações filogenéticas no gênero (THOMAS, 1944; CRAMER, 1957; Narasimharaswamy & Vishveswara, 1961 *apud* CARVALHO & MÔNACO, 1967; CARVALHO & MÔNACO, 1967; LONGO, 1972; BERTHOU *et alii*, 1980; HÖFLING & OLIVEIRA, 1981), tem sido unânime em seus resultados a indicar *C. eugenioides* como uma das espécies mais próximas a *C. arabica* e um dos mais prováveis ancestrais dessa espécie. Já a indicação de uma segunda espécie como provável ancestral tem variado, de acordo com o tipo de pesquisa que tem sido utilizada, entre *C. canephora*, *C. liberica* e *C. congensis*, não existindo assim um consenso comparável àquele para *C. eugenioides* e *C. arabica*.

Embora as informações aqui obtidas possam ser consideradas insuficientes, haja visto terem sido obtidas a partir de uma única planta, este fato

tem interesse, pois, em relação ao trabalho aqui desenvolvido houve coincidência de resultados, também quanto a uma maior afinidade entre *C. eugenioides* e *C. arabica*.

Os dados aqui obtidos podem não ser considerados, tão importantes a ponto de solucionar a questão da especiação do gênero *Coffea* e a origem *C. arabica*, pois, de certa forma consistiu até certo ponto em uma pesquisa metodológica, mas constituem-se num esclarecimento adicional aos demais existentes e talvez sirva como estímulo para que outras pesquisas sejam feitas em paquíteno no gênero.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

Através da análise morfológica dos cromossomos nucleolares na fase meiótica de paquíteno, em dez espécies do gênero *Coffea* L. introduzidas no Brasil, tentou-se inicialmente: 1) verificar se a morfologia destes cromossomos diferiam entre as espécies e se eram constantes nas diversas células analisadas; 2) obter algumas informações que subsidiassem esclarecimentos acerca da especiação nesse gênero, com ênfase na origem da única espécie tetraplóide, *C. arabica*.

Dos resultados obtidos da análise do número de nucléolos, do número de cromossomos obtidos da análise do padrão cromomérico, da medida do comprimento total e da proporção de braços desses cromossomos nucleolares, foi possível concluir o seguinte:

7.1. O número de dois cromossomos nucleolares observados para o complemento das plantas *C. racemosa* e *C. salvatrix* não corresponde à condição diplóide das mesmas.

7.2. O número de dois cromossomos nucleolares observados para o complemento da planta representante da espécie tetraplóide *C. arabica* corresponde de certa forma a sua condição poliplóide.

7.3. A falta de correspondência entre o número de cromossomos nucleolares e o número de nucléolos nas plantas das espécies *C. arabica*, *C. salvatrix*, *C. racemosa* e *C. stenophylla* sugere a ocorrência de fusão entre nucléolos, provavelmente numa fase anterior à fase de paquíteno.

7.4. O número constante de dois cromossomos nucleolares comuns às plantas de *C. racemosa* e *C. salvatrix*, aliado a distribuição geográfica e algumas outras características comuns entre essas duas espécies, talvez possa indi-

car maior proximidade filogenética entre elas, o que concorda com a classificação atual de ambas na subseção *Mozambicoffea*.

7.5. A grande variação no número e na morfologia dos cromossomos ligados ao nucléolo na planta de *C. stenophylla* sugere a ocorrência de alguma anormalidade relacionada com a região organizadora do nucléolo no(s) cromossomo(s) nucleolar(es) dessa planta.

7.6. A ausência de concordância entre resultados anteriores e os aqui obtidos quanto ao número de cromossomos nucleolares em *C. arabica*, aliado ao fato de ser esta espécie considerada um alopóliploide, induziu ao questionamento sobre a possibilidade de estar ou não ocorrendo a supressão da região organizadora de algum cromossomo nucleolar adicional, além dos dois observados.

7.7. Os resultados obtidos quanto ao padrão cromomérico e/ou da distribuição da heterocromatina dos cromossomos nucleolares dessas plantas do gênero *Coffea* L. permite incorporá-los na categoria daqueles que apresentam um padrão de distribuição proximal de heterocromatina.

7.8. Baseados na morfologia dos cromossomos nucleolares, as maiores afinidades foram registradas entre as plantas de: 1) *C. canephora* e *C. congensis*, que apresentam o braço maior de seus cromossomos nucleolares com uma morfologia comum; b) *C. eugenioides* e *C. dewevrei*, que apresentam o braço curto de seus cromossomos nucleolares com alto grau de semelhança.

