

BC/20990
IB/81100



UNICAMP

31120



NEIVA IZABEL PIEROZZI

este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Neiva Izabel Pierozzi e aprovada pela Comissão Julgadora.

Crodowaldo Pavan
CRODOWALDO PAVAN, 16/12/92

IDENTIFICAÇÃO, POR MÉTODOS DE BANDAMENTO, DOS

CROMOSSOMOS DE Coffea (*Coffea canephora*
Pierre ex Froehner; *C. dewevrei* De Wild
et Th. Dur.; *C. racemosa* Lour.)

Tese apresentada ao Curso de Pos-Graduação em Genética do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (UNICAMP) para a obtenção do título de Doutor em Ciências na Área de Genética.

Orientador Prof. Dr. CRODOWALDO PAVAN

Dra. NEUSA DINIZ DA CRUZ

(in memoriam)

Campinas - SP

1993

| | | | |
|--------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| UNIDADE | IB | | |
| N.º CHAMADA: | | | |
| P613i | | | |
| V. | Ex. | | |
| TOMBO BC/ | 20990 | | |
| PREC. | 286,94 | | |
| C | <input type="checkbox"/> | D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PRECJ | CR\$ 800,00 | | |
| DATA | 18/02/94 | | |
| N.º CPD | | | |

CM-00057986-4

Aos meus pais,

Aos meus mestres,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crodowaldo Pavan, por sua orientação segura, incentivo e respeito.

À Dra. Neusa Diniz da Cruz (*in memoriam*), pesquisadora científica da Seção de Citologia do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a quem devo minha formação científica, por sua amizade, convívio e respeito.

À Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio, pesquisadora científica do Instituto Agrônomo de Campinas; à Profa. Dra. Christine Hackel, professora da Universidade Estadual de Campinas; e à Profa. Dra. Margarida L. Rodrigues Aguiar Perecin, professora da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", pelas valiosas críticas e sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa de doutorado.

Aos funcionários da Seção de Citologia (IAC), pela colaboração efetiva.

Às colegas pesquisadoras da Seção de Citologia, pelo apoio, amizade e convívio.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na pessoa de seus diretores gerais Dr. Orivaldo Brunini e Dr. Ondino Cleante Bataglia, pelas facilidades concedidas.

Aos docentes e colegas do curso de pós-graduação na área de Genética da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos e amizade.

CONTÉÚDO

| | |
|---|----|
| ABSTRACT..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 03 |
| 2.1. Taxonomia..... | 03 |
| 2.2. Genética..... | 07 |
| 2.3. Citologia..... | 11 |
| 2.4. Heterocromatina e bandamento cromossômico..... | 15 |
| | |
| 3. MATERIAL E MÉTODO..... | 25 |
| 3.1. Procedência do material..... | 25 |
| 3.2. Coleta, pré-tratamento e fixação..... | 26 |
| 3.3. Preparo do material para o bandamento..... | 26 |
| 3.4. Preparo do material para as medições cromossômicas..... | 32 |
| 3.5. Medições cromossômicas..... | 32 |
| | |
| 4. RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1. Medições cromossômicas..... | 35 |
| 4.2. Bandamento..... | 45 |
| 4.2.1. Bandamento-C..... | 46 |
| <i>Coffea canephora</i> var. <i>Robusta</i> | 46 |
| <i>C. dewevrei</i> var. <i>excelsa</i> | 59 |
| <i>C. racemosa</i> | 63 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2.2. | Solução diluída de Giemsa..... | 65 |
| | <i>C. canephora</i> var. <i>Robusta</i> | 68 |
| | <i>C. deweyrei</i> var. <i>excelsa</i> | 71 |
| 4.2.3. | Impregnação pela prata..... | 74 |
| | <i>C. deweyrei</i> var. <i>excelsa</i> | 74 |
| | <i>C. racemosa</i> | 74 |
| 4.2.4. | Digestão enzimática pela tripsina..... | 74 |
| | <i>Coffea canephora</i> var. <i>Robusta</i> | 79 |
| | <i>C. deweyrei</i> var. <i>excelsa</i> | 79 |
| 4.2.5. | Reação Nuclear de Feulgen..... | 81 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 86 |
| 5.1. | Medidas cromossômicas..... | 86 |
| 5.2. | Bandamento..... | 87 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 97 |
| 7. | LITERATURA CITADA..... | 99 |

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA

PÁGINA

- 1 - Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos de células de radículas de *Coffea*, corados pelo método da orceína acética..... 43
- 2 - Ideogramas de *Coffea* obtidos a partir de cromossomos metafásicos de células de radículas e corados pela orceína acética..... 44
- 3 - Fotomicrografias dos cromossomos mitóticos de células do endosperma de *Coffea*, após o emprego do bandamento-C..... 49
- 4 - Fotomicrografias dos cromossomos metafásicos de células do endosperma de *Coffea*, após o emprego do bandamento-C..... 51
- 5 - Fotomicrografias dos cromossomos em prometáfase de células de endospermas de *C. dewevrei*, após o emprego de solução diluída de Giemsa..... 52
- 6 - Fotomicrografias dos cromossomos mitóticos de células do endosperma de *Coffea*, após a impregnação pela prata..... 53
- 7 - Fotomicrografias dos cromossomos prometafásicos de *Coffea*, após o emprego da tripsina..... 54
- 8 - Desenho em câmara clara e ideograma dos cromossomos prometafásicos de uma célula de radícula de *Coffea canephora*, após o bandamento-C..... 55
- 9 - Desenho em câmara clara e ideograma dos cromossomos na prometáfase de uma célula de radícula de *C. canephora*, após o bandamento-C..... 56
- 10 - Desenho em câmara clara e ideograma dos cromossomos prometafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após o bandamento-C..... 57
- 11 - Ideograma dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após o bandamento-C..... 58
- 12 - Diferentes tipos de bandamento em cromossomos

| | | |
|------|---|----|
| | mitóticos de metáfases, tratados pelo bandamento-C, em células de <i>C. deweyrei</i> | 62 |
| 13 - | Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos de prometáfases, tratados pelo bandamento-C, em células de endospermas de <i>C. racemosa</i> | 66 |
| 14 - | Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos metafásicos de <i>C. canephora</i> , tratados apenas com solução diluída de Giemsa..... | 70 |
| 15 - | Diferentes tipos de bandamento em cromossomos metafásicos de <i>C. deweyrei</i> , tratados apenas com solução diluída de Giemsa..... | 73 |
| 16 - | Desenhos em câmara clara dos cromossomos metafásicos de duas células de endospermas de <i>C. canephora</i> , após a impregnação pela prata..... | 75 |
| 17 - | Ideogramas de cromossomos metafásicos de células de endosperma de <i>C. deweyrei</i> , após a impregnação pela prata..... | 76 |
| 18 - | Desenho em câmara clara e ideograma dos cromossomos de <i>C. racemosa</i> , após a impregnação pela prata..... | 77 |
| 19 - | Ideograma dos cromossomos prometafásicos de <i>C. racemosa</i> , após a impregnação pela prata..... | 78 |
| 20 - | Desenho e ideograma dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de <i>C. canephora</i> , após a digestão enzimática com a tripsina..... | 82 |
| 21 - | Desenho e ideograma dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de <i>C. canephora</i> , após a digestão enzimática com a tripsina..... | 83 |
| 22 - | Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos em metáfase tratados pela tripsina em células de endospermas de <i>C. deweyrei</i> | 84 |
| 23 - | Fotomicrografias de células pertencentes a endospermas de <i>Coffea</i> as quais foram preparadas pelo esmagamento e coradas com orceína acética, onde se vê a diferença de tamanho entre células | |

localizadas na parte mais central desse tecido (células maiores) e células periféricas (menores).... 85

TABELA

PÁGINA

| | |
|--|----|
| 1 - Cromossomos metafásicos de células de endospermas de <i>C. canephora</i> e de <i>C. dewevrei</i> . Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV)..... | 37 |
| 2 - Cromossomos prometafásicos de células de endospermas de <i>C. racemosa</i> . Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV)..... | 37 |
| 3 - Cromossomos metafásicos de radículas de <i>C. canephora</i> . Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN <u>et al.</u> (1964)..... | 38 |
| 4 - Cromossomos metafásicos de radículas de <i>C. dewevrei</i> . Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN <u>et al.</u> (1964)..... | 39 |
| 5 - Cromossomo metafásico de radículas de <i>C. racemosa</i> . Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN <u>et al.</u> (1964)..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 6 - Teste de Tukey para as médias dos comprimentos absolutos (em micrômetros) dos cromossomos metafásicos de células de radículas de <i>C. canephora</i> , <i>C. deweyrei</i> e de <i>C. racemosa</i> | 41 |
| 7 - Teste de Tukey para as médias dos comprimentos relativos (%) dos cromossomos metafásicos de células de radículas de <i>C. canephora</i> , <i>C. deweyrei</i> e de <i>C. racemosa</i> | 42 |

CHROMOSOME IDENTIFICATION OF *Coffea*, THROUGH BANDING TECHNIQUES
(*Coffea canephora* Pierre ex Froenher; *C. dewevrei* De Wild et
Th. Dur.; *C. racemosa* Lour.)

ABSTRACT

Three diploid ($2n = 22$ chromosomes) and selfincompatible coffee species, *Coffea canephora*, *C. dewevrei* and *C. racemosa* were subjected to C-banding, proteolytic enzyme, Giemsa diluted solution only, silver staining techniques and Feulgen nuclear reaction. The purpose of this work was the mitotic chromosome characterization of these species for further comparative studies.

The karyological analysis were done in root cell chromosomes and cell chromosomes of young and growing endosperms which were collected from coffee imature fruits (cherries). The endosperm is a triploid tissue with an ephemeral life. It is a very soft tissue when it is growing and does not need enzymatic pre-treatment for softening during cytological squashes, which is employed in root squashes.

The three coffee species could be identified by (1) the chromosome measures and (2) the mean of percentage of sum of Giemsa dyed segments (*C. canephora* and *C. dewevrei*).

The band lateral asymmetry between sister chromatides, without an acceptable explanation yet, was discussed since it became evident in some chromosomes of the three coffee species, independent of the technique which was employed.

It was also seen an emphasized heterogeneity in the number and in the position of dyed chromosome segments which were attributed to a probable seletive amplification of some chromatid segments.

IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS DE BANDAMENTO, DOS CROMOSSOMOS DE *Coffea* (*Coffea canephora* Pierre ex Froenher; *C. dewevrei* De Wild et Th. Dur.; *C. racemosa* Lour.).

RESUMO

Três espécies diplóides de café ($2n = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis, *Coffea canephora*, *C. dewevrei* e *C. racemosa*, foram submetidas a técnicas de bandamento-C, da enzima proteolítica tripsina, da coloração com solução diluída de Giemsa, da impregnação pela prata, além da reação nuclear de Feulgen. O objetivo foi a caracterização dos cromossomos mitóticos dessas espécies para posteriores estudos comparativos.

As análises cariotípicas foram efetuadas em cromossomos de células de radículas e em cromossomos de células de endospermas jovens e de endospermas em crescimento, coletados a partir de frutos imaturos de café. O endosperma é um tecido triplóide, de natureza efêmera, muito macio quando jovem ou em crescimento, dispensando pré-tratamentos enzimáticos para o amolecimento, durante as preparações citológicas, procedimento obrigatoriamente usado quando os preparados provêm de raízes.

As três espécies de café puderam ser identificadas (1) pelas medidas cromossômicas e (2) pelas percentagens médias da somatória dos segmentos corados pelo Giemsa (*C. canephora* e *C. dewevrei*).

A assimetria lateral de bandas entre cromátides irmãs, ainda sem explicação aceita, foi discutida, uma vez que apareceu em alguns cromossomos nas três espécies de café, independentemente da metodologia empregada.

Constatou-se também acentuada heterogeneidade no número e na posição dos segmentos cromossômicos corados, que

foi atribuída a uma provável amplificação seletiva de determinados segmentos da cromatina.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* (família Rubiaceae) é formado por dezenas de espécies diplóides ($2n = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis, apresentando uma única exceção, *C. arabica*, que é tetraplóide ($2n = 44$ cromossomos) e autoincompatível.

A classificação taxonômica das espécies é ainda um assunto bastante conflitante, sendo alvo de mudanças tanto ao nível de espécie como ao nível de gênero. As controvérsias que surgem são, em parte, consequência da descoberta de novas espécies e das constantes perturbações que vêm ocorrendo nos limites das populações nativas locais, favorecendo o aparecimento de plantas híbridas e/ou tornando evidente a capacidade de adaptação dos cafeeiros face aos novos ambientes.

Desta forma, pesquisas envolvendo várias áreas do conhecimento (palinologia, anatomia, conteúdo de cafeína, polimorfismo enzimático, fragmentos de DNA em organelas citoplasmáticas, compostos flavonóides e similares, comportamento e morfologia dos cromossomos meióticos) vêm sendo conduzidas com a finalidade de filogenia e de se estabelecer também um reagrupamento mais natural das espécies de *Coffea*, com base nas relações de afinidades entre as mesmas. Paralelamente, os conhecimentos adquiridos sobre a estrutura de populações selvagens de algumas espécies de café (*C. congensis*, *C. canephora*, *C. dewevrei* e *C. liberica*, por exemplo), estão sendo utilizados em programas de melhoramento da espécie comercial de café, *C. arabica*.

O mecanismo de herança que governa a maioria dos caracteres genéticos estudados até o momento, tanto nas espécies diplóides como nos tetraplóides *C. arabica*, é do tipo monofatorial.

No campo das pesquisas citológicas, ainda não foi obtido um ideograma médio completo dos cromossomos metafásicos mitóticos para qualquer das espécies de café, em parte devido ao tamanho reduzido dos cromossomos e, em parte, devido ao grau de similaridade dos mesmos em metáfase, após o uso de técnicas usuais de coloração.

As técnicas de bandamento cromossômico, muito empregadas na citogenética vegetal, têm se revelado eficientes na identificação, caracterização e elaboração de cariótipos, permitindo o estudo das relações de afinidades interespecíficas.

Assim sendo, neste trabalho, foram empregadas algumas técnicas de bandamento cromossômico em *C. canephora*, *C. dewevrei* e em *C. racemosa*, visando o estabelecimento de um ideograma médio para cada espécie e, posteriormente, verificação do grau de afinidade entre as espécies em questão.

O objetivo do presente trabalho foi, portanto, a caracterização cromossômica por meio de técnicas de bandamento e também por meio das medidas cromossômicas nas espécies de café estudadas.

A escolha destas três espécies de café foi baseada na morfologia externa bastante distinta, no hábito e na distribuição geográfica das mesmas.

O tecido escolhido para este trabalho foi o endosperma imaturo coletado de frutos jovens. Apesar de ser um tecido triplóide ($3n = 33$ cromossomos), não necessita de pré-tratamentos enzimáticos para o amolecimento da parede celular e é ativo mitoticamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA NO GÊNERO COFFEA

2.1. TAXONOMIA

A diversidade taxonômica existente no gênero *Coffea* L. (família Rubiaceae) é traduzida através da existência de aproximadamente 80 espécies, segundo dados compilados de BRIDSON (1982 e 1987); CHEVALIER (1947) e LEROY (1960; 1961; 1962a, b, c; 1967a, b; 1980 e 1981).

A história taxonômica de *Coffea* (café) é extensa e iniciou com os relatos de Clusius e Rauwolf, no final do século XVI a respeito da atual espécie *C. arabica*, naquela época ainda não descrita como tal (CHEVALIER, 1929).

A partir desses relatos, o café foi primeiramente comparado a *Euonymus* sp. (família Celastraceae) por Alpinus, a um provável *Zanthoxylum* sp. (família Rutaceae) por Clusius, a *Jasminum* por Commelinus e descrito posteriormente como *Jasminum arabicum* por Jussieu, em 1713 (TAUNAY, 1939; CARVALHO, 1946 e HAARER, 1958).

Foi Linnaeus que, em 1737, criou o gênero *Coffea* e a primeira espécie descrita foi *C. arabica*, em 1753, pelo próprio Linnaeus (LINNAEUS, 1762 e CHEVALIER, 1947).

A partir do trabalho de Linnaeus, diversas outras espécies foram descritas. As espécies *C. racemosa*, *C. canephora* e *C. dewevrei* foram descritas respectivamente em 1790 por Loureiro, em 1897 por Pierre e em 1899 por E. De Wildeman e T. Durand (apud CARVALHO, 1946 e CHEVALIER, 1947).