7.9. A proximidade morfológica do cromossomo nucleolar da planta de *C. kapakata* com os das demais plantas das outras espécies desse gênero, reforça a proposta de considerá-la como pertencente ao gênero *Coffea*.

7.10. A falta da localização do centrômero de um dos dois bivalentes nucleolares da planta de *C. arabica*, o bivalente II, permite apenas duas suposições a respeito da morfologia desse cromossomo, cuja confirmação implica em duas considerações a respeito dos genomas que constituem essa espécie, ou seja, a possibilidade de uma maior ou menor semelhança entre esses genomas.

7.11. Comparando o padrão cromomérico dos dois cromossomos nucleolares de *C. arabica* com os das espécies diplóides analisadas, o bivalente nuclear I mostrou-se próximo, no aspecto geral, aos cromossomos nucleolares da planta de *C. eugenioides* e *C. dewevrei*; o que com relação a *C. eugenioides*, concorda com uma unanimidade de estudos filogenéticos, quanto a uma maior afinidade entre *C. arabica* e essa espécie em detrimento a outras espécies diplóides.

8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

An attempt has been made to shed some light on the problems of speciation in the genus *Coffea*, with particular emphasis on the only tetraploid species *C. arabica*, by means of comparative morphological analyses of the nucleolar chromosomes at pachytene stage of meiosis in 10 species of the genus introduced in Brazil.

From analyses of the number of nucleoli, number of nucleolar chromosomes, chromomeric patterns, and total length and arm ratios of these nucleolar chromosomes, it was possible to make the following conclusions:

8.1. The number of nucleolar chromosomes observed for *C. racemosa* and *C. salvatrix*, does not correlate with the diploid condition of these species.

8.2. The number of nucleolar chromosomes observed in the tetraploid species, *C. arabica* does correspond to its polyploid condition.

8.3. The lack of correspondence between the number of nucleolar chromosomes and the number of nucleoli in the species *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. arabica* and *C. stenophylla* may be due to fusion between nucleoli, probably in some phase before pachytene stage.

8.4. The presence of the same number of nucleolar chromosomes in *C. racemosa* and *C. salvatrix* correlates with existing data on showed morphological characters and with isolated geographical distribution, and supports the separation of these two species in subsection *Mozambicooffea*.

8.5. The great variation in the number and form of the chromosomes attached to the nucleoli in *C. stenophylla* suggests the occurrence of some abnormality related to the nucleolar-organizing region(s) of the nucleolar chromosome(s) of this species.

8.6. The absence of an agreement between earlier results and the results in the present study concerning the chromosomes in *C. arabica*, together with the fact that *C. arabica* is considered to be an allopolyploid, taken raises the possibility that suppression of a nucleolar-organizing region additional to the two observed may occur in this species.

8.7. The analysis of chromomeric pattern and/or heterochromatic distribution in the nucleolar chromosomes of these ten species of the *Coffea* L., indicates that they are all of the type with a proximal distribution pattern of the heterochromatin.

8.8. Based on nucleolar chromosomes morphology, the greatest affinities were verified between: a) *C. canephora* and *C. congensis* which present the long arm of their nucleolar chromosomes with a common morphology; b) *C. eugenioides* and *C. dewevrei* which present the short arm of their nucleolar chromosomes with high degree of resemblance.

8.9. The morphological similarity between the nucleolar chromosome of the species *C. kapakata* with those of other species of this genus reinforces the suggestion by recent authors that it should be neared as a member of the genus *Coffea* rather than the genus *Psilanthopsis*.

8.10. The absence of a centromere localization of one of the two nucleolar bivalents of *C. arabica*, the bivalent II, makes possible only two suppositions about the morphology of this chromosome, and the confirmation of

which implies two considerations about the genomes that composes this species, what is, the possibility of a major or a minor similarity between these genomes.

8.11. Comparing the chromomeric pattern of the two nucleolar chromosomes of *C. arabica* with that of the other diploid species analised, the nucleolar bivalent I shows some proximity, in general morphology, to the nucleolar chromosomes of the *C. eugenioides* and *C. deweyrei*, thus, in respect to *C. eugenioi*des, this agrees with other phylogenetic studies, in regard to a major affinity between *C. arabica* and this species in detriment to the other diploid species.