Diante do número crescente de espécies de café, botânicos como DE CANDOLE (1830) e Schumann (1891, apud CHEVALIER, 1929) tentaram delimitar melhor o gênero dividindo-o em seções com base em critérios morfológicos.

No início do século XX, o número de espécies aproximava-se de uma centena e o próprio CHEVALIER (1947), efetuando uma revisão na sistemática e na taxonomia de *Coffea* reduziu este número para aproximadamente 60 espécies que foram então agrupadas nas seguintes seções: *Argocoffea* Pierre ex De

Wild., *Eucoffea* K. Schum., *Mascarocoffea* Chev. e *Paracoffea* Miquel. de acordo com critérios morfológicos e também com base na distribuição geográfica das mesmas. Por ser uma obra extensa é citada com freqüência nos trabalhos de filogenia.

Com a intensificação das missões de prospecção de cafés selvagens na África, novas espécies têm sido descobertas, descritas (CHARRIER, 1985 e BERTHAUD, 1986) e algumas modificações na classificação de CHEVALIER (1947) têm sido propostas.

Inicialmente, a seção *Argocoffea* Pierre ex De Wildeman foi elevada à condição de gênero *Argocoffea*, por LEROY (1960). Ficaram excluídas da definição de *Coffea* aquelas espécies de hábitos escandentes e as trepadeiras.

Posteriormente, LEROY (1967a), revendo a posição das espécies componentes da seção *Paracoffea* Miq., elevou-as estas à categoria de gênero *Paracoffea*. Com esta nova modificação taxônômica, a ocorrência das espécies de *Coffea* ficou restrita apenas ao continente africano e ilhas vizinhas.

O próprio LEROY (1980) propôs, por último, com base em evidências morfológicas da flor e no crescimento da planta, uma nova mudança na posição das espécies agrupadas em *Paracoffea* (Miq)Ler. Aquelas espécies de estilete longo e corola brevitubulada retornaram ao gênero *Coffea*, enquanto que as demais foram reclassificadas como do gênero *Psilanthus* Hook.

Com isso, o gênero *Coffea* ficou caracterizado por três sub-gêneros, a saber, *Coffea*, *Baracoffea* e *Psilanthopsis*, compreendendo espécies restritas ao continente africano e ilhas de Madagascar e Mascarenhas. O gênero *Psilanthus* passou a ter espécies que ocorrem na África e na Ásia.

O sub-gênero *Coffea* passou a ser constituído pelos taxons que outrora eram considerados membros das seções *Eucoffea* e *Mascarocoffea*. O sub-gênero *Baracoffea* passou a ter apenas quatro espécies que antes pertenciam à seção, e depois ao gênero, *Paracoffea*. Já o sub-gênero *Psilanthopsis* congrega apenas a espécie *C. kapakata*.

Recentemente, BRIDSON (1987 e 1988) estudando a taxonomia dos cafeeiros concluiu que muitas das descrições

infragenéricas efetuadas, tanto por Chevalier como por Leroy, não eram válidas do ponto de vista das regras de nomenclatura botânica (ICBN).

Estudos mais amplos e abrangentes, envolvendo outras áreas, como a genética, a palinologia, a anatomia, a quimiotaxonomia, entre outras, têm sido efetuados para o melhor conhecimento das relações interespecíficas existentes e, desta forma, esclarecer pontos ainda controvertidos nas classificações genérica e infragenérica de *Coffea*, bem como a origem do tetraplóide *C. arabica*.

Assim sendo, CARVALHO & MÓNACO (1959) com base nos resultados positivos dos cruzamentos entre *Psilanthopsis kapakata* Hirsch com algumas espécies de café, propuseram a reclassificação dessa espécie para *Coffea kapakata*.

Os estudos palinológicos, efetuados por CHINNAPPA (1981), por meio da microscopia eletrônica de varredura, em 38 espécies de café, demonstraram que *Paracoffea* (hoje, *Psilanthus*) e *Coffea* são entidades suficientemente distintas para serem mantidas como gêneros separados, como proposto por LEROY (1967a e 1980) pois, *Coffea* tem os grãos de pólen predominantemente tri-colpados, enquanto que *Psilanthus* os grãos são tetra- ou penta-colpados.

Além da palinologia, as pesquisas no campo da quimiotaxonomia, envolvendo a presença de pigmentos flavonóides em espécies de *Coffea*, têm também auxiliado na compreensão das relações interespecíficas, principalmente naqueles grupos de difícil classificação. Desta forma, os cromatogramas obtidos por LONGO (1972) e LOPES & MÓNACO (1979) demonstraram que *C. canephora* e *C. liberica* apresentavam alta afinidade com *C. arabica*, podendo então estarem envolvidas na gênese dessa última espécie. Já *C. dewevrei* mostrou alta porcentagem de afinidade com as demais espécies estudadas. Dentro da sub-seção *Mozambicoffea*, sensu CHEVALIER (1947), a análise dos compostos fenólicos indicou afinidade entre *C. eugenioides*, *C. racemosa* e *C. kapakata* (RAM et al., 1982).

O emprego dos métodos de taxonomia numérica, associado à presença de flavonóides, confirmaram por exemplo, a

afinidade de *C. eugenioides* pela espécie *C. arabica* e o alto grau de semelhança entre *C. dewevrei* e *C. liberica* (LOPES et al., 1985 e LOPES & SHEPHERD, 1991).

BERTHOU et al. (1980 e 1982) sugeriram que um dos parentais de *C. arabica* poderia ter sido uma espécie semelhante à atual *C. eugenioides*, devido às similaridades encontradas, pelos pesquisadores, nos géis de fragmentos de DNA citoplasmático nessas espécies. Além disso, é provável que *C. arabica* e *C. eugenioides*, junto com *C. canephora* e *C. congensis* tenham tido uma origem comum.

Dentro da classificação de CHEVALIER (1947), *C. canephora* pertence à sub-seção *Erythrocoffea*, *C. dewevrei* à sub-seção *Pachycoffea* e *C. racemosa* à sub-seção *Mozambicoffea*, todas, porém da seção *Eucoffea*. De acordo com a classificação de LEROY (1980), essas três espécies de café estão reunidas no sub-gênero *Coffea*.

As espécies *C. canephora*, *C. dewevrei* e *C. racemosa* são bastante distintas morfológicamente, inclusive quanto ao hábito xerofítico de *C. racemosa*. Possuem uma distribuição particular no continente africano. *C. dewevrei* ocorre em uma faixa a centro-oeste que corresponde a República Centro Africana. Já *C. canephora* tem uma distribuição mais ampla, pela costa atlântica, desde as florestas da Nova Guiné até a região norte de Angola, onde adentra no Zaire e na República Centro Africana. Os estudos de BERTHAUD & GUILLAUMET (1978) revelaram que, embora ocorra sobreposição na distribuição de *C. canephora* e de *C. dewevrei*, há mecanismos eficientes de impedimento que as mantêm como unidades distintas, tais como o deslocamento do período da ântese do botão, evitando a sobreposição da abertura floral, ou a defasagem no período de receptividade da superfície estigmática das flores dessas duas espécies de café.

C. racemosa ocupa as regiões de savana da costa leste africana, em Moçambique.

2.2. GENÉTICA

Há mais de quarenta fatores genéticos conhecidos e estudados no café Arábica (CHARRIER & BERTHAUD, 1985), alguns com dominância completa, outros com dominância incompleta e outros ainda recessivos. Muitos desses fatores têm efeito pleiotrópico, enquanto que outros chegam a ser epistáticos (CRAMER, 1957).

Até a década de trinta, o aparecimento de novos tipos morfológicos de *C. arabica*, em condições de cultura, eram apenas descritos como novas variedades botânicas, sem contudo ter sido elucidado o mecanismo operante na transmissão desses novos caracteres descobertos.

Estudos sobre a hereditariedade de determinados caracteres, em café, foram efetivamente iniciados por KRUG (1936b) que examinou cerca de 24 variedades diferentes de *C. arabica*. Estabeleceu, a princípio, que: (1) a cor das folhas novas, bronze e verde, era devido a um único par de fatores (*Br* e *br*) com uma provável dominância incompleta; (2) a cor rosa da corola era recessiva em relação à cor branca; (3) o tipo *murta* correspondia a uma forma heterozigota, pois a auto-fecundação de plantas Murta originava os tipos denominados de Bourbon, Murta e uma forma anã e praticamente estéril de cafeeiro, (4) havia instabilidade somática no tipo *murta*; (5) o fator responsável pelo fenótipo *anomala* (*An*) apresentava dominância quase que completa sobre o fenótipo normal e (6) o mesmo fenômeno de dominância incompleta foi também verificado com relação ao caráter sépalas desenvolvidas (*sd*) que, na condição recessiva (*sd sd*), resultava no aparecimento de um cálice foliáceo e persistente até nos frutos maduros.

Continuando as pesquisas sobre a genética de *Coffea* ficou estabelecido que os fenótipos murta [de constituição genotípica (*Na na*)] e anão (*na na*) eram derivados do cultivar Bourbon (*Na Na*) (KRUG, 1939 e 1949 e CARVALHO, 1941). Foi verificado que o alelo *na* também interferia na produção de grãos, pois plantas murta (*Na na*) eram menos produtivas do que Bourbon e as anãs (*na na*) produziam ainda menos frutos (CARVA-

LHO & KRUG, 1946 e KRUG & CARVALHO, 1951). Do cruzamento de plantas do tipo Murta com *C. arabica* cv *typica* (hoje, *C. arabica* var. *arabica*) surgiam sempre plantas semelhantes ao parental do cultivar *Arabica*. Suspeitou-se então que o cultivar *Arabica* era portador, de um ou mais genes com capacidade inibidora da expressão dos genes *Na* e *na* (KRUG, 1939; CARVALHO, 1941 e CARVALHO & KRUG, 1946).

Esse gene que foi posteriormente identificado (*T*), sempre presente no cultivar *Arabica*, tinha ação epistática sobre os alelos *Na* e *na*. O alelo *Na*, por sua vez, é dominante na presença de *t t* (KRUG & CARVALHO, 1951).

É provável que o alelo *t* tenha se originado, através de mutação, do cultivar *Arábica*, gerando desta forma o cultivar conhecido como Bourbon (*t t Na Na*) (SYBENGA, 1960 e CARVALHO et al., 1991).

O fator cera (*ce*), que determina a cor amarela nos endospermas, um dos primeiros a serem pesquisados em café, foi utilizado no clássico experimento realizado por KRUG & CARVALHO (1939) que provaram a existência do endosperma em frutos maduros.

O endosperma de café (tecido utilizado em nossos experimentos), bem como o de outras angiospermas, tem uma origem dependente da formação do saco embrionário. Após a polinização, ocorre o fenômeno da dupla fertilização, onde o núcleo reprodutivo do grão de pólen se funde ao óvulo, formando o zigoto, enquanto que o núcleo germinativo do grão de pólen se une aos dois núcleos polares do saco embrionário, dando origem ao endosperma que é, conseqüentemente, triplóide ($3n$).

A ocorrência do endosperma em *Coffea* foi registrada inicialmente por FABER (1912) e posteriormente por LELIVELD (1938), e contestada por HOUK (1938) que afirmava ser o endosperma um tecido evanescente, substituído então pelo perisperma, de origem materna, nos frutos maduros.

Diante de tais discordâncias, cientes da natureza triplóide do tecido e da expressão do fator cera nos endospermas ainda jovens, KRUG & CARVALHO (1939) e CARVALHO & KRUG (1949) realizaram diversos cruzamentos bidirecionais de plantas

de endospermas verdes com plantas de endospermas amarelos, além de autopolinizações entre as mesmas. Observaram que, (1) plantas oriundas de sementes com endosperma amarelo, quando eram autopolinizadas, sempre produziam sementes da mesma cor amarela; (2) a polinização destas plantas com pólen de plantas provenientes de sementes de endospermas verdes, originavam frutos de endospermas verdes; (3) o mesmo acontecia com a polinização das plantas de endospermas verdes com pólen das plantas de sementes com endosperma amarelo.

Prosseguindo, os autores (KRUG & CARVALHO, 1939, 1951 e CARVALHO & KRUG, 1951) verificaram que o gene *ce*, assim denominado, expressava a cor amarela somente em dose tripla recessiva (*ce ce ce*). Nesse conjunto, um alelo dominante *Ce* determina a cor verde no endosperma de *C. arabica*. Este é um exemplo de xênia e consiste na expressão direta do fator genético vindo do gameta masculino, no fenótipo do endosperma. O gene *Ce* domina os dois alelos recessivos derivados dos núcleos polares do saco embrionário.

Com este experimento ficou esclarecido definitivamente a presença do endosperma nas sementes de frutos maduros de café.

O crescimento do endosperma pode, em certos casos, ser interrompido em sua fase celular e os frutos desenvolvidos, aparentemente normais, ficam destituídos de sementes o que é um defeito indesejável (ANTUNES FILHO & CARVALHO, 1954).

MENDES et al. (1954) e MENDES & MEDINA (1955) demonstraram que este defeito é consequência da ação do gene *d* que, em homozigose no endosperma (*d d d*) e no embrião (*d d*), é letal.

Até o momento, os gens *anomala* (*an*) e *anormalis* (*Am*), ambos com efeito pleiotrópico, e que modificam principalmente a morfologia das folhas, se constituem no único exemplo de ligação entre dois fatores genéticos no gênero *Coffea*, como demonstrado por CARVALHO (1960) que estimou estar entre 10 a 20% a taxa de recombinação entre *an* e *Am*, em *C. arabica*.

Os dados obtidos até o momento, sobre a consti-

tuição genética das espécies diplóides de *Coffea*, são limitados. É provável que o próprio sistema de auto-incompatibilidade nessas espécies, dificulte os cruzamentos e também as análises genéticas (CARVALHO, 1958 e SYBENGA, 1960).

Em *C. canephora*, a fasciação de caules e ramos na planta é consequência da ação dos alelos recessivos $fs^c fs^c$. O cruzamento de plantas heterozigotas normais ($Fs^c fs^c$) dão plantas na proporção de 3 normais: 1 fasciada. Interessante que esse caráter, em *C. arabica*, é completamente dominante. Não se sabe, entretanto, se tais genes, que causam a fasciação, são os mesmos nessas duas espécies de café (CARVALHO, 1951 e CARVALHO, 1958).

Foi também identificado, em *C. canephora*, o gene na^c que, semelhantemente a *C. arabica*, em dose dupla recessiva ($na^c na^c$) causa o aparecimento de plantas anãs, com folhas pequenas, e com baixa produção de flores e frutos. Não existe, no entanto, a classe intermediária murta, pois o gene é completamente recessivo (KRUG & CARVALHO, 1951).

Os fenótipos angustifolia (lâmina foliar mais espessa e estreita), xantocarpa (frutos com exocarpo amarelo quando maduros) e purpurascens (folhas jovens de cor púrpura, corola rosa e frutos estriados de cor púrpura quando ainda verdes) em *C. canephora*, são condicionados por alelos completamente recessivos (*ag*, *xc* e *pr*, respectivamente), como acontece em *C. arabica* (CARVALHO, 1958 e SYBENGA, 1960).

Já o fator cera, que é recessivo em *C. arabica* e condiciona a cor amarela nos endospermas (*ce ce ce*), é dominante em *C. dewevrei*, apresentando o mesmo fenômeno de xênia, anteriormente mencionado. Plantas de *C. arabica* de endospermas verdes, quando polinizadas por plantas de *C. dewevrei* de endospermas de cor cera, formavam frutos híbridos com endospermas de cor cera (CARVALHO, 1958).

As espécies diplóides de *Coffea* vêm sendo também utilizadas em cruzamentos com variedades produtivas de *C. arabica*, com a finalidade de se obter plantas híbridas resistentes a doenças e pragas.

A resistência à uma ou mais raças do fungo

Hemileia vastatrix em café, é conferida por fatores genéticos dominantes ($\mathcal{P}\mathcal{H}_1$ a $\mathcal{P}\mathcal{H}_9$), que podem aparecer combinados ou não (MÓNACO & CARVALHO, 1975 e BETTENCOURT & RODRIGUES JR., 1988). Sabe-se que o fator $\mathcal{P}\mathcal{H}_9$ provém de *C. liberica* e que os fatores $\mathcal{P}\mathcal{H}_6$ a $\mathcal{P}\mathcal{H}_9$, de *C. canephora* (BETTENCOURT & RODRIGUES JR., 1988). A espécie *C. canephora* também possui genes que conferem resistência ao fungo *Colletotrichum coffeanum* e ao nematóide *Meloidogynes* sp. (CARVALHO et al., 1991).