8. BIBLIOGRAFIA

- ARORA, C.P. (1978): Chromosomal differentiation in *Verbena* species. Cytologia 43(3-4):525-531.
- ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. (1977): The nucleolar cycle in man. J. Cell. Sci. 25: :103-110.
- BAMMI, R.K. (1965): Cytogenetics of *Rubus* IV. Pachytene morphology of *Rubus parvifolius* L. chromosome complement. Can. J. Genet. Cytol. 7:254-258.
- BARTON, D.W. (1950): Pachytene morphology in the tomato chromosome complement. Am. J. Bot. 37:639-643.
- BERTHOU, P.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F.; QUETIER, F. (1980): Analyse en électrophorese du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans 18 populations sauvages: variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. Café Cacao Thé XXIV(4):313-326.
- _____ ; VEDEL, F.; MATHIEU, C. (1982): Variations dans le structures de l'ADN des organites cellulaires chez les principales espèces du genre *Coffea*. Resumos do X Colóquio Científico Internacional Sobre o Café. (11-14 out. 1982) Salvador, Bahia - Brasil. ASIC.pp.67-68.
- BHIRAVAMURTY, P.V. (1975): Pachytene chromosome morphology of *Solanum modiflorum* Jacq. Caryologia 28(3):287-294.
- BICUDO, H.E.M. de (1982): Silver staining and the nucleolar organizing activity in *Drosophila* species of the *Mulleri* complex and their hybrids. Rev. Bras. Genet. V(1):31-50.
- BOLKHOUSKIKH, Z.; GRIF, V.; MATVEJEVA, T.; ZAKHARYEVA, O. (1969): Chromosome number of flowering plants. Academy of Sciences of the USSR V.L. Komarov Botanical Institute. Ed. An. A. Federov.

- BOUGOURD, S.M.; PARKER, J.S. (1976): Nucleolar organizer polymorphism in natural populations of *Allium schoenoprasum*. Chromosoma 56:301-307.
- BOUHARMONT, J. (1959): Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre Coffea. Bruxelles, Institut Nationale pour l'Etude Agronomique du Congo, Belge, 94p. (série scientifique nº 77).
- _____ (1963): Somatic chromosomes of some *Coffea* species. Euphytica 12:254-257.
- BRILMAN, L.A.; KEEBONE, W.B.; ENDRIZZI, J.E. (1982): Pachytene morphology of diploid *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Cytologia 47(1):171-181.
- BROWN, S.W. (1949): The structure and meiotic behaviour of the differentiated chromosomes of tomato. Genetics 34:437-461.
- BURNHAN, C.R. (1962): Discussions in cytogenetics. Burgess Publishing Company, Minneapolis 15, Minnesota.
- BUSEY, P. (1971): *Sorghum* pachytene karyotypes. Ann. Mo. Bot. Gard. 58(2):245-257.
- BUSH, H.; SMETANA, K. (1970): The nucleolus. New York, Academic Press.
- BUSS, G.H.; CLEVELAND, R.W. (1968): Pachytene chromosomes of diploid *Medicago sativa* L. Crop Sci. 8:744-747.
- CARVALHO, A. (1946): Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *arabica*. Separata dos Boletins da Superintendência dos Serviços do Café, nºs 226 a 230, dos meses de dezembro de 1945 a abril de 1946.
- _____ (1952): Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI. Caracteres morfológicos dos haplóides. Bragantia 12:201-212.
- _____ ; MÔNACO, L.C. (1959): Híbridos entre *Coffea* e *Psilantropsis*. Bragantia 18:21-29.

- CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. (1967): Genetic relationships of selected species of coffee. Cienc. Cult. 19:151-165.
- _____ ; FERWERDA, F.P.; FRAHRN-LELEIVELD, J.A.; MEDINA, D.M.; MENDES, A.J. T.; MÔNACO, L.C. (1969): Coffee: *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. In: FERWERDA, F.P. & WIT, F. (Eds) - Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics. Misc. Paper 4 Landbouwhogeschool, Wageningen, Netherlands, pp. 189-241.
- CASPERSON, T.; ZECH, L.; MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; WAGH, U.; SIMONSSON, E. (1969): DNA - Binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. Exp. Cell. Res. 58:141-152.
- CHARRIER, A. (1978): La structure genétique des caféiers spontanés de la Région Malgache, (*Masearocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africains (*Eucoffea*). Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer. Memōires Orstom n° 87, 221p.
- CHEVALIER, A. (1942): Les caféiers du globe. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. Encycl. Biol., P. Lechevalier, Paris, 36p., 158 pl.
- _____ (1947): Les caféiers du globe. III. Systematique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insects nuisibles. Encyc. Biol. XXVIII, fasc. III, P. Lechevalier, Paris, 356p.
- CHINNAPPA, C.C. (1968): Interspecific hybrids of *C. canephora* and *C. arabica*. Curr. Sci. 37(23):676-677.
- _____ (1981): Palynology and systematics of the genus *Coffea*. J. Coffee Res. 11(3):55-69.
- CHU, Y.E. (1967): Pachytene analysis and observations of chromosome association in haploid rice. Cytologia 32(1):87-95.