Em outras espécies, como *C. dewevrei* e *C. racemosa*, a resistência ao ataque da larva de *Perileucoptera coffeella* é dada pela presença de um gene dominante (CARVALHO et al., 1991 e GUERREIRO FILHO, 1992).

Por fim, têm-se que o sistema de autoincompatibilidade existente nas espécies diplóide é gametofítico e multialélico (BERTHAUD, 1986) sendo que foi muito estudado em populações nativas de *C. canephora* e usado como um dos parâmetros para se estimar o número de indivíduos fundadores de cada população natural desta espécie.

2.3. CITOLOGIA

Os primeiros estudos citológicos desenvolvidos em café, com a finalidade de se conhecer o número de cromossomos de algumas das espécies não lograram muito êxito, provavelmente devido às limitações próprias das técnicas então disponíveis.

Assim, FABER (1912) contou 8 pares de cromossomos, durante a megasporogênese, em *C. arabica* L., *C. liberica* Bull. e *C. laurentii* Pierre [hoje, *C. canephora* var. *laurentii* (De Wild.) Chev.].

Os estudos posteriores sobre a mitose, em radículas de *Coffea arabica*, variedades *nacional* e *bourbon*, efetuados por PIZA (1929), informaram apenas que os cromossomos somáticos eram pequenos e numerosos.

KRUG, em 1934, reexaminando a mitose de *C. arabica*, nas variedades *nacional* e *bourbon*, que foram estudadas

anteriormente por PIZA (1929) e, acrescentadas das variedades *laurina*, *maragogipe* e "Amarelo de Botucatu", concluiu que o número somático nessa espécie era igual a 44. Observou também que as espécies *C. canephora* Pierre ex Froehner, *C. congensis* Froehner e *C. excelsa* Chev. (hoje, *C. dewevrei* var. *excelsa* Chev.) possuíam $2n = 22$ cromossomos.

Em trabalhos subseqüentes, KRUG (1936a e 1937) pôde confirmar a condição de tetraplóide ($2n=44$ cromossomos) em outras variedades do café Arábica. As espécies *C. abeokutae* Cramer, *C. dewevrei* De Wild. et Th. Dur., *C. dybowskii* Pierre ex De Wild. (hoje, *C. dewevrei* var. *dybowskii* Pierre), *C. robusta* Linden [hoje, *C. canephora* var. *robusta* (Linden) Chev.] e *C. ugandae* Cramer [hoje, *C. canephora* var. *ugandae* (Cramer) Chev.] foram diagnosticadas como diplóides ($2n = 22$ cromossomos). A partir desses trabalhos e também daquele efetuado por HOMEYER (1933), ficou definitivamente estabelecido $x = 11$ como o número básico de cromossomos para o gênero.

À medida que os estudos citológicos foram abrangendo as demais espécies de *Coffea*, foi-se confirmando a natureza diplóide das mesmas, portadoras de 22 cromossomos, como se depreende dos trabalhos de BOUHARMONT (1959 e 1963), SYBENGA (1960), LEROY & PLU (1966) e LOUARN (1972).

Variações cromossômicas numéricas naturais podem entretanto ocorrer em variedades de *C. arabica*, algumas delas associadas a determinado fenótipo. Tal é o caso de *C. arabica* var. *bullata*, com as formas $2n = 66$ cromossomos e com $2n = 88$ cromossomos (KRUG, 1936a e 1937). Ou ainda, *C. arabica* var. *monosperma* com $2n = 22$ cromossomos, que apresenta porte pequeno e um alto grau de esterilidade masculina, além de grande quantidade de drupas portadoras de uma só semente. (MENDES & BACCHI, 1940).

CRUZ (1972) relatou a presença de plantas com diferentes tipos de aneuploidia, em progênies normais da variedade *Mundo Novo* de *C. arabica*. Algumas dessas plantas apresentavam fenótipo semelhante àquele conferido pelos alelos recessivos *angustifolia* (*ag ag*).

Estudos no comportamento meiótico de plantas

diplóides híbridas, anteriormente obtidas por CARVALHO & MÓNACO (1967), foram igualmente conduzidos por MEDINA (1972) para averiguar o grau de afinidade entre as espécies diplóides parentais. Foi encontrado um gradiente de homologia cromossômica, sendo a mais baixa verificada no híbrido entre *C. congensis* e *C. eugenioides* (10 monovalentes) e a mais alta, no híbrido entre *C. dewevrei* e *C. liberica*, com 11 bivalentes. O grau do pareamento cromossômico, entretanto, não foi um bom parâmetro para o conhecimento das relações interespecíficas porque, em alguns casos, o alto grau de pareamento coincidiu com uma alta taxa de esterilidade do pólen e/ou uma baixa porcentagem de germinação das sementes. Associações semelhantes a estas, entre grau de pareamento inversamente proporcional à taxa de esterilidade polínica, baixa frutificação e muitas lojas de frutos vazias foi também documentada nos híbridos diplóides de *C. canephora* e *C. racemosa* (LOUARN, 1985).

Concomitante aos estudos da determinação do número de cromossomos nas diferentes espécies de café e das relações de afinidades interespecíficas, esforços foram feitos para a caracterização individual dos cromossomos.

MENDES (1938) estudou citologicamente *C. excelsa* (hoje, *C. dewevrei* var. *excelsa*) e constatou que os cromossomos eram relativamente pequenos, variando de 1 a $3\mu\text{m}$ de comprimento, sendo difícil de separá-los e caracterizá-los individualmente devido também ao alto grau de similaridade existente entre eles. Dividiu-os em três grupos, de acordo com os gradientes do comprimento e a posição do centrômero. Segundo o autor, somente os três maiores cromossomos do genoma eram relativamente fáceis de serem identificados.

Outros autores como BOUHARMONT (1959 e 1963), SYBENGA (1960) e LOUARN (1972) concluíram que os cromossomos somáticos de café eram muito pequenos e similares, quando analisados ao microscópio óptico, após as técnicas dos cortes seriados, daorceína ou do carmim acético.

Análises posteriores na microsporogênese de diferentes espécies diplóides de café não revelaram diferenças morfológicas suficientemente fortes nos cromossomos que pudes-

sem ser utilizadas para a caracterização dos mesmos (MEDINA & RIJO, 1969 e MEDINA et al., 1977).

PINTO-MAGLIO & CRUZ (1987) conseguiram, entretanto, resultados positivos na caracterização da morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno em dez espécies de café, incluindo o tetraplóide *C. arabica*. As autoras confirmaram também a presença de dois pares de cromossomos nucleolares em *C. racemosa* e *C. salvatrix*, como inicialmente visto por MEDINA & RIJO (1969) E MEDINA et al. (1977). Observaram que, pelos padrões de ocorrência e de distribuição dos cromômeros, *C. canephora* e *C. congensis* eram muito semelhantes, o mesmo acontecendo para *C. dewevrei* e *C. eugenioides*. O tetraplóide *C. arabica* apresentava um de seus dois pares de cromossomos nucleolares semelhante a um daqueles de *C. racemosa* e *C. salvatrix*, enquanto que o outro par de cromossomos nucleolares do café Arábica era similar àquele de *C. dewevrei* e de *C. eugenioides*.

Recentemente, PINTO-MAGLIO (1991), usando ainda a análise dos cromossomos em fase de paquíteno estabeleceu um ideograma para a espécie *C. arabica*, com base no comprimento absoluto dos cromossomos e na distribuição dos cromômeros. A autora verificou que cerca de 54% dos bivalentes do complemento possuíam um padrão cromomérico semelhante, o que de certa forma confirmou a condição de alopoliplóide de segmento de *C. arabica*. O discreto grau de associações secundárias presentes entre alguns dos cromossomos foi interpretado como consequência da presença de um sistema eficiente que impedia o pareamento entre os cromossomos homeólogos.

Os estudos cariotípicos comparativos efetuados em metáfases mitóticas indicam que há um alto grau de homogeneidade entre as espécies que compõem o gênero *Coffea*. A diferenciação morfológica e fisiológica das espécies diplóides de café não foi acompanhada por mudanças nítidas na morfologia ou no número dos cromossomos. As variações interespecíficas que surgiram devem ter sido a nível gênico, a partir de um genoma básico (LOUARN, 1972; DEMARLY, 1975 e CHARRIER, 1977).

2.4. HETEROCROMATINA E BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Heitz, em 1928, analisando os cromossomos de algumas briófitas, pôde distinguir duas classes de cromatina que foram por ele denominadas de eucromatina e heterocromatina (apud YUNIS & YASMINEH, 1971 e VOSA, 1975).

O termo heterocromatina foi empregado inicialmente para descrever aqueles segmentos cromossômicos que se coravam densamente, ao microscópio óptico, e que permaneciam condensados ao longo do ciclo de divisão celular, inclusive durante a intérfase, diferenciando-se dessa forma da eucromatina. Esta, apresentava-se mais difusa nos núcleos intercinéticos e com uma coloração pálida, sofrendo o típico ciclo de condensação e descondensação durante a divisão mitótica (HSU, 1974 e LAVANIA & SHARMA, 1982).

Ao estudar a heterocromatina nos cromossomos politênicos das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*, Heitz, em 1934, chamou de α -heterocromatina aquela cromatina densamente compactada do cromocentro e de β -heterocromatina a heterocromatina menos densamente compactada e de aspecto vesicular que ocorria nos braços dos cromossomos (apud, PAVAN, 1946, COMINGS, 1972 e PARDUE & HENNIG, 1990).

Posteriormente, BROWN (1966) reconheceu a existência de dois tipos de heterocromatina a que chamou de facultativa e constitutiva.

A primeira, a heterocromatina facultativa, pode envolver apenas um cromossomo ou até um conjunto de cromossomos do genoma. O exemplo clássico é dado pela heterocromatinização facultativa, durante a fase embrionária, de um dos cromossomos X das fêmeas, o qual se torna densamente compactado e geneticamente inativo (MELLO, 1978 e SWANSON et al., 1981).

A heterocromatina constitutiva está presente em ambos os cromossomos homólogos, ocupando regiões de homologia. Apresenta-se condensada na intérfase e prófase constituindo os cromocentros e knobs, não sendo também ativa geneticamente (COMINGS, 1972, LAVANIA & SHARMA, 1982 e KENTON, 1991). Ocorre preferencialmente ao redor do centrômero e nos telômeros

(PARDUE & HENNIG, 1990), podendo também ocupar diferentes posições ao longo dos cromossomos, como acontece em *Brimeura* (VOSA, 1979) ou em *Crepis capillaris* (NOGUCHI & OHNO, 1989).

Embora ambas, a eucromatina e a heterocromatina se estendem ao longo dos cromossomos, formando o que ANAMTHAWAT - JÓNSSON & HESLOP - HARRISON (1990) denominaram de divisão territorial dentro da cromatina, a heterocromatina se destaca por algumas propriedades e/ou características inerentes a ela, tal como a replicação tardia de seu DNA.

Os experimentos desenvolvidos através da incorporação de timidina tritada (^3H -timidina) no ciclo celular, tanto em animais como em vegetais, têm demonstrado que ambas heterocromatinas, facultativa e constitutiva, apresentam a replicação tardia do DNA (LIMA-DE-FARIA, 1959; LIMA-DE-FARIA & JAWORSKA, 1968 e STEFFENSEN, 1986).

Outra característica da heterocromatina é a presença de seqüências repetitivas de DNA ricas em A-T ou G-C, dispostas em tandem, como demonstrado inicialmente por HERSKOWITZ (1961).

Com relação aos vegetais, GEBER & SCHWEIZER (1988) verificaram, por meio de fluorocromios e do Giemsa, a existência de duas classes distintas de heterocromatina nos cromossomos mitóticos de mostarda (*Sinapis alba*). A fração heterocromática maior destacava-se pela predominância de bases repetitivas G-C, enquanto que a fração menor abrigava seqüências ricas em A-T.

Semelhantemente à mostarda, KENTON (1991) observou a existência de frações de DNA ricas em A-T ou em G-C nos segmentos cromossômicos heterocromáticos da monocotiledônea *Gibasis karwinskyana*.

Através do uso de enzimas de restrição em cromossomos mitóticos e/ou meióticos de algumas plantas, foi possível de se determinar o tamanho de algumas dessas seqüências repetitivas que ocorriam nas regiões heterocromáticas teloméricas de centeio (*Secale cereale* e *S. silvestre*) (BEDBROOK et al., 1980), nos knobs de *Cucumis metuliferus* (RAMACHANDRAN & NARAYAN, 1990), ou ainda na heterocromatina constitutiva termi-

nal e intercalar de *Scilla siberica* (Liliaceae) (LOZANO et al., 1991).

De acordo com COMINGS (1972), nem todo o DNA da heterocromatina é repetitivo ou satélite.

LOUD & SCHOLTEN (1982), por exemplo, observaram que somente 3% do DNA heterocromático dos cromossomos do roedor *Cricetulus griseus* era repetitivo.

HERSHFIELD & SWIFT (1990) mostraram que na mosca *Sarcophaga bullata*, a fração de DNA altamente repetitivo ocorria tanto nos segmentos hetero como eucromáticos, não demonstrando portanto preferência de localização deste tipo de DNA.

Por ser a heterocromatina uma região caracterizada também pelo alto grau de compactação do DNA, os genes eucromáticos, quando justapostos a ela, por rearranjos estruturais ou por transposição, podem ter sua expressão alterada. É o efeito de posição, como relatado no trabalho de HAYASHI et al. (1990) e na revisão de HENIKOFF (1990), por exemplo.

Outro aspecto interessante a ser mencionado é que, durante a meiose, a heterocromatina interfere na formação e na frequência de quiasmas, pois próximos a ela, os quiasmas raramente se formam, e quanto maior a quantidade de heterocromatina presente nos cromossomos, menor será a taxa de ocorrência de permutas. (SCHWEIZER et al., 1987). Variações na quantidade de heterocromatina causadas por permutas desiguais, deleções ou por ampliações, podem ainda perturbar o pareamento cromossômico, na meiose, como se depreende das considerações feitas por BABU & VERMA (1987).

O fenômeno da amplificação de DNA em segmentos cromossômicos, anteriormente mencionado, foi inicialmente descrito por BREUER & PAVAN (1955), ao estudarem os cromossomos politênicos de glândulas salivares do díptero sciarídeo *Rhynchosciara angelae*. Os autores relataram a formação de pufes de DNA que, ao regredirem, deixavam um excedente de DNA na faixa cromatínica correspondente ao entumescimento do cromossomo. Esse DNA excedente foi posteriormente denominado de DNA metabólico, podendo permanecer ou ser eliminado do cromossomo (PAVAN, 1965 e PAVAN et al., 1975).

Pufes em regiões de heterocromatina foram observados por DÍAZ & PAVAN (1964) e por Sanders & Pavan (1972, apud PAVAN *et al.*, 1975) em cromossomos politênicos de *R. angelae*, infectados por microsporídeos. Esses pufes foram interpretados por PAVAN *et al.* (1975) como consequência da atividade gênica em resposta das células a uma condição de estresse.

Em vegetais, o evento da amplificação de DNA em tecidos somáticos foi documentado em condições normais em núcleos de células do metaxilema (*Allium cepa*), do embrião (*Triticum aestivum*) e do endosperma (*Ornithogalum elatum*), bem como em células de cultura de tecido, de acordo com a revisão efetuada no assunto por NAGL (1990).

De acordo ainda com NAGL & CAPESIUS (1977) e NAGL (1990), tecidos de nutrição que armazenam substâncias de reservas, como o endosperma, tendem a apresentar amplificação.

Citologicamente, a visualização dos segmentos condensados heterocromáticos, em cromossomos mitóticos, é possível em alguns casos, através do emprego da reação nuclear de Feulgen, como visto em *Borago officinalis* (D'AMATO & MARCHI, 1983), em *Anemona blanda*, *Fritillaria lanceolata* e *Scilla siberica* (MARKS, 1983) e em *Genipa americana* (PIEROZZI & CRUZ, 1988).

DARLINGTON & LA COUR (1940), inicialmente obtiveram um tipo de diferenciação longitudinal nos cromossomos metafásicos mitóticos de algumas espécies de *Trillium*, submetendo-os, por um período, a baixas temperaturas ($\pm 5^{\circ}\text{C}$ negativos). Observaram que as regiões heterocromáticas, após a coloração, permaneciam claras e com um diâmetro menor, quando comparadas com a cromatina adjacente.