- CLEMENT, W.M.; STANFORD, E.H. (1963): Pachytene studies at the diploid level in *Medicago*. Crop Sci. 3:147-150.
- CONAGIN, C.H.T.M. (1961): Microsporogênese, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congensis* Froehner. Bragantia 20(27):669-677.
- _____ ; MENDES, A.J.T. (1961): Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia 20(34):787-804.
- CRAMER, P.J.S. (1937): Review of literature of coffee research in Indonésia. Turrialba (Costa Rica). Interamerican Institute of Agricultural Sciences 262p. (miscellaneous publ. nº 15).
- CROSBY, A.R. (1957): Nucleolar activity of lagging chromosomes in wheat. Am. J. Bot. 44:313.
- CRUZ, N.D. da (1972): Aneuplóides de café - aspectos morfológicos e citológicos na análise de duas progênies de café "Mundo Novo" (*Coffea arabica*). Tese de doutoramento apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", USP, Piracicaba.
- DANA, S. (1966): Chromosome differentiation in tetraploid *Phaseolus* species and *P. ricciardianus*. The Nucleus 9(1):97-101.
- DE, D.N.; KRISHNAN, R. (1966a): Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus mungo*. Genetica 37:581-587.
- _____ ; _____ (1966b): Cytological studies of the hybrid *Phaseolus aureus* x *P. mungo*. Genetica 37:588-600.
- DE WET, J.M.J. (1953): Nucleoli numbers in *Danthonia* polyploids. Cytologia 18: 229-234.
- ERLICH, H.G. (1958): Cytological studies in *Saintpaulia* Wendl. Amer. J. Bot. 45: 177-182.

- FAGERLIND, F. (1937): Embryologische, zytologische, und bestäubungsexperimentelle studien in der familie Rubiaceae nebst bemerkungen über einige polyploiditäts probleme. Acta Horti Bergiani. Band II. n^o 9:195-470.
- FARAH, S.B. (1982): Organizadores nucleolares e alterações cromossômicas na espécie humana. Cienc. Cult. 34(4):474-477.
- FERNIE, L.M. (1966): Impression on coffee in Ethiopia. Kenya Coffee 31:115-121.
- FERWERDA, F.P. (1976): Coffees. In: SIMMONDS, N.W. ed. - Evolution of Crop Plants. London - New York, Longman Group Limited, C.75, pp. 252-260.
- FLAVELL, R.B.; O'DELL, M. (1979): The genetic control of nucleolus formation in wheat. Chromosoma 71(2):135
- GANI, R. (1978): Nucleoli of cultured human lymphocyte II. Nucleolar fusion and its relation to acrocentric association. Human Genet. 42:271-282.
- GARBER, E.D. (1947): The pachytene chromosomes of *Sorghum intrans*. J. Hered. 38:251-252.
- GATES, R.R. (1937): The discovery of the relation between the nucleolus and the chromosomes. Cytologia, Fujii, Vol. Jubilaei:977-986.
- _____ (1942): Nucleoli and related nuclear structures. Bot. Rev. 8(6):337-409.
- GILLIES, C.B. (1968): The pachytene chromosomes of a diploid *Medicago sativa*. Can. J. Genet. Cytol. 10:788-793.
- _____ (1970a): Alfafa chromosomes I. Pachytene karyotype of diploid *Medicago falcata* L. and its relationship to *Medicago sativa* L. Crop Sci. 10:169.
- _____ (1970b): Alfafa chromosomes II. Pachytene karyotype of tetraploid *Medicago sativa* L. Crop Sci. 10:172-175.