Esse método de indução de diferenciação cromossômica pelo frio é limitado, pois em muitos vegetais, a heterocromatina constitutiva não se diferencia citologicamente, em resposta ao tratamento a frio (VOSA, 1975).

Com base então nas propriedades características e diferenciais da heterocromatina, novas técnicas citológicas surgiram, objetivando o reconhecimento individual dos cromossomos através da diferenciação longitudinal dos mesmos. Essas são

as técnicas que promovem a formação de bandas ao longo dos cromossomos as quais, de acordo com a Conferência de Paris (PARIS CONFERENCE, 1971), compreendem aqueles segmentos cromossômicos suficientemente corados ou luminescentes e que se destacam, portanto dos outros segmentos adjacentes.

Foi CASPERSSON et al. (1968) que inicialmente demonstraram a possibilidade do uso de agentes fluorescentes, como a quinacrina e seus derivados, na obtenção de cromossomos distintamente corados. As bandas obtidas pelo emprego de tais agentes fluorescentes foram designadas por bandas-Q.

Os estudos subseqüentes com o emprego dessa metodologia, demonstraram que a mesma, dependendo do corante utilizado, possuía a capacidade de evidenciar a predominância da composição de bases das regiões heterocromáticas. Assim sendo, fluorocromos como a quinacrina, o Hoechst 33.258, o DAPI, o DIPI, entre outros, realçavam a presença de seqüências de DNA ricas em A-T. Já os corantes como a cromomicina A₉ (CMA₉), a actinomicina e a olivomicina, evidenciavam segmentos de DNA heterocromáticos ricos em bases G-C (SCHWEIZER, 1982 e GREILHUBER, 1984).

VOSA (1980) constatou, pelo emprego da quinacrina, que a heterocromatina constitutiva de *Ornithogalum seineri* (Liliaceae) era rica em bases A-T, pois ao microscópio óptico apresentava um brilho muito intenso.

Em espécies do grupo vegetal de *Scilla siberica*, o emprego do bandamento-Q permitiu caracterizá-las citologicamente, além de revelar o grau de afinidade existente entre elas. Desta forma, as espécies *S. siberica*, *S. amoena* e *S. ingrídae*, consideradas taxonomicamente muito próximas, possuíam segmentos heterocromáticos predominantemente ricos em bases G-C, enquanto que a espécie mais distante taxonomicamente, *S. mischtschenkoana*, apresentava riqueza de bases A-T nas porções heterocromáticas (DEUMLING & GREILHUBER, 1982).

A técnica do bandamento-C surgiu como consequência dos experimentos de hibridação in situ, efetuados por PARDUE & GALL (1970), nos cromossomos de camundongos. Os autores demonstraram que, citologicamente, as seqüências de DNA

satélite localizavam-se na heterocromatina centromérica. Esta, em consequência dos tratamentos com soluções alcalinas e salinas, corava-se densa e seletivamente pelo Giemsa.

VOSA & MARCHI (1972) adaptaram o método para os cromossomos de plantas, testando-o em algumas Liliaceae. Compararam em seguida, o padrão de bandas-C com o número e a posição das bandas-Q luminescentes, encontrando forte correspondência entre ambos os tipos de bandas.

Em alguns vegetais, como *Trillium grandiflorum*, (Liliaceae) foi possível demonstrar a correspondência entre a heterocromatina evidenciada pelo bandamento-C com os segmentos heterocromáticos obtidos com o emprego do tratamento a frio de DARLINGTON & LA COUR (1940).

Apesar das técnicas de banda-C serem eficientes na caracterização dos cromossomos vegetais, a maior parte dos resultados positivos está concentrada nos membros das famílias Compositae, Liliaceae e Gramineae (D'AMATO & TROJANI, 1985).

Desta forma, os estudos citológicos comparativos, em cromossomos de milho (Poaceae), revelaram a correspondência entre as bandas-C, na metáfase mitótica, com os knobs do paquíteno (VOSA & AGUIAR, 1972 e WARD, 1980). Ficou também estabelecido que, nos cromossomos de milho, há dois tipos de heterocromatina, aquelas que são banda-C⁺ (knobs de milho) e aquelas que são banda-C⁻ (heterocromatina centromérica e grande parte da heterocromatina dos cromossomos B) (WARD, 1980; AGUIAR-PERECIN, 1984; 1985 e AGUIAR-PERECIN & VOSA, 1985).

No gênero *Allium* (Liliaceae), os estudos cariotípicos efetuados mostraram que as espécies nativas do Velho Mundo se caracterizavam pela presença de heterocromatina telomérica (bandas-C teloméricas), enquanto as espécies americanas possuíam segmentos heterocromáticos nas regiões centroméricas e/ou intercalares (VOSA, 1976b, 1976c e 1977; CAI & CHINNAPPA, 1987), reforçando a idéia da existência de dois grupos evolutivos diferentes dentro de *Allium*.

Além da caracterização morfológica dos cromossomos e do estabelecimento de relações de filogenia entre algumas espécies de cevada (*Hordeum*, família Poaceae), VOSA (1976a) e

KONISHI & LINDE-LAURSEN (1988) conseguiram, pelas análises citogenéticas, determinar os cromossomos envolvidos em diferentes translocações presentes em linhas de *H. spontaneum*, com base na posição das bandas-C encontradas.

Também de interesse foram as pesquisas conduzidas em *Triticale*, um gênero híbrido entre trigo e centeio, onde foi constatado um aumento diferencial na quantidade de heterocromatina telomérica, detectado pelo método da banda-C, em algumas linhas híbridas. Este aumento estava correlacionado positivamente com a formação de grãos enrugados na espiga, decorrentes de endospermas mal formados. Quanto maior a quantidade de heterocromatina telomérica, mais enrugados eram os grãos (HENEEN & BRISMAR, 1987 e JOUVE et al., 1989).

Assunto controvertido é o da possível correlação entre as bandas-C e as bandas-N. Estas últimas foram estabelecidas por MATSUI & SASAKI (1973) após o tratamento de cromossomos humanos com soluções de ácido tri-cloroacético ou com ácido clorídrico. Pensava-se que as bandas-N destacassem exclusivamente as regiões organizadoras do nucléolo (RON). Contudo, FUNAKI et al. (1975), trabalhando com cromossomos de alguns vertebrados e de algumas plantas demonstraram que a técnica do bandamento-N em alguns casos, além de evidenciar a RON, também provocava uma diferenciação nas regiões centroméricas.

Inversamente às bandas-N, o emprego de solução aquosa de nitrato de prata, nos cromossomos vegetais, tem se mostrado mais eficiente como método de marcação peculiar das RON. Esse tipo de marcação foi descrito primeiramente em cromossomos humanos por BLOOM & GOODPASTURE (1975).

SCHWEIZER & AMBROS (1979), diante do número incerto de segmentos RON existentes em *Phaseolus coccineus*, aplicando o método da impregnação pela prata, notaram que dos oito segmentos cromossômicos associados, ou supostamente associados ao nucléolo, somente seis deles (3 pares) possuíam a RON ativa.

Já no híbrido entre *Allium cepa* e *A. fistulosum* SCHUBERT (1984) concluiu, com base na extensão das RONS impregnadas, que provavelmente havia ocorrido ou (1) uma permuta desigual entre as RONS de ambas as espécies presentes no

híbrido, ou (2) uma transposição de um segmento RON de *A. cepa* para a região organizadora de *A. fistulosum*.

Em milho, com o auxílio da impregnação pela prata (KHUONG & SCHUBERT (1985) demonstraram que a região do organizador do cromossomo 6 compreendia também um segmento heterocromático que provavelmente teria então genes de rDNA.

JORDAN (1986), entretanto interpretou esse padrão de impregnação do segmento heterocromático presente na RON do cromossomo 6 de milho, como revelador apenas da existência de genes inativos de rDNA. Nessa RON, segundo esse autor, apenas 10% dos genes de rDNA seriam operantes e não se apresentariam condensados.

As bandas-G foram inicialmente descritas por DUTRILLAUX *et al.* (1971), em cromossomos humanos, com o emprego de enzimas proteolíticas tais como a pronase e a tripsina.

Posteriormente, ficou provado que outros compostos como a uréia, o permanganato de potássio, as soluções salinas com pH alcalino e detergentes, eram igualmente eficientes na promoção do bandamento-G em cromossomos humanos (SHIRAI-SHI & YOSIDA, 1972; KATO & MORIWAKI, 1972 e UTAKOJI, 1973).

A maioria dos resultados positivos que se tem com o bandamento-G, está restrita aos cromossomos de animais.

Em plantas, poucos são os resultados satisfatórios conseguidos com o emprego de agentes indutores de bandas-G. Segundo GREILHUBER (1977), os cromossomos vegetais não apresentam bandas-G devido ao forte grau de compactação dos mesmos durante a mitose.

DREWRY (1982) entretanto obteve bons resultados de diferenciação longitudinal nos cromossomos de *Pinus resinosa* com o uso da tripsina.

Já MURATA & ORTON (1984) obtiveram bandas consideradas semelhantes às bandas-G por meios de variações no tempo e na temperatura da solução de hidróxido de bário e da solução de 2xSSC, em aipo (*Apium graveolens*).

Resultados igualmente satisfatórios, mostrando inclusive constância no padrão das bandas, foram alcançados por YANG & ZHANG (1988) nos cromossomos de *Secale cereale*, de

Hordeum vulgare e de *Vicia faba*, e por KAKEDA et al. (1990) nos cromossomos mitóticos de milho com o emprego de solução diluída de tripsina.

Segundo SCHWEIZER et al. (1987) e HOLMQUIST (1988), as regiões cromossômicas diferenciadas pelo bandamento-G coincidem com aquelas luminescentes, pelo uso do quinacrina, e portanto, são ricas em bases repetitivas A-T, além do DNA destas regiões ter replicações tardias na fase S.

A aplicação de enzimas de restrição na obtenção de diferenciação cromossômica em vegetais tem se revelado promissora, embora sejam poucos os resultados positivos conseguidos até o momento (SCHUBERT, 1990)

Há ainda outras técnicas citológicas que promovem a formação de bandas ao longo dos cromossomos, tais como bandamento-R e -T porém, estes são mais utilizados em citogenética animal.

Supõe-se que o mecanismo operante na produção de bandas-C esteja relacionado com (1) o grau de compactação do DNA heterocromático que seria mais resistente aos tratamentos salinos dessa técnica (JACK et al., 1985); ou (2) a afinidade seletiva das regiões heterocromáticas pelos corantes Giemsa ou Leishman (DILLE et al., 1987); ou (3) a extração preferencial de DNA das regiões eucromáticas (HOLMQUIST, 1979 e 1988); ou ainda (4) a extração seletiva de DNA e de proteínas (BURKHOLDER, 1988 apud KAKEDA et al., 1991).

De maneira distinta, a formação das bandas-N parece estar associada a presença de fosfoproteínas (BUYS & OSINGA, 1982 e KAKEDA et al., 1991) ou a regiões cromossômicas de DNA satélite ricas em polipirimidinas (GERLACH, 1977; MORRIS & GILL, 1987).

Com relação à impregnação pela prata (bandas-RON), que ocorre preferencialmente nos sítios do organizador nucleolar, supõe-se que a reação de impregnação se dê com base na presença de proteínas específicas do tipo B₂₃ e C₂₃, que são inerentes ao nucléolo, e também devido ao estado descondensado da cromatina (SCHUBERT, 1984; SPECTOR et al., 1984; MEDINA et al., 1986 e SANCHEZ et al., 1989).

Estudos comparativos de microscopia óptica e eletrônica realizados em cromossomos tratados e não tratados com tripsina sugerem que a extração das proteínas não histônicas e da histona H₁ promovem a formação de bandas-G (HARRISON et al., 1983; ALLEN et al., 1988).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

As espécies de café utilizadas no presente trabalho são diplóides ($2n = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis. Estão representadas na coleção de plantas da Seção de Genética, no Centro Experimental, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), sendo que cada planta possui um número próprio que as identifica, dentro da coleção.

Endospermas jovens e imaturos de frutos em desenvolvimento, das seguintes plantas, foram utilizados nas preparações citológicas:

- *Coffea canephora* var. *Robusta* : plantas número 801 e 748. Tais plantas vieram do Horto Florestal de Rio Claro, onde passaram o período de quarentena e crescimento, após chegarem de Java.
- *Coffea dewevrei* var. *excelsa* : plantas número 63, 998, 2 e 6 . Excetuando-se a planta n^o 63 que foi introduzida como estaca, as demais se originaram de sementes, portanto, genótipos diferentes. Todas vieram da estação de Java, passando o período de quarentena e crescimento no Horto Florestal de Rio Claro de onde foram enviadas para o Instituto Agrônomo.
- *C. racemosa* : plantas de número 1193-3-2 e 1194-10-2. São originárias de Moçambique de onde vieram como sementes.

As espécies estudadas foram anteriormente herborizadas por MAGLIO (1983) e as exsicatas foram concomitantemente depositadas no Herbário UEC, da Universidade Estadual de Campinas e no Herbário da Seção de Botânica do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) com os seguintes números de introdução: *C. canephora* exc. n^o UEC-14.068 e IAC-25031; *C. dewevrei* exc. n^o UEC-14.065 e IAC-25028; *C. racemosa* exc. n^o UEC-14.064 e IAC-25027.

3.2. COLETA, PRÉ-TRATAMENTO E FIXAÇÃO

Os endospermas imaturos foram extraídos dos frutos e selecionados pelo aspecto morfológico. Foram considerados apenas aqueles discóides, de aspecto hialino, túrgidos e de consistência gelatinosa, eliminando-se aqueles murchos, endurecidos precocemente e os "conchas" (mal-formados).

Foram, subsequentemente à extração, submetidos a uma solução hipotônica de KCl (cloreto de potássio), na concentração de 0,075M, por 1 a 2 horas, à temperatura ambiente, com a finalidade de se promover o maior turgor celular, visando o adequado espalhamento cromossômico.

Utilizaram-se também raízes primárias e secundárias de sementes germinadas em condições de laboratório de *C. canephora*, *C. dewevrei* e *C. racemosa*. Todas as raízes foram submetidas à solução aquosa de para-diclorobenzeno (pDB) por 3 horas a 16°C, para a obtenção de contração cromossômica, o que facilita os estudos de morfologia.

Tanto os endospermas como as raízes foram fixados em solução de ácido e álcool na proporção de 1:1 (1 parte de ácido acético glacial e 1 parte de álcool etílico absoluto).

Após a fixação, os endospermas e as raízes foram estocados à temperatura de aproximadamente -20°C, para a melhor conservação do material.

3.3. PREPARO DO MATERIAL PARA O BANDAMENTO

As pontas das raízes das três espécies de café estudadas, previamente tratadas com solução aquosa de para-diclorobenzeno (p-DB) e fixadas, foram submetidas a uma solução aquosa mista das enzimas pectinase e celulase nas concentrações de 5% e 2%, respectivamente, por 2 horas à temperatura ambiente. A finalidade do emprego destas enzimas foi a digestão parcial da lamela média e da parede celular, para se obter um bom espalhamento cromossômico.

Após esse procedimento, as raízes, juntamente com os endospermas, passaram por uma solução de ácido acético a 45%, durante 30 minutos à temperatura de 55°C. Esta etapa antecede o bandamento e contribui também para o amolecimento do tecido antes do esmagamento.

As lâminas foram preparadas por esmagamento do tecido desejado, na mesma solução de ácido a 45%, pressionando-se a lamínula contra a lâmina.

No caso das raízes, as camadas meristemáticas apicais foram destacadas do restante, na própria lâmina, e cortadas em frações menores antes do esmagamento, minimizando desta forma a sobreposição das células. Este mesmo procedimento foi adotado para os endospermas pequenos (1 a 3mm de diâmetro aproximadamente) e para as camadas periféricas destacadas dos endospermas, com o auxílio de um bisturi, os quais apresentavam um diâmetro compreendido entre 4 a 8mm, aproximadamente.

O emprego discriminado, nas preparações citológicas, das camadas periféricas apenas ou de todo o endosperma, de acordo com o tamanho do mesmo, é justificado pela maior quantidade de células mitoticamente ativas encontradas nestas regiões e/ou nestes tamanhos, conforme verificado anteriormente por MEDINA (1964) em *C. arabica* e por MEDINA (1965) em *C. dewevrei*.