- GILLIES, C.B. (1971): Alfafa chromosomes III. *Medicago glomerata* Balb. Pachytene karyotype. Crop. Sci. 11:463-464.
- _____ (1972a): Pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species I. Species closely related to *M. sativa*. Hereditas 72:277-288.
- _____ (1972b): The pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species II. Distantly related species whose karyotypes resemble *M. sativa*. Hereditas 72(2):289-302.
- _____ (1972c): Pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species III. Unique karyotypes of *M. hybrida* Trautv. and *M. subfruticosa* Ramond. Hereditas 72: :303-310.
- GOTTSCHALK, W. (1951): Untersuchungen am pachytän normaler und röntgenbestrahlter pollen mutter zellen von *Solanum lycopersicum*. Chromosoma 4:298-341.
- _____ (1954): Die chromosomenstruktur der solanaceen unter berücksichtigung phylogenetischer fragestellungen. Chromosoma 6:539-626.
- GRASSIAS, M.; KAMMACHER, P (1975): Observation sur la conjugation chromosomique de *Coffea arabica* L. Café, Cacao, Thé XIX(3):177-190.
- GUPTA, R.; GUPTA, P.K. (1978): Pachytene karyotypes in the genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). Cytologia 43:655-663.
- HAYNES Jr.; F.L. (1964): Pachytene chromosomes of *Solanum canaense*. J. Hered. 55:168-173.
- HEITZ, E. (1931): Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nukleolen. Planta 12:775-844.
- HO, K.M.; KASHA, K.J. (1972): Chromosome homology at pachytene in diploid *Medicago sativa*, *M. falcata* and their hybrids. Can. J. Genet. Cytol. 14:829-838.

- HÖFFLING, J.F.; OLIVEIRA, A.R. (1981): A serological investigation of some *Coffea* species with emphasis on the origin of *C. arabica* L. Cienc. Cult. 33(1):66-72.
- HONJO, T.; REEDER, R.H. (1973): Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *X. laevis* and *X. mulleri*. J. Mol. Biol. 80:217-228.
- HSU, T.C. (1973): Longitudinal differentiation of chromosomes. Annu. Rev. Genet. 7:153-176.
- HYDE, B.B. (1953): Differentiated chromosomes in *Plantago ovata*. Am. J. Bot. 40:809-815.
- JACOB, K.M. (1956): The pachytene chromosomes of the castor oil plant. Cytologia 21:76-80.
- JAIN, H.K. (1957): Effect of high temperature on meiosis in *Lolium*: Nucleolar inactivation. Heredity 11:23-36.
- JELENKOVIC, G.; HARRINGTON, E. (1972): Morphology of the pachytene chromosomes in *Prunus persica*. Can. J. Genet. Cytol. 14:317-324.
- _____ ; _____ (1973): Chromosome complement of *Ricinus communis* at pachytene and early diplotene. J. Hered. 64:137-142.
- JORDAN, E.G.; LUCK, B.T. (1976): The nucleolus organizer and sinaptonemal complex in *Endymion non-scriptus* (L.). J. Cell. Sci. 22:75-86.
- JOTTERAND, M.; FISCHBERG, M. (1974): A chromosome mutation affecting the number of nucleoli in *Xenopus borealis* Parker. Experientia 30:1003-1005.
- KAMALA, T. (1976): Nucleolus organising chromosomes in *Brassica* and their bearing on the phylogeny of the genus. Cytologia 41:615-620.
- KASHA, K.J.; SADASIVAIAH, R.S. (1971): Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. Chromosoma 35:264-287.

- KEEP, E. (1962): Satellite and nucleolar number in hybrids between *Ribes nigrum* and *R. grossularia* and their backcrosses. Can. J. Genet. Cytol. 4:206-218.
- _____ (1971): Nucleolar suppression, its inheritance and association with taxonomy and sex in genus *Ribes*. Heredity 26:443-452.
- KHUSH, G.S. (1963): Identification key for pachytene chromosomes of *L. esculentum*. Report of the Tomato Genetics Cooperative 13:12-13.
- _____ ; RICK, C.M. (1966): The origin identification and cytogenetics behaviour of tomato monosomics. Chromosoma 18:407-420.
- _____ ; _____ (1967a): Novel compensating trisomics of the tomato: cytogenetics, monosomic analysis and other applications. Genetics 56:297-307.
- _____ ; _____ (1967b): Tomato tertiary trisomics: origin, identification, morphology and use in determining position of centromeres and arm location of markers. Can. J. Genet. Cytol. 9:610-631.
- KOUL, A.K.; WAFAI, B.A. (1980): Chromosome polymorphism and nucleolar organization in some species of *Fritillaria* L. Cytologia 45(4):675-682.
- KRISHNAN, N.; DE, D.N. (1965): Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus aureus* Roxb. The Nucleus 8:7-16.
- _____ ; _____ (1968): Suppression of nucleolus organizer in *Phaseolus*. The Nucleus: 11(2):155-159.
- _____ ; _____ (1970): Pachytene chromosomes and origin of a tetraploid species of *Phaseolus*. Cytologia 35:501-512.
- _____ ; MAGOON, M.L.; BAI, V.K. (1969): The pachytene of *Ipomoea crassicaulis*. Theor. Appl. Genet. 39:274-279.
- KRUG, C.A. (1934): Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea* L. Bol. Inst. Agron. nº 11.