As lamínulas foram destacadas das lâminas por meio de um rápido banho em nitrogênio líquido (-183°C, aproximadamente), sendo que o material esmagado e aderido nas lâminas passou por um breve banho em álcool etílico absoluto, secou naturalmente à temperatura ambiente, sendo subseqüentemente estocado em cubas próprias e fechadas, também a temperatura ambiente, até o instante do bandamento.

Para que a maior parte do material permanecesse aderida na lâmina, após a etapa do despregamento em nitrogênio líquido, as lamínulas foram previamente siliconizadas.

Foi empregada a técnica do bandamento C, da impregnação pela prata e da digestão enzimática pelo uso da enzima proteolítica tripsina, além da coloração simples com a solução de Giemsa diluída em tampão fosfato sem qualquer

tratamento salino, que são descritas como se segue, com algumas modificações que foram introduzidas nas metodologias básicas proposta pelos respectivos autores, para melhor adaptar as técnicas aos materiais ora empregados.

* Banda-C :

(MARKS & SCHWEIZER, 1974)

- Filme de solução aquosa saturada de $Ba(OH)_2$ (hidróxido de bário) por 15 minutos a $55^\circ C$;
- Rápido banho das lâminas em água destilada levemente ácida (3 a 4 gotas de HCl 1N em 200 ml de água) seguida pela lavagem em água destilada corrente;
- Imersão das lâminas em solução de 2xSSC por 2 horas a $65^\circ C$ aproximadamente, a pH 7.8;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Coloração das lâminas por imersão em solução diluída de Giemsa /tampão fosfato Sörensen na proporção de 1/50 ou 1/100, de 1 a 5 horas a temperatura ambiente. O valor do pH da solução tampão fosfato de Sörensen foi de 6.8;
- Lavagem das lâminas em água destilada.

* Banda com emprego da enzima tripsina :

(DUTRILLAUX, 1973)

- Solução de tripsina diluída em tampão fosfato de sódio, pH 6.8, na concentração de 0,3 mg/ml, colocada como uma película sobre as lâminas e recoberta com uma lamínula, permanecendo de 4 a 8 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Coloração do material com solução Giemsa diluída em tampão fosfato de sódio na proporção de 1/100 respectivamente, permanecendo 2 horas à temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água destilada.

*Impregnação pela prata :

(BLOOM & GOODPASTURE, 1976)

- Solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de 50%, colocada sobre a lâmina, com o material esmagado e cobrindo com a lamínula, por 3 horas à temperatura de 50°C ;
- Lavagem das lâminas em água destilada.

*Coloração com solução de Giemsa:

- Imersão das lâminas em solução Giemsa / tampão fosfato Sörensen na proporção de 1/100 respectivamente por 3 horas;
- Lavagem das lâminas em água destilada.

As soluções empregadas em algumas das etapas das técnicas de bandamento foram preparadas como se segue:

2xSSC (pH 7.8):

- Solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,3M;
- Solução de citrato de trissódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,03M.

Tampão fosfato de Sörensen (pH 6.8):

Misturar partes iguais das seguintes soluções:

- Solução de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 9,078 g/litro;
 - Solução de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) a 26,795 g/litro.
- Tampão fosfato de sódio (pH 6.8):
- Solução de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) a 13,800 g/litro ;
 - Solução de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) a 26,795 g/litro.

As soluções foram preparadas separadamente por diluição em água destilada, misturadas em proporções iguais, medido o pH final da solução e utilizadas em seguida.

Terminado o bandamento, as lâminas permaneceram secando por 1 a 3 dias em ambiente, antes da montagem permanente no Permount.

Foram preparadas aproximadamente 1.000 lâminas de bandamento que foram analisadas e selecionadas no microscópio óptico.

As melhores células com o cromossomos suficientemente espalhados e corados diferenciadamente foram esquematizadas em câmara clara, fotomicrografadas e montado um ideograma.

Devido ao tamanho dos cromossomos, e ao fato de que nem sempre estavam no mesmo plano ao serem fotomicrografados, optou-se pela execução dos ideogramas a partir dos esquemas efetuados em câmara clara, onde puderam ser incluídos aqueles detalhes cromossômicos normalmente não obtidos pelas fotomicrografias.

Os desenhos dos cromossomos mitóticos foram feitos a partir do contorno cuidadoso dos mesmos com o emprego de uma câmara clara monocular ZEISS, conjugada a um microscópio ZEISS, munido de uma objetiva de imersão de 100X, uma ocular de 12,5X e com o variador de aumento na posição 1,25.

A esquematização dos cromossomos, com a posição de cada banda, bem como da constrição primária e secundária, foi feita utilizando-se um compasso de ponta seca.

Por causa do tamanho dos cromossomos, os mesmos foram ampliados nos esquemas, para uma melhor visualização.

Para efeito de comparação, foi desenhada uma escala com o valor em micrômetros, para cada esquema. Essa escala foi obtida pelo método do contorno, em câmara clara, das partes de uma régua micrométrica ZEISS, com o mesmo aumento utilizado nos desenhos dos cromossomos.

Os ideogramas elaborados mostram a posição das bandas, dos centrômeros, das constrições secundárias e do segmento satélite (SAT).

Em alguns casos, foi discriminada a intensidade do segmento bandado, (traço cheio ou pontilhado), principalmente se este variava dentro de um determinado conjunto de cromossomos.

Como o endosperma é um tecido triplóide ($3n = 33$ cromossomos), cada um dos 11 (onze) conjuntos de cromossomos foi, portanto, formado pelo agrupamento de três cromossomos supostos homólogos, julgados com base na presença, número e posição das bandas encontradas, comprimento do cromossomo, posição do centrômero e presença de constricção secundária.

A reação de Feulgen, como descrito por LISON (1960) foi também empregada como fonte auxiliar na detecção de segmentos heterocromáticos para posteriores estudos comparativos com os ideogramas de banda-C. Introduziu-se algumas modificações para melhor adaptação do método ao material. Desta forma, o procedimento é resumido como se segue:

- Solução de ácido clorídico (HCl) a 5N de concentração por 30', 45', 60' e 120 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem do material diversas vezes em água destilada;
- Coloração pelo reativo de Schiff por 2 horas;
- 3 banhos em água sulfurosa (200 ml de água destilada misturada com 10 ml de solução de HCl 1N e com 10 ml de solução de bissulfito de sódio a 10%);
- Lavagem em água destilada;
- Montagem em solução de ácido acético a 45%.

Inicialmente, a reação foi aplicada somente nos endospermas fixados e não-fixados. Posteriormente, as raízes fixadas e não fixadas foram incluídas e, subseqüentemente, as lâminas contendo endospermas ou pontas de raízes já esmagados e sem lamínula.

Com relação ao material já esmagado, a solução de HCl 5N, foi colocada sobre cada lâmina, sendo então coberta com a lamínula.

Algumas lâminas receberam um pré-tratamento enzimático com solução de tripsina a 0,3 mg/ml (a solução foi preparada em tampão fosfato de sódio), por 4 a 8 minutos antes da solução de HCl 5N.

3.4. PREPARO DO MATERIAL PARA AS MEDIÇÕES CROMOSSÔMICAS

Complementando as pesquisas sobre a identificação dos cromossomos de café e, em uma etapa posterior, foram preparadas lâminas de radículas das três espécies de café, pelo método da orceína acética, conforme técnica descrita por MEDINA & CONAGIN (1964).

As radículas anteriormente fixadas em solução Carnoy 3:1 foram submetidas a uma solução mista de 9 partes de orceína acética 2% e 1 parte de ácido clorídrico 1N, a 40°C, por 30 minutos. Subseqüentemente, as radículas foram tratadas com solução de pectinase a 5% de concentração, por duas horas, à temperatura ambiente, sendo então transferidas para uma solução de orceína acética 1%, por 1 hora e à temperatura ambiente.

As lâminas foram preparadas por esmagamento da ponta das radículas de algumas gotas da mesma solução de orceína acética 1%.

As melhores células em metáfase, com os cromossomos suficientemente espalhados, foram desenhadas em câmara clara para a posterior elaboração de ideogramas para cada uma das três espécies de café. Algumas dessas células em metáfase foram também fotomicrografadas.

3.5. MEDIDAS CROMOSSÔMICAS

Foram efetuadas medições cromossômicas, tanto em células de endospermas como em células de radículas de café.

Para as medições em células de endospermas, foram utilizados cerca de 9 ideogramas para *C. canephora*, 20 ideogramas para *C. dewevrei* e 8 ideogramas para *C. racemosa*, sendo que os ideogramas das duas últimas espécies foram obtidos após o bandamento-C e aqueles de *C. canephora*, após a coloração pela solução de Giemsa.

A partir desses ideogramas, foram calculadas as

médias, os desvios padrões e os coeficientes de variação para o comprimento absoluto (em micrômetros) de cada cromossomo.

Já para as medições cromossômicas realizadas em células de radículas coradas pela técnica daorceína acética, foram confeccionados e utilizados 10 ideogramas para cada espécie.

A partir desses ideogramas de radículas, foram calculadas as médias, os desvios padrões e os coeficientes de variação para o comprimento absoluto (em micrômetros), para o comprimento relativo (%) e para o valor do índice centromérico de cada cromossomo de cada espécie.

O comprimento absoluto de cada cromossomo foi obtido pela medição, com régua milimetrada, dos desenhos cromossômicos executados em câmara clara e transferidos para o papel milimetrado, convertendo-se as medidas de cada cromossomo para micrômetro, a partir de uma escala equivalente ao aumento obtido no microscópio.

O comprimento relativo, expresso em porcentagem, foi feito de acordo com o proposto em AGUIAR-PERECIN & VOSA (1985) e em RUAS (1989) e como se segue:

$$\text{comprimento relativo} = \frac{\text{comprimento do cromossomo}}{\text{comprimento do lote haplóide}} \times 100$$

Já o índice centromérico foi calculado segundo LEVAN et al. (1964) e como se segue:

$$\text{IC} = \frac{\text{comprimento do braço curto}}{\text{comprimento do lote haplóide}} \times 100$$

A partir dos valores dos índices centroméricos obtidos, os cromossomos foram classificados nas diferentes categorias sugeridas por LEVAN et al. (1964) e GUERRA FILHO (1988).

As médias do comprimento absoluto e relativo de

cada cromossomo, nas três espécies de café, foram comparadas pelo teste paramétrico de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, segundo o modelo descrito em GOMES (1985).

4. RESULTADOS

4.1. MEDIDAS CROMOSSÔMICAS

Os valores das médias (\bar{X}), com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variações (CV), obtidos para o comprimento absoluto (em micrômetros) de cada cromossomo de células de endospermas estão agrupados nas TABELAS 1 e 2.

Devido à falta de uniformidade das fases mitóticas entre as espécies (os cromossomos de *C. racemosa* estão em prometáfase, enquanto que os cromossomos das outras duas espécies estão na metáfase) e dos tratamentos empregados (os cromossomos de *C. canephora* estão corados pela solução de Giemsa, e os cromossomos das outras duas espécies estão corados pelo bandamento-C) e também devido ao número diferente de ideogramas conseguidos, não foram realizadas análises comparativas entre as médias dos cromossomos de cada espécie das TABELAS 1 e 2.

Já os valores das médias (\bar{X}) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), obtidos para o comprimento absoluto, para o comprimento relativo e para os valores dos índices centroméricos de cada cromossomo de células de radículas estão agrupados nas TABELAS de 3 a 5. Nessas tabelas constam também o tipo do cromossomo, segundo a classificação proposta por LEVAN et al. (1964) e mencionada em GUERRA FILHO (1988b), para as três espécies de café estudadas e como descritas a seguir:

- *C. canephora* var. *Robusta*: os valores das médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos de células de radículas (TABELA 3) variaram de $0,85 \pm 0,03 \mu\text{m}$, para o menor, a $2,38 \pm 0,07 \mu\text{m}$ para o maior cromossomo. Os valores médios dos comprimentos relativos variaram de $5,03 \pm 0,19$ para o menor, a $14,00 \pm 0,23$ para o maior cromossomo. Pelo cálculo dos índices centroméricos, os cromossomos de números 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9, são submetacêntricos, enquanto que os cromossomos de números 5, 10 e 11 são metacêntricos.

- *C. deweyrei* var. *excelsa*: os valores das médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos (TABELA 4) variaram de $0,83 \pm 0,02 \mu\text{m}$ para o menor, a $2,03 \pm 0,06 \mu\text{m}$ para o maior cromossomo. Já os valores dos comprimentos relativos variaram de $5,40 \pm 0,15$ para o menor, a $13,23 \pm 0,24$ para o maior cromossomo. Pelo cálculo do índice centromérico, os cromossomos de números 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 são submetacêntricos, enquanto que os cromossomos de números 5, 10 e 11 são metacêntricos.

- *C. racemosa*: para esta espécie, os valores das médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos (TABELA 5) variaram de $0,79 \pm 0,04 \mu\text{m}$ para o menor, a $1,96 \pm 0,06 \mu\text{m}$ para o maior cromossomo. Já os valores médios dos comprimentos relativos variaram de $5,47 \pm 0,21$ para o menor, a $13,66 \pm 0,37$ para o maior cromossomo. Pelo cálculo dos índices centroméricos, os cromossomos de números 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 são submetacêntricos, enquanto que os cromossomos de números 5, 10 e 11 são metacêntricos.

O emprego do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, entre as médias dos comprimentos absolutos e relativos dos cromossomos metafásicos de células de radículas das espécies estudadas, mostrou que há diferenças nítidas entre as mesmas (TABELAS 6 e 7).

Essas diferenças são, entretanto, mais abrangentes quando se consideram os valores médios dos comprimentos absolutos dos cromossomos. Pelo comprimento relativo (%), notou-se uma gradação contínua nos valores médios dos cromossomos dentro de cada espécie.

Os resultados revelaram também que as medidas do comprimento absoluto dos cromossomos das células de endospermas foram maiores do que as medidas obtidas para o comprimento absoluto dos cromossomos de células de radículas, o que será discutido posteriormente.

TABELA 1: Cromossomos metafásicos de células de endospermas de *C. canephora* e de *C. dewevrei*. Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros), com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV).

| cromossomo | <i>C. canephora</i> | | | <i>C. dewevrei</i> | | |
|------------|---------------------|----|------|--------------------|----|------|
| | \bar{X} | DP | CV | \bar{X} | DP | CV |
| 1 | 3,54 ± 0,13 | | 3,67 | 3,33 ± 0,05 | | 1,50 |
| 2 | 3,24 ± 0,15 | | 4,63 | 3,03 ± 0,08 | | 2,64 |
| 3 | 3,00 ± 0,14 | | 4,67 | 2,86 ± 0,07 | | 2,45 |
| 4 | 2,85 ± 0,09 | | 3,16 | 2,67 ± 0,01 | | 0,37 |
| 5 | 2,73 ± 0,07 | | 2,56 | 2,53 ± 0,08 | | 3,16 |
| 6 | 2,58 ± 0,08 | | 3,10 | 2,45 ± 0,09 | | 3,67 |
| 7 | 2,38 ± 0,15 | | 6,30 | 2,36 ± 0,08 | | 3,39 |
| 8 | 2,33 ± 0,11 | | 4,72 | 2,19 ± 0,07 | | 3,20 |
| 9 | 2,19 ± 0,12 | | 5,48 | 2,05 ± 0,05 | | 2,44 |
| 10 | 2,07 ± 0,11 | | 5,31 | 1,86 ± 0,06 | | 3,23 |
| 11 | 1,97 ± 0,10 | | 5,08 | 1,73 ± 0,06 | | 3,47 |

TABELA 2: Cromossomos prometafásicos de células de endospermas de *C. racemosa*. Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetros) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV).

| cromossomo | \bar{X} | DP | CV |
|------------|-------------|----|------|
| 1 | 4,06 ± 0,08 | | 1,97 |
| 2 | 3,61 ± 0,08 | | 2,22 |
| 3 | 3,32 ± 0,11 | | 3,31 |
| 4 | 3,04 ± 0,10 | | 3,29 |
| 5 | 2,71 ± 0,08 | | 2,95 |
| 6 | 2,57 ± 0,07 | | 2,72 |
| 7 | 2,37 ± 0,09 | | 3,80 |
| 8 | 2,24 ± 0,06 | | 2,68 |
| 9 | 2,10 ± 0,04 | | 1,90 |
| 10 | 2,03 ± 0,06 | | 2,96 |
| 11 | 1,72 ± 0,05 | | 2,91 |

TABELA 3: Cromossomos metafásicos de radículas de *C. canephora*. Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetro) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN et al. (1964).