- KRUG, C.A. (1936): Estudos citológicos em *Coffea* II. Bol. Inst. Agron. nº 22.
- _____ ; CARVALHO, A. (1951): The genetics of *Coffea*. Adv. Genet. 4:127-158.
- _____ ; MENDES, A.J.T. (1940): Cytological observations in *Coffea* IV. J. Genet. XXXIX(2):189-203.
- _____ ; _____ (1943): Conhecimentos gerais sobre a genética e a citologia do gênero *Coffea*. Rev. Agric. (Piracicaba) 18:399-408.
- LAM, S.L.; ERICKSON, M.T. (1968): Pachytene chromosomes of *Solanum chacoense*. J. Hered. 59:369-377.
- LEBRUN, J. (1941): Recherches morphologiques et systematique sur les caféiers du Congo. Institut Royal Colonial Belge, Bruxelles (Memoires-collection in - 89, t. XI, fasc. 3:1-183.
- LEROY, J.F. (1967a): Diagnose différentielle du genre *Paracoffea* Leroy. J. Agric. Trop. Bot. Appl. XIV(6-7):276.
- _____ (1967b): Recherches sur les caféiers. Sur la classification biologique des caféiers et sur l'origine et l'aire du genre *Coffea*. C. R. Acad. Sci., Paris, 265:1043-1045.
- _____ (1967c): Recherches sur les caféiers. Equisse d'une théorie sur l'évolution des espèces. C. R. Acad. Sci., Paris, 265:1373-1376.
- LESLEY, M.M.; LESLEY, J.M. (1935): Heteromorphic A chromosomes of the tomato differing in satellite size. Genetics 20:568-580.
- _____ (1938): The relation between satellite size and nucleolus size in three races of *Solanum lycopersicum*. Genetics 23:485-493.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDEBERG, A.A. (1964): Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201-220.

- LEVIN, D.A. (1973): Accessory nucleoli in microsporocytes of hybrid *Phlox*.
Chromosoma 41:413-420.
- LIMA DE FARIA, A. (1952): Chromosome analysis of chromosome complement of Rye.
Chromosoma 5:1-68.
- _____ (1954): Chromosome gradient and chromosome field in *Agapanthus*.
Chromosoma 6:330-370.
- _____ ; SARVELLA, P. (1962): Variation of the chromosome phenotype in *Zea*,
Solanum and *Salvia*. Chromosoma 13:300-314.
- LOBANA, K.S.; GRILL, B.S. (1973): Pachytene chromosomes of *Pennisetum typhoides*.
Cytologia 38:713-717.
- _____ ; ROSHAN, L.; GUPTA, M.L. (1972): Morphology of pachytene chromosomes in
Linum grandiflorum Desf. The Nucleus 15(2):167-170.
- LONGO, C.R.L. (1972): Estudos dos pigmentos flavonóides e sua contribuição à sua
contribuição à filogenia do gênero *Coffea*. Tese de doutoramento apresentada
à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", USP, Piracicaba.
- LONGWELL, A.C.; SVIHLA, G. (1960): Specific chromosomal control of the nucleolus
and of the cytoplasm in wheat. Exp. Cell. Res. 20:294-312.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAM, R.; BAI, K.V. (1969): Morphology of the pachytene
chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. Cytologia 34(4):612-626.
- _____ ; _____ ; _____ (1972): Pachytene karyology of *Ipomoea biloba*.
Cytologia 37(2):335-343.
- _____ ; SHAMBULINGAPPA, K.G. (1961): Karyomorphology of *Sorghum propinquum* and
its bearing on the origin of 40-chromosome *Sorghum*. Chromosoma 12:460-465.
- _____ ; TAYYAB, M.A.; SADASIVAIAH, R.S. (1967): The morphology of pachytene
chromosome of some *Eu-sorghums*. Jpn. J. Genet. 42(2):95-107.

- MARKS, G.E. (1957): The cytology of *Oxalis dispar*. Chromosoma 8:650-670.
- _____ (1969): The pachytene chromosomes of *Solanum elaeagnifolium*. Caryologia 22:161-168.
- MARTINS, E.R.F.; CRUZ, N.D. da (1981): Estudo do comportamento meiótico de uma planta monossômica de café, originada do cruzamento e um cafeeiro *angustifolia* normal com outro irradiado. Resumo do 19 Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo (SBSP), pg.12.
- McCLINTOCK, B. (1929): Chromosome morphology in *Zea mays*. Science (Wash, D.C.) 69:629-630.
- _____ (1934): The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. Zeits. Zelf. Mikrosk. Anat. 21:294-328.
- MEDINA, D.M. (1950): Observações citológicas em *Coffea* XIV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K.M.C. Bragantia 10(2):61-66.
- _____ (1952): Observações citológicas em *Coffea* XIX. Microsporogênese em *Coffea dewevrei*. Bragantia 12:153-162.
- _____ (1972): Caracterização de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Tese de doutoramento apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", USP, Piracicaba.
- _____; CONAGIN, C.H.T.M. (1959): Auto-incompatibilidade em *Coffea dewevrei* (De Wild et Th. Dur.). Bragantia 18:283-293.
- _____; _____; CRUZ, N.D. da (1977): Microsporogenesis in diploid species of *Coffea* L. Caryologia 30(1):13-25.
- _____; RIJO, L. (1969): Microsporogênese em *Coffea stenophylla* G. Don e *C. salvatrix* Swynn. et Phil. Bragantia 28(25):307-322.

- MENDES, A.J.T. (1938a): Os cromossomos das Rubiáceas. Bol. Inst. Agron. nº 55.
- _____ (1938b): Morfologia dos cromossômios de *Coffea excelsa*. Bol. Inst. Agron. nº 56.
- _____ (1950)¹: Observações citológicas em *Coffea* XV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. Bragantia 10:79-87.
- _____ (1958): Advances in coffee production technology. III. Cytology. Coffee and Tea Industries 81(11):37-42.
- _____ ; BACCHI, O. (1940): Observações citológicas em *Coffea* V. Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. Jornal de Agronomia 3(3):183-206.
- MENDES, C.H.T. (1949): Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. Bragantia 9:35-41.
- _____ (1950)²: Observações citológicas em *Coffea* XVI. Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia 10:97-104.
- MENZEL, M.Y. (1966): The pachytene chromosome complement of *Hibiscus cannabinus*. Cytologia 31:36-42.
- MISRA, R.N.; SHASTRY, S.V.S. (1967): Pachytene analysis in *Oryza* VIII. Chromosome morphology and karyotypic variations in *Oryza sativa*. Indian J. Genet. Plant Breed. 27:349.
- MOENS, P.B. (1964): A new interpretation of meiotic prophase in *Lycopersicon esculentum* (tomato). Chromosoma 15:231-242.
- MÔNACO, L.C. (1972): Incompatibilidade em *Coffea racemosa*. Cienc. Cult. 24:150.
- MORGAN Jr., D.T. (1971): Nucleolar number at premeiotic and mitosis interphase in Maize. Cytologia 36:669-673.
- NAVASHIN, M. (1933): Chromosome alterations caused by hybridization and their bearing upon genetic problems. Cytologia 5:169-203.

- NICOLOFF, H.; ANASTASSOVA-KRISTEVA, M.; KÜNZEL, G.; RIEGER, R. (1977): The behaviour of nucleolus organizers in structurally changed karyotypes of Barley. Chromosoma 62:103-109.
- OURENCHY, D.K. (1963): Pachytene chromosome morphology in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. The Nucleus 6(1):63-82.
- PANTULU, J.V. (1967): Pachytene pairing and meiosis in the F₁ hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. Cytologia 32:532-541.
- PARIS, H.S. (1981): Pachytene variations in *Ricinus*. Genetica 55(3):209.
- _____; SHIFRISS, O.; JELENKOVIC, G. (1978): Idiograms of *Ricinus communis* L. J. Hered. 69:191-196.
- _____; _____; _____ (1980): Nucleolar organizing chromosomes of *Ricinus*. Theor. Appl. Genet. 57(4):145-152.
- PERKINS, D.D.; RAJU, N.B.; BARRY, E.G. (1980): A chromosome rearrangement in *Neurospora* that produces viable progeny containing two nucleolus organizers. Chromosoma 76(3):255-276.
- REDDY, A.G.S.M.; NARAYAN, K.N. (1981): Meiosis in hybrids between tree coffee (*C. liberica*, *C. dewevrei*) and Nandi coffee (*C. eugenioides*). Genetica 55(2):123.
- RHOADES, M.M. (1961): The cell. vol. III, J. Brachet and A.E. Mirsky Ed. New York and London. Academic Press.
- ROY, R.F.; SINGH, A.P. (1958): Pachytene studies of *Mesithea perforata* (L.). Caryologia 11:34-41.
- _____; _____; KUMARI, S. (1965): Pachytene analysis in *Dichanthium* L. Chromosome morphology in *D. annulatum*. The Nucleus 8(2):137-148.