| cromossomo | <u>Comp. Abs. (μm)</u> | | | <u>Comp. Rel. (%)</u> | | |
|------------|--|----|------|-----------------------|----|------|
| | \bar{X} | DP | CV | \bar{X} | DP | CV |
| 1 | 2,38 \pm 0,07 | | 2,94 | 14,00 \pm 0,23 | | 1,64 |
| 2 | 2,03 \pm 0,06 | | 2,96 | 11,98 \pm 0,21 | | 1,75 |
| 3 | 1,91 \pm 0,05 | | 2,62 | 11,20 \pm 0,19 | | 1,70 |
| 4 | 1,73 \pm 0,04 | | 2,31 | 10,19 \pm 0,11 | | 1,08 |
| 5 | 1,66 \pm 0,04 | | 2,45 | 9,78 \pm 0,11 | | 1,12 |
| 6 | 1,50 \pm 0,02 | | 1,33 | 8,86 \pm 0,15 | | 1,69 |
| 7 | 1,41 \pm 0,03 | | 2,13 | 8,34 \pm 0,12 | | 1,44 |
| 8 | 1,28 \pm 0,02 | | 1,56 | 7,57 \pm 0,12 | | 1,59 |
| 9 | 1,18 \pm 0,03 | | 2,54 | 6,96 \pm 0,15 | | 2,16 |
| 10 | 1,03 \pm 0,03 | | 2,91 | 6,10 \pm 0,14 | | 2,30 |
| 11 | 0,85 \pm 0,03 | | 3,53 | 5,03 \pm 0,19 | | 3,47 |

| cromossomo | <u>IC</u> | | | <u>Tipo</u> |
|------------|------------------|----|------|-------------|
| | \bar{X} | DP | CV | |
| 1 | 25,59 \pm 0,59 | | 2,29 | SM |
| 2 | 26,80 \pm 0,65 | | 2,41 | SM |
| 3 | 25,07 \pm 0,99 | | 3,95 | SM |
| 4 | 27,09 \pm 1,29 | | 4,77 | SM |
| 5 | 42,30 \pm 1,41 | | 3,33 | M |
| 6 | 30,76 \pm 1,42 | | 4,61 | SM |
| 7 | 30,31 \pm 1,18 | | 3,89 | SM |
| 8 | 29,15 \pm 0,74 | | 2,53 | SM |
| 9 | 32,23 \pm 0,86 | | 2,67 | SM |
| 10 | 50,00 \pm 0,00 | | 0,00 | M |
| 11 | 49,60 \pm 0,40 | | 0,81 | M |

SM = cromossomo submetacêntrico

M = cromossomo metacêntrico

TABELA 4: Cromossomos metafásicos de radículas de *C. deweyrei*. Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetro) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN *et al.* (1964).

| cromossomo | <u>Comp. Abs. (μm)</u> | | | <u>Comp. Rel. (%)</u> | | |
|------------|--|----|------|-----------------------|----|------|
| | \bar{X} | DP | CV | \bar{X} | DP | CV |
| 1 | 2,03 \pm 0,06 | | 2,96 | 13,23 \pm 0,24 | | 1,81 |
| 2 | 1,86 \pm 0,07 | | 3,76 | 12,08 \pm 0,23 | | 1,90 |
| 3 | 1,72 \pm 0,06 | | 3,49 | 11,15 \pm 0,15 | | 1,35 |
| 4 | 1,59 \pm 0,04 | | 2,52 | 10,37 \pm 0,18 | | 1,74 |
| 5 | 1,51 \pm 0,06 | | 3,97 | 9,74 \pm 0,23 | | 2,36 |
| 6 | 1,38 \pm 0,04 | | 2,90 | 8,96 \pm 0,25 | | 2,79 |
| 7 | 1,29 \pm 0,04 | | 3,10 | 8,42 \pm 0,19 | | 2,26 |
| 8 | 1,23 \pm 0,03 | | 2,44 | 7,95 \pm 0,21 | | 2,64 |
| 9 | 1,15 \pm 0,03 | | 2,61 | 7,45 \pm 0,17 | | 2,28 |
| 10 | 0,98 \pm 0,03 | | 3,06 | 6,48 \pm 0,13 | | 2,02 |
| 11 | 0,83 \pm 0,02 | | 2,41 | 5,40 \pm 0,15 | | 2,78 |

| cromossomo | <u>IC</u> | | | <u>Tipo</u> |
|------------|------------------|----|------|-------------|
| | \bar{X} | DP | CV | |
| 1 | 26,65 \pm 1,54 | | 5,78 | SM |
| 2 | 29,57 \pm 1,53 | | 5,17 | SM |
| 3 | 25,04 \pm 0,94 | | 3,85 | SM |
| 4 | 31,00 \pm 1,77 | | 5,73 | SM |
| 5 | 42,10 \pm 1,43 | | 3,41 | M |
| 6 | 30,81 \pm 1,78 | | 5,79 | SM |
| 7 | 30,85 \pm 1,67 | | 5,42 | SM |
| 8 | 31,42 \pm 1,00 | | 3,18 | SM |
| 9 | 31,09 \pm 1,29 | | 4,16 | SM |
| 10 | 47,42 \pm 1,16 | | 2,45 | M |
| 11 | 49,12 \pm 0,59 | | 1,20 | M |

SM = cromossomo submetacêntrico

M = cromossomo metacêntrico

TABELA 5: Cromossomos metafásicos de radículas de *C. racemosa*. Médias (\bar{X}) dos comprimentos absolutos (em micrômetro) e relativos (%) e dos índices centroméricos (IC) com os respectivos desvios padrões (DP) e coeficientes de variação (CV), além do tipo do cromossomo, segundo o conceito de LEVAN *et al.* (1964).

| cromossomo | <u>Comp. Abs. (μm)</u> | | | <u>Comp. Rel. (%)</u> | | |
|------------|--|----|------|-----------------------|----|------|
| | \bar{X} | DP | CV | \bar{X} | DP | CV |
| 1 | 1,96 \pm 0,06 | | 1,02 | 13,66 \pm 0,37 | | 2,71 |
| 2 | 1,70 \pm 0,03 | | 1,76 | 11,86 \pm 0,24 | | 2,02 |
| 3 | 1,64 \pm 0,02 | | 1,22 | 11,44 \pm 0,23 | | 2,01 |
| 4 | 1,43 \pm 0,05 | | 3,50 | 9,92 \pm 0,18 | | 1,81 |
| 5 | 1,35 \pm 0,06 | | 4,44 | 9,30 \pm 0,23 | | 2,47 |
| 6 | 1,29 \pm 0,04 | | 3,10 | 8,93 \pm 0,13 | | 1,46 |
| 7 | 1,24 \pm 0,05 | | 4,03 | 8,57 \pm 0,12 | | 1,40 |
| 8 | 1,16 \pm 0,04 | | 3,45 | 8,30 \pm 0,11 | | 1,37 |
| 9 | 1,10 \pm 0,04 | | 3,64 | 7,55 \pm 0,11 | | 1,46 |
| 10 | 0,87 \pm 0,03 | | 3,45 | 6,13 \pm 0,24 | | 3,93 |
| 11 | 0,79 \pm 0,04 | | 5,06 | 5,47 \pm 0,21 | | 3,84 |

| cromossomo | <u>IC</u> | | | <u>Tipo</u> |
|------------|------------------|----|-------|-------------|
| | \bar{X} | DP | CV | |
| 1 | 26,52 \pm 1,64 | | 6,18 | SM |
| 2 | 29,32 \pm 1,57 | | 5,35 | SM |
| 3 | 27,71 \pm 1,62 | | 5,85 | SM |
| 4 | 30,74 \pm 4,60 | | 15,00 | SM |
| 5 | 43,38 \pm 1,54 | | 0,35 | M |
| 6 | 33,39 \pm 1,96 | | 5,87 | SM |
| 7 | 34,01 \pm 1,14 | | 3,35 | SM |
| 8 | 31,50 \pm 1,70 | | 5,40 | SM |
| 9 | 29,44 \pm 0,93 | | 3,16 | SM |
| 10 | 50,00 \pm 0,00 | | 0,00 | M |
| 11 | 50,00 \pm 0,00 | | 0,00 | M |

SM = cromossomo submetacêntrico

M = cromossomo metacêntrico

TABELA 6: Teste de Tukey para as médias dos comprimentos absolutos (em micrômetro) dos cromossomos metafásicos de células de radículas de *C. canephora*, *C. deweyrei* e de *C. racemosa*.

| | <i>C. canephora</i> | <i>C. deweyrei</i> | <i>C. racemosa</i> |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| cromossomo | | | |
| 1 | 2,38 ^a | 2,03 ^b | 1,96 ^b |
| 2 | 2,03 ^a | 1,86 ^b | 1,70 ^c |
| 3 | 1,91 ^a | 1,72 ^b | 1,64 ^b |
| 4 | 1,73 ^a | 1,59 ^b | 1,43 ^c |
| 5 | 1,66 ^a | 1,51 ^a | 1,35 ^b |
| 6 | 1,50 ^a | 1,33 ^b | 1,29 ^b |
| 7 | 1,41 ^a | 1,29 ^b | 1,24 ^b |
| 8 | 1,28 ^a | 1,23 ^a | 1,18 ^a |
| 9 | 1,18 ^a | 1,15 ^{ab} | 1,10 ^b |
| 10 | 1,08 ^a | 0,98 ^a | 0,87 ^b |
| 11 | 0,85 ^a | 0,83 ^a | 0,79 ^a |

Médias seguidas por letras diferentes diferem ao nível de 5%.

Médias seguidas por letras iguais não diferem ao nível de 5%.

TABELA 7: Teste de Tukey para as médias dos comprimentos relativos (%) dos cromossomos metafásicos de células de radículas de *C. canephora*, *C. deweyrei* e de *C. racemosa*.

| | <i>C. canephora</i> | <i>C. deweyrei</i> | <i>C. racemosa</i> |
|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| cromossomo | | | |
| 1 | 14,00 ^a | 13,23 ^b | 13,66 ^{ab} |
| 2 | 11,98 ^a | 12,08 ^a | 11,86 ^a |
| 3 | 11,20 ^a | 11,15 ^a | 11,44 ^a |
| 4 | 10,19 ^{ab} | 10,37 ^a | 9,92 ^b |
| 5 | 9,78 ^{ab} | 9,74 ^a | 9,30 ^b |
| 6 | 8,86 ^a | 8,96 ^a | 8,93 ^a |
| 7 | 8,34 ^a | 8,42 ^a | 8,57 ^a |
| 8 | 7,57 ^a | 7,95 ^b | 8,03 ^b |
| 9 | 6,96 ^a | 7,45 ^b | 7,55 ^b |
| 10 | 6,10 ^a | 6,42 ^a | 6,13 ^a |
| 11 | 5,03 ^a | 5,40 ^{ab} | 5,47 ^b |

Médias seguidas por letras diferentes diferem ao nível de 5%.

Médias seguidas por letras iguais não diferem ao nível de 5%.

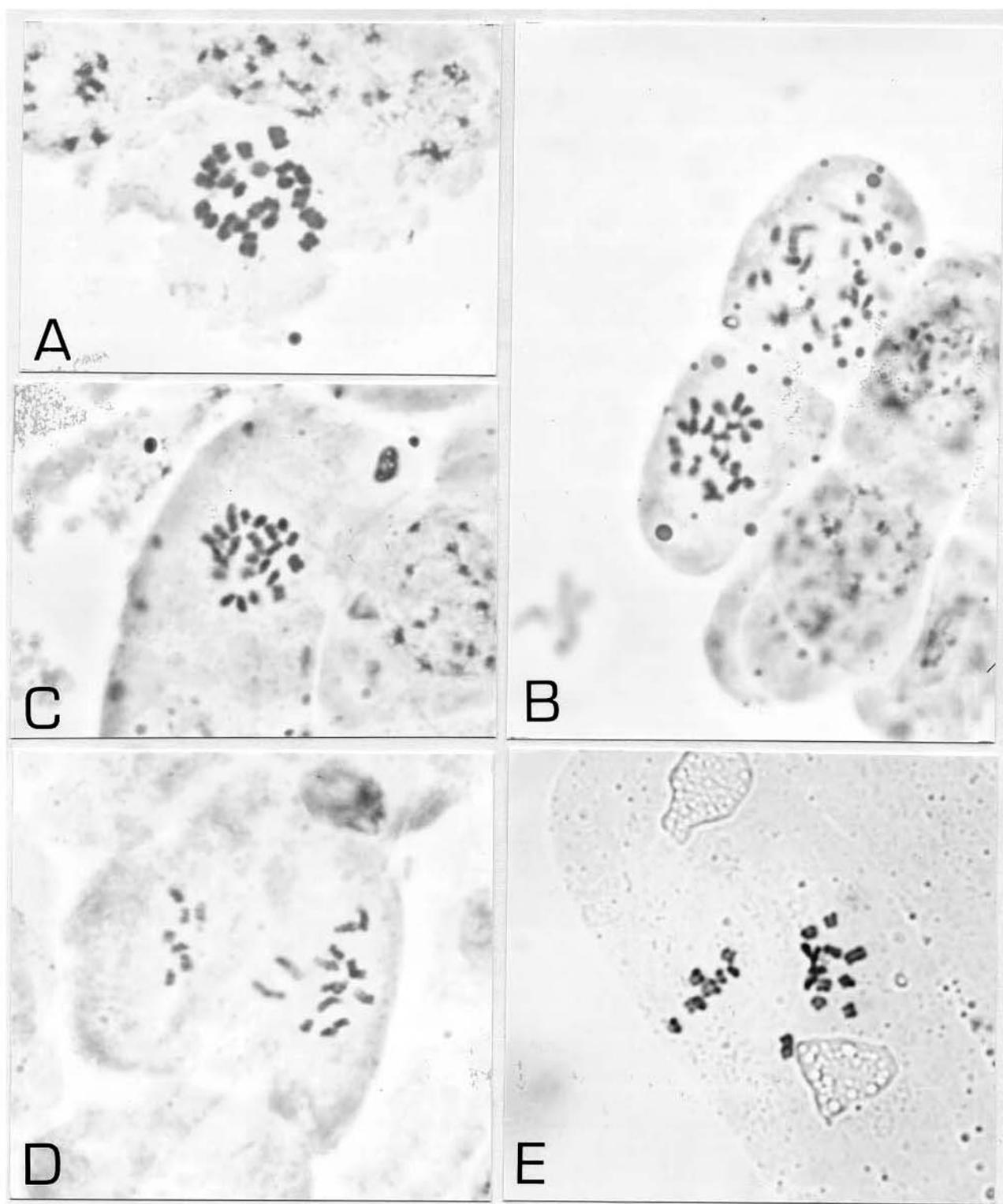


FIGURA 1: Fotomicrografias dos cromossomos metafásicos de células de radículas de *Coffea*, corados pelo método da orceína acética.

Fotos A e B: *C. canephora* (X 2000); fotos C: *C. dewevrei* (X 2000) e fotos D e E: *C. racemosa* (X 2000).