- SARVELLA, P.; HOLMGREN, J.B.; NILAN, R.A. (1958): Analysis of Barley pachytene chromosomes. The Nucleus 1:183-204.
- SATO, S.; OHTA, S.; KUROKI, Y. (1980): Heteromorphic appearance of acrocentric nucleolus organizer regions in *Nothoscordum fragrans*. Cytologia 45:87-96.
- SEN, S.K. (1963): Analysis of rice pachytene chromosomes. The Nucleus 6(2):107-120.
- SHARP, L.W. (1943): Fundamentals of cytology. MacGraw-Hill Book Company, Inc. New York & London, 270p.
- SILVA, H.L. (1956): Número de cromossômios em *Coffea racemosa* Lour. Bragantia 15 (Notas):XVII. Dez.
- STEBBINS, G.L. (1971): Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London. 216p.
- SWAMINATHAN, M.S.; MAGOON, M.L.; MEHRA, K.L. (1954): A simple propionocarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. Indian J. Genet. Plant Breed. 14:87-88.
- SWANSON, G.P. (1957): Cytology and cytogenetics. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, Inc. 596p.
- SYBENGA, J. (1960): Genetica y citologia del café. Turrialba 10(3):108-137.
- _____ (1972): General cytogenetics, North-Holland Publishing Company-Amsterdam & London. American Elsevier Publishing Co., Inc. - New York. 359p.
- SYLVAIN, P.G. (1958): Ethiopian coffee - Its significance to world coffee problems. Econ. Bot. 12(2):111-139.
- THOMAS, A.S. (1944): The wild coffees of Uganda. Emp. J. Exp. Agric. XII (45): 1-12.

- VENKATESWARALU, J.; BHIRAVAMURTY, P.V. (1969): Morphology of the pachytene chromosomes of the indian diploid *Solanum nigrum* L. Genetica 40:407-412.
- _____ ; PANTULU, J.V. (1968): Morphology of pachytene chromosome in pearl millet . (*Pennisetum*). J. Hered. 59:69-79.
- _____ ; RAO, K.G.R. (1977): Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis philadelphica* Lam. Caryologia 30(4):435-440.
- _____ ; _____ (1979a): Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis pubescens* L. Cytologia 44(1):161-166.
- _____ ; _____ (1979b): Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis angulata* L. Cytologia 44(3):557-560.
- VERMA, R.C.; RAINA, S.N. (1981): Cytogenetic of *Crotalaria*. V. Supernumerary nucleoli in *C. agatiflora* (Leguminosae). Genetica 56(1):75.
- WAINES, G.J.; KIMBER, G. (1973): Satellite number and size in *Triticum monococcum* L. and the evolution of the polyploid wheats. Can. J. Genet. Cytol. 15(1):117.
- WHELAN, E.D.P. (1969): Pachytene morphology of *Prunus avium* L. c.v. Lambert. Can. J. Genet. Cytol. 11:125-132.
- WILDMAN, E. de (1941): Études sur le genre *Coffea* L.: classification, caractères morphologiques, biologiques et chimiques, sélection et normalisation. Bruxelles, Palais de Academies, VI, 495p. (Publications de la Fondation Agathon de Potter, n° 2).
- WILKINSON, J. (1944): The cytology of *Salix* in relation to its taxonomy. Ann. Bot. (Lond.)8:269-284.
- WU, T.P. (1978): Pachytene morphology of *Sorghum nitidum* chromosome complement. Cytologia 43(2):433-440.

YEH, B.P.; PELOQUIN, S.J. (1965a): The nucleolus associated chromosome of *Solanum* species and hybrids. Am. J. Bot. 52(10):626.

_____; _____ (1965b): Pachytene chromosomes of potato (*Solanum tuberosum* group Andigena). Am. J. Bot. 52(10):1014-1020.

YU, M.H. (1977): Preliminary study of pachytene morphology in a homozygous line of sugarbeet (*Beta vulgaris*). Crop. Sci. 17:833-836.