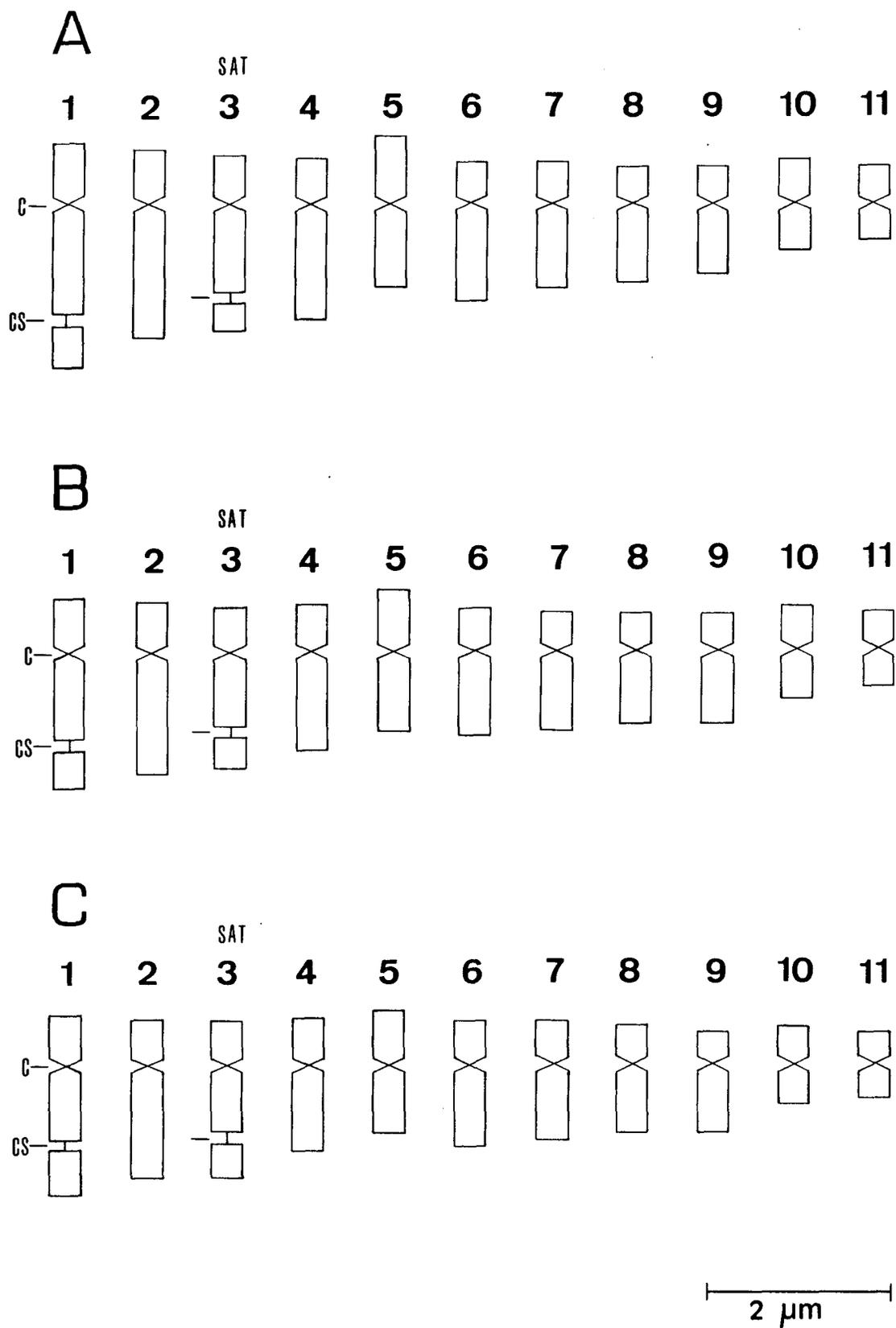


FIGURA 2: Ideogramas de *Coffea* obtidos a partir de cromossomos metafásicos de células de radículas e corados pela orceína acética.

A: *C. canephora*; B: *C. deweyrei*; C: *C. racemosa*.

CS = constrição secundária e C = centrômero.

4.2. BANDAMENTO

O emprego da técnica de bandamento-C, da enzima proteolítica tripsina e da impregnação pela prata, além da coloração simples pelo Giemsa, em *Coffea canephora*, *C. dewevrei* e em *C. racemosa*, resultou na formação de bandas coradas ou de segmentos impregnados ao longo dos cromossomos mitóticos (FIGURAS de 1 a 21).

Devido às facilidades apresentadas na obtenção de endospermas, bem como na preparação citológica dos mesmos, os resultados positivos que se tem pelo emprego das diferentes metodologias de bandamento, ficaram restritos essencialmente aos cromossomos desse tecido.

Através das análises das células obtidas, constatou-se que houve o aparecimento predominante de bandas pericentroméricas e teloméricas, ocorrendo com menor freqüência as bandas intercaladas e as centroméricas, independente da espécie de café estudada.

Foi visto, entre os ideogramas, um acentuado heteromorfismo de bandas (número e posição das mesmas em um determinado cromossomo ou conjunto de cromossomos).

Independente da técnica de bandamento empregada ou da espécie de café considerada, os cromossomos de números 1, 2 e 3 se destacaram dentro dos genomas não somente por terem as maiores medidas de comprimento (TABELAS 1 e 2) como também pelo fato dos cromossomos 1 e 3 possuírem constrictões primária e secundária localizadas proporcionalmente nos mesmos pontos dentro dos cromossomos. O cromossomo 3 difere do cromossomo 1 por possuir a sua constrictão secundária associada à região do organizador nucleolar (RON) e apresentar um segmento satélite (SAT) bastante nítido (FIGURAS 16 e 17).

A despeito de se ter trabalhado com um número elevado de lâminas preparadas para o bandamento e das repetições efetuadas em cada metodologia, dentro de cada uma das espécies, verificou-se certa heterogeneidade quanto ao número de células com cromossomos bandados.

Enfrentou-se também certa dificuldade na obten-

ção de células metafásicas nos endospermas de *C. racemosa*. O número baixo (3 células) de células selecionadas nesta fase de divisão foi provavelmente devido a menor atividade mitótica verificada nos endospermas desta espécie. Além disso, as poucas células mitóticas encontradas apareciam com os cromossomos mal espalhados, muitos deles sobrepostos, impedindo a esquematização dos mesmos para identificação. Neste caso, optou-se pelas células prometáfásicas que apresentavam melhor espalhamento cromossômico, embora restringissem as comparações cariotípicas a nível de comprimento cromossômico com as outras duas espécies estudadas.

4.2.1. Bandamento-C

Coffea canephora var. *Robusta* (Linden) Chev.

Os resultados positivos alcançados após o emprego da técnica de banda-C nos cromossomos mitóticos desta espécie ficaram restritos, a despeito do empenho, a duas células do endosperma e a duas células da radícula (FIGURAS 2B e de 8 a 11).

O número de bandas presentes nas células variou de 11 a 15, sendo que algumas bandas formadas e que foram consideradas como únicas, poderiam ser resultantes da fusão de duas bandas adjacentes como acontece com as bandas pericentroméricas presentes nos cromossomos 2 e 6 (FIGURA 11).

Os cromossomos de números 1, 8 e 10 mostraram bastante heteromorfismo, enquanto que os cromossomos 2, 4, 6 e 9 tiveram um padrão de bandas-C quase que constante (FIGURAS 8 a 11).

O cromossomo 7 das células da radícula mostrou ausência de bandas.

A caracterização parcial dos cromossomos foi a que se segue:

- cromossomo 1: submetacêntrico. O braço longo possui uma constrição secundária não associada ao organizador do nucléolo em

posição quase terminal. Presença de uma a duas bandas, sendo que uma ocorre preferencialmente no segmento acima da constrição secundária. A segunda banda pode aparecer sozinha, em posição intercalada entre as constrições primária e secundária, ou em associação com a banda telomérica. Pode também ocorrer uma banda no braço curto.

- cromossomo 2: submetacêntrico. Formação de duas bandas pericentroméricas, isto é, uma em cada braço cromossômico e flanqueando o centrômero. Estas bandas podem se apresentar unidas, formando uma única banda e encobrindo o centrômero.

- cromossomo 3: submetacêntrico e constrição secundária localizada no final do braço longo. É o cromossomo portador da RON. O segmento SAT se cora totalmente com o emprego da banda-C. Apresenta também uma banda intercalada entre as constrições primária e secundária.

- cromossomo 4: submetacêntrico. Apresenta duas bandas pericentroméricas de profundidades variáveis.

- cromossomo 5: metacêntrico. Foi constatada a formação de uma banda telomérica em um dos braços e de uma banda adjacente ao centrômero no outro braço. Pode também aparecer variantes com bandas pericentroméricas.

- cromossomo 6: submetacêntrico. Este cromossomo é caracterizado pela formação de pelo menos uma banda adjacente ao centrômero. Quando se formam duas bandas pericentroméricas, estas, de acordo com o grau de condensação do cromossomo, podem ou não, estar unidas.

- cromossomo 7: submetacêntrico. Em um caso, apresentou duas bandas pericentroméricas. Nos demais, não apresentou banda.

- cromossomo 8: submetacêntrico. Com o braço curto todo, ou quase todo, corado podendo ter também uma banda adjacente ao

centrômero que ocorre no braço longo.

- cromossomo 9: submetacêntrico. Caracterizado pela presença de uma banda-C adjacente ao centrômero e que ocorre no braço longo.

- cromossomo 10: metacêntrico. Apresentou variações quanto à localização das bandas. Em três dos quatro ideogramas obtidos, constatou-se a presença de bandas pericentroméricas de extensão variada. Em um caso apenas anotou-se a presença de um banda que ocupou um dos braços do cromossomo.

- cromossomo 11: é metacêntrico e caracterizado pela presença de bandas pericentroméricas. Observou-se em uma célula que este cromossomo apresentava-se todo corado.

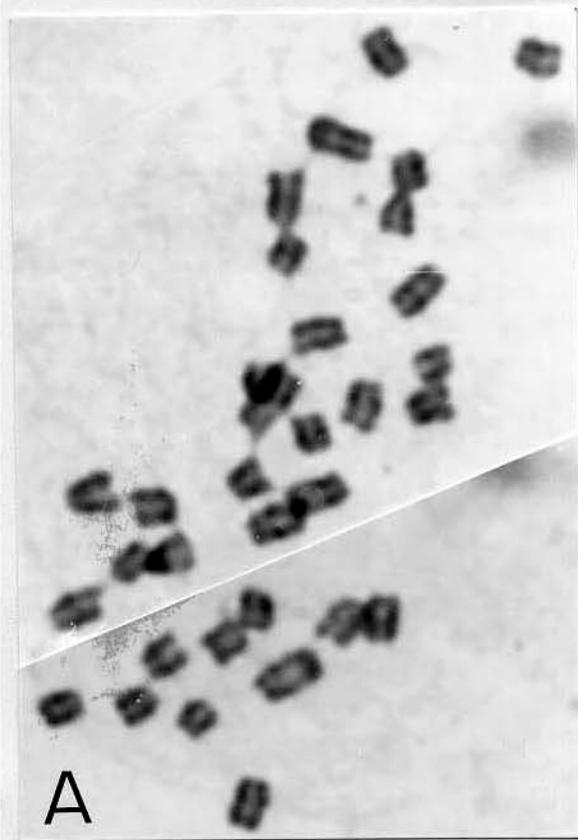
vide página seguinte →

FIGURA 3: Fotomicrografias dos cromossomos mitóticos de células de endospermas de *Coffea*, após o bandamento-C:

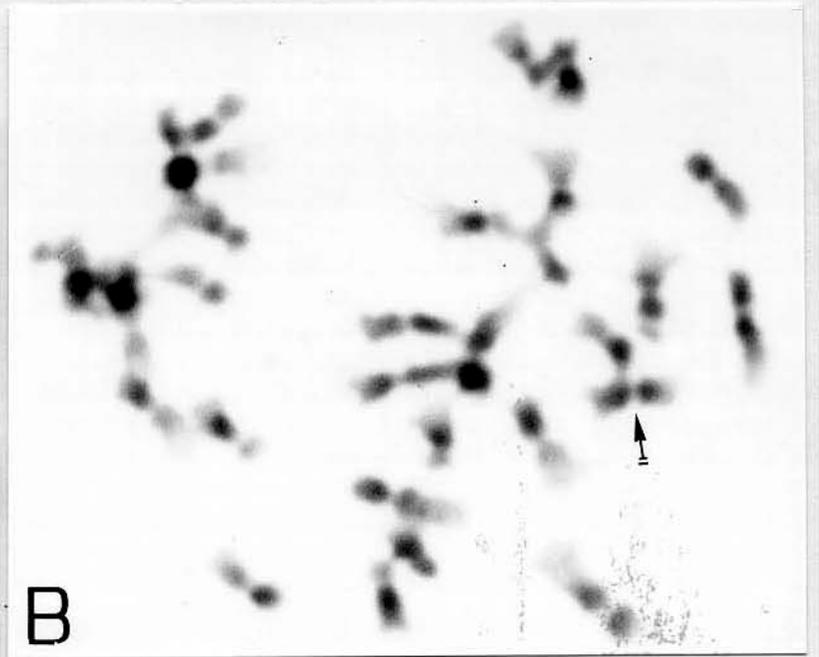
A, C, D - *C. dewevrei*, metáfase (A, X 2250; C e D, X 3125).

B - *C. dewevrei*, prometáfase (X 2559).

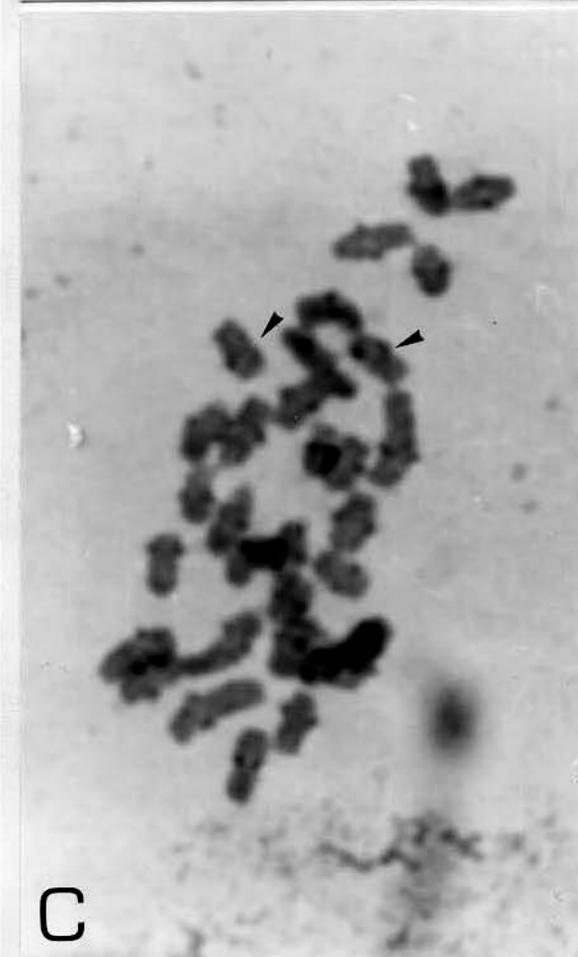
E - *C. racemosa*, prometáfase (X 2085). "▶ = banda pericentromérica em dois blocos separados pela constrição primária; ▶ = assimetria de banda.



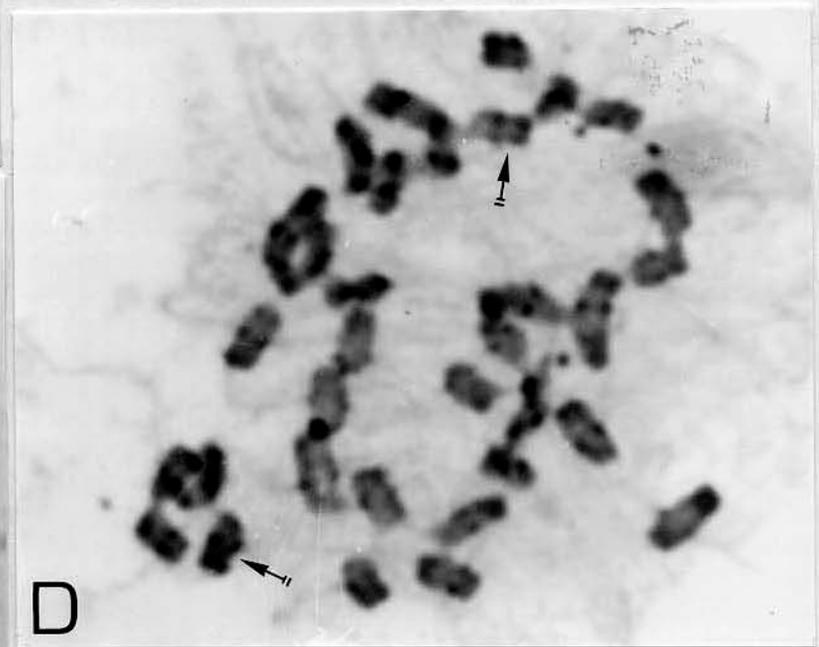
A



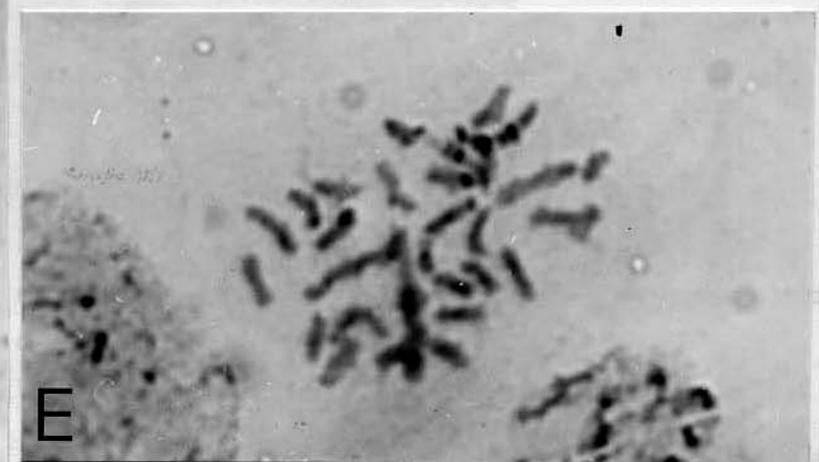
B



C



D



E

FIGURA 3: Legenda na página anterior.

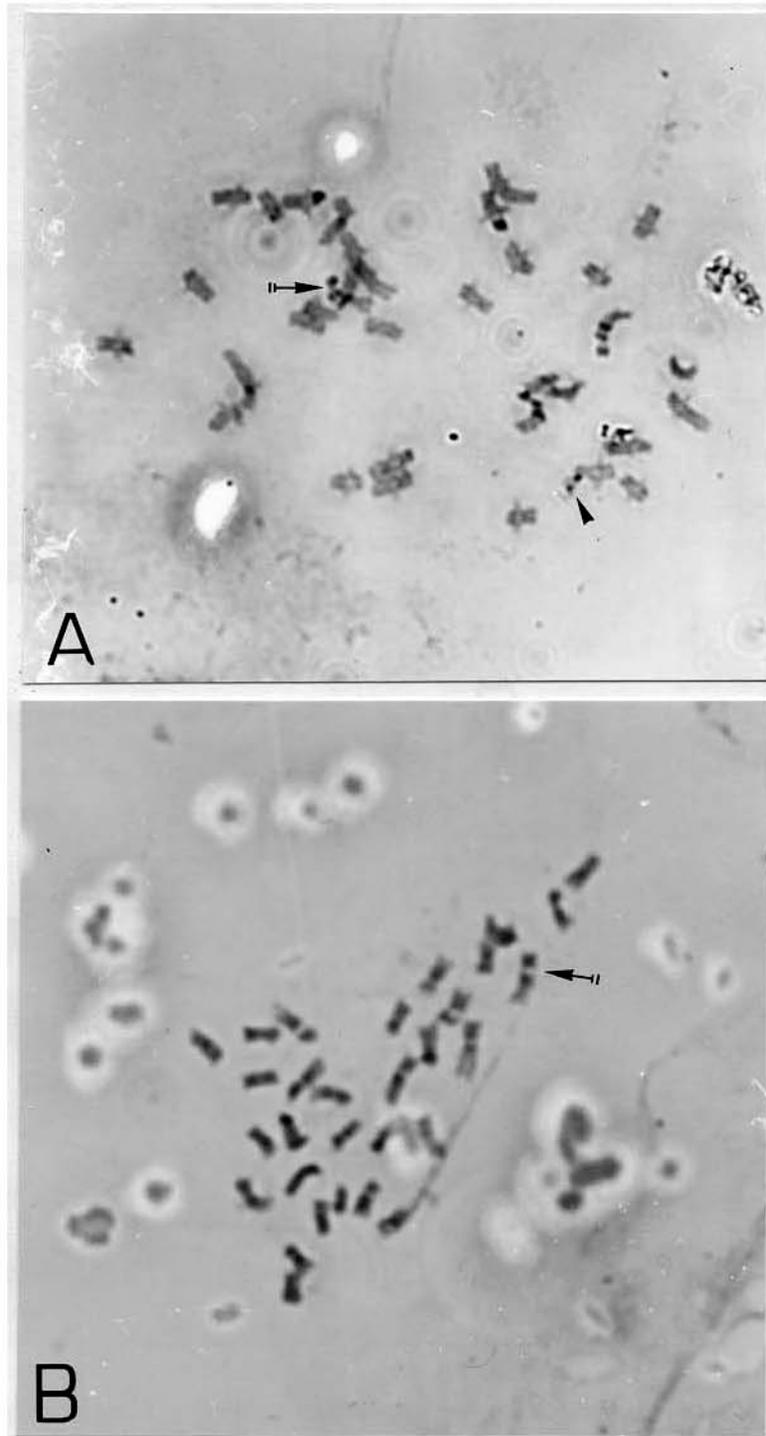


FIGURA 4: Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos de células do endosperma de *Coffea*, após o emprego do bandamento-C:

A - *C. racemosa*, metáfase (X 2085).

B - *C. canephora*, metáfase (X 2000).

↔ = banda pericentromérica em dois blocos separados pela constrição primária.

▶ = assimetria de banda.

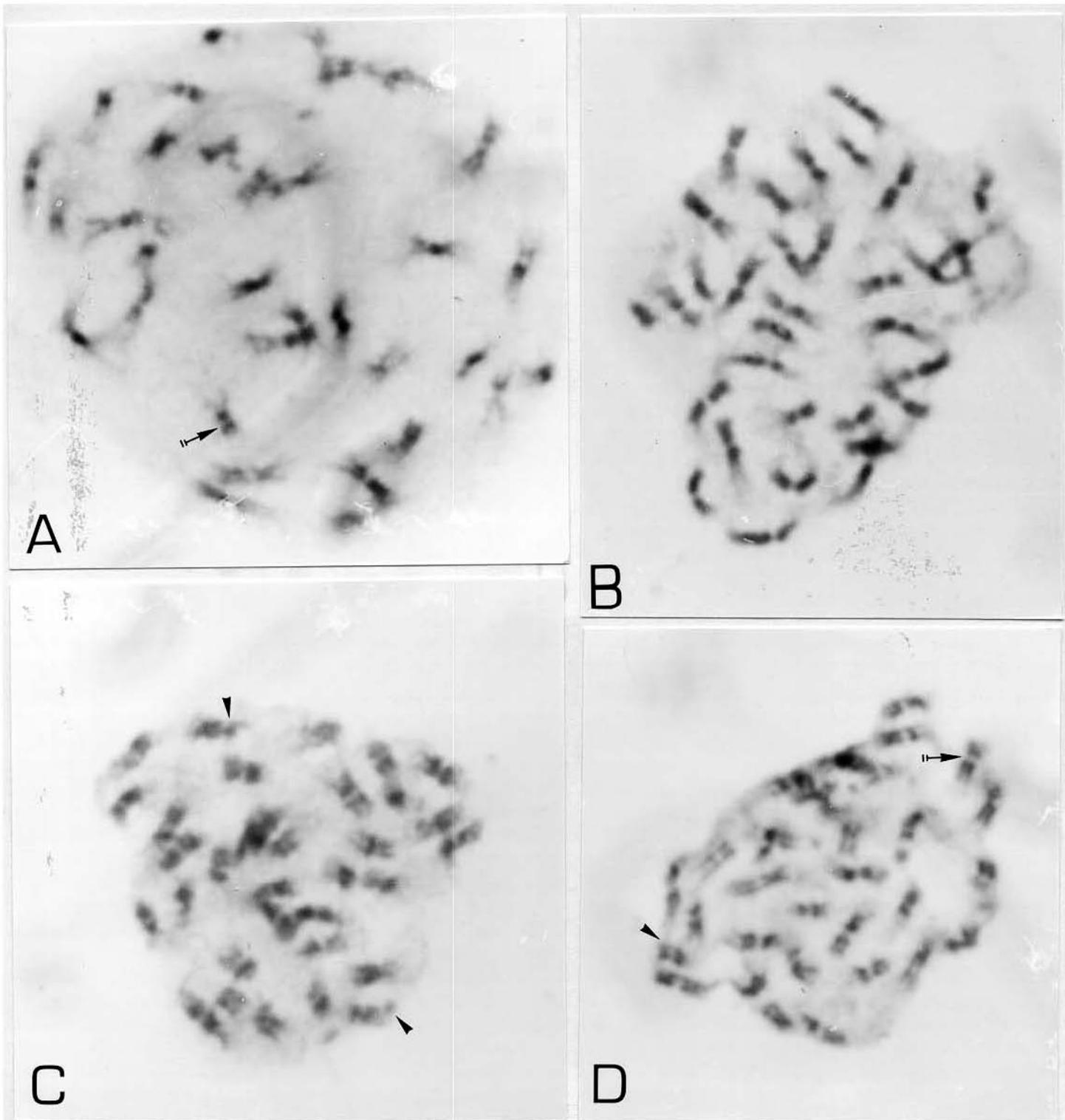
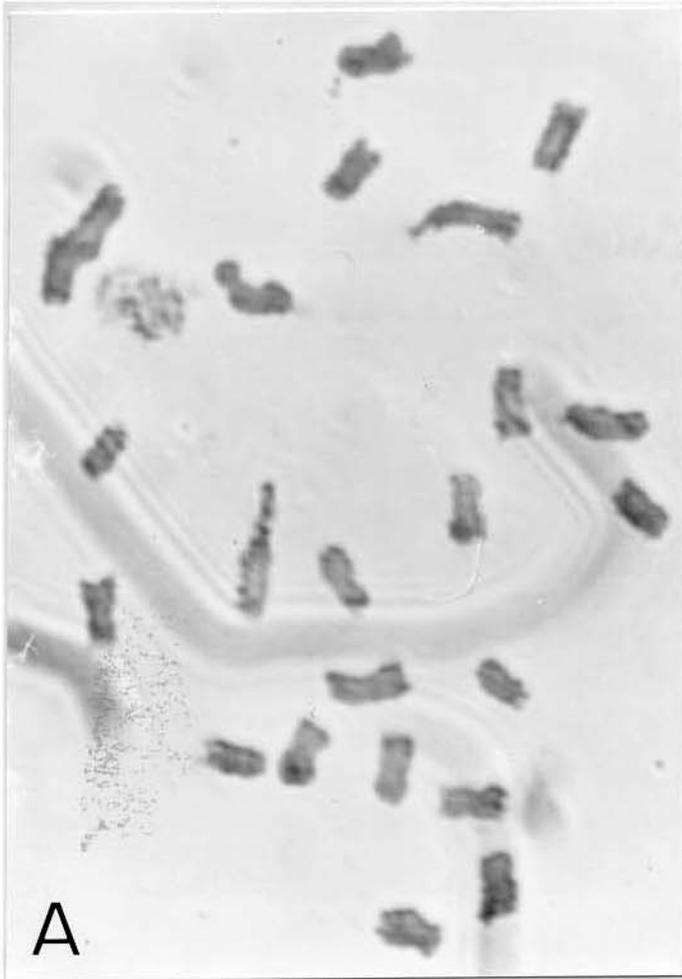


FIGURA 5: Fotomicrografia dos cromossomos em prometáfase de células de endospermas de *C. devevrei*, após o emprego de solução diluída de Giemsa apenas: *Coffea*, após a impregnação pela prata.

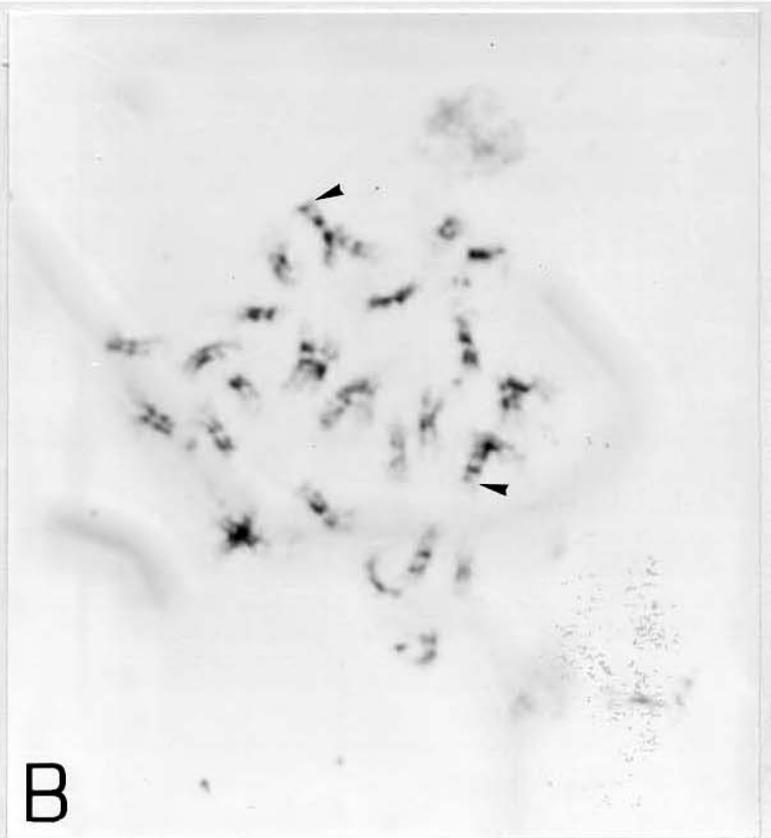
A - (X 2500); B - (X 2500); C - (X 3125); D - (X 2500).

↔ = banda pericentromérica em dois blocos separados pela constrição primária.

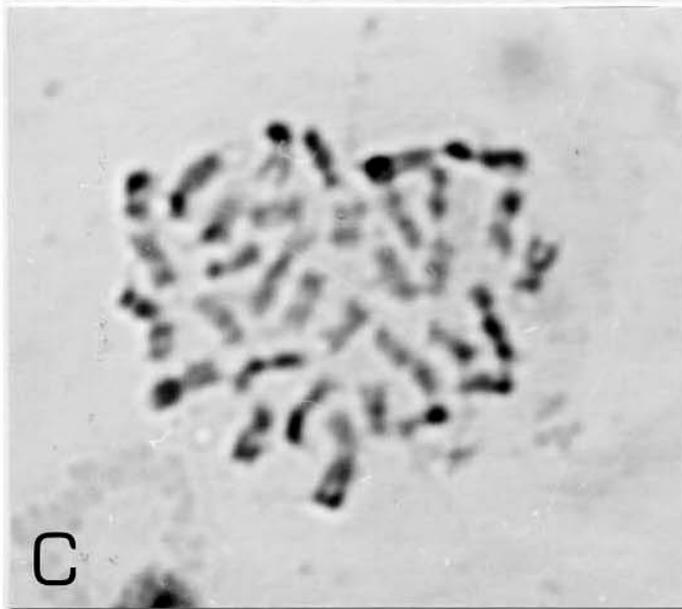
▶ = assimetria de banda.



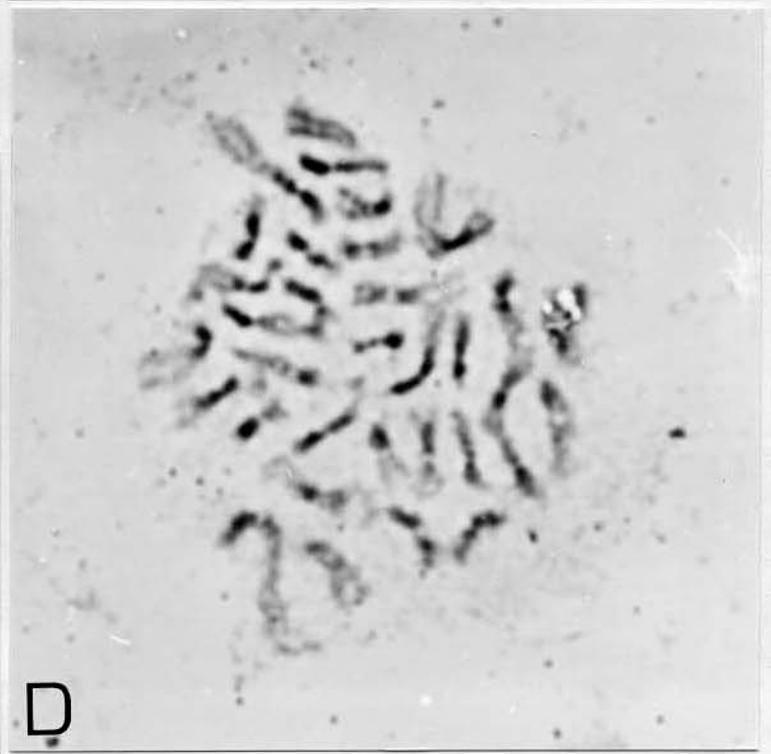
A



B



C



D

FIGURA 6: Fotomicrografia dos cromossomos mitóticos de células do endosperma de *Coffea*, após a impregnação pela prata.

A - *C. canephora*, metáfase (X 2500).

B e C - *C. dewevrei*, prometáfase (X 2500 e X 2300, respectivamente).

D - *C. racemosa*, prometáfase (X 2650).

▶ = assimetria de banda.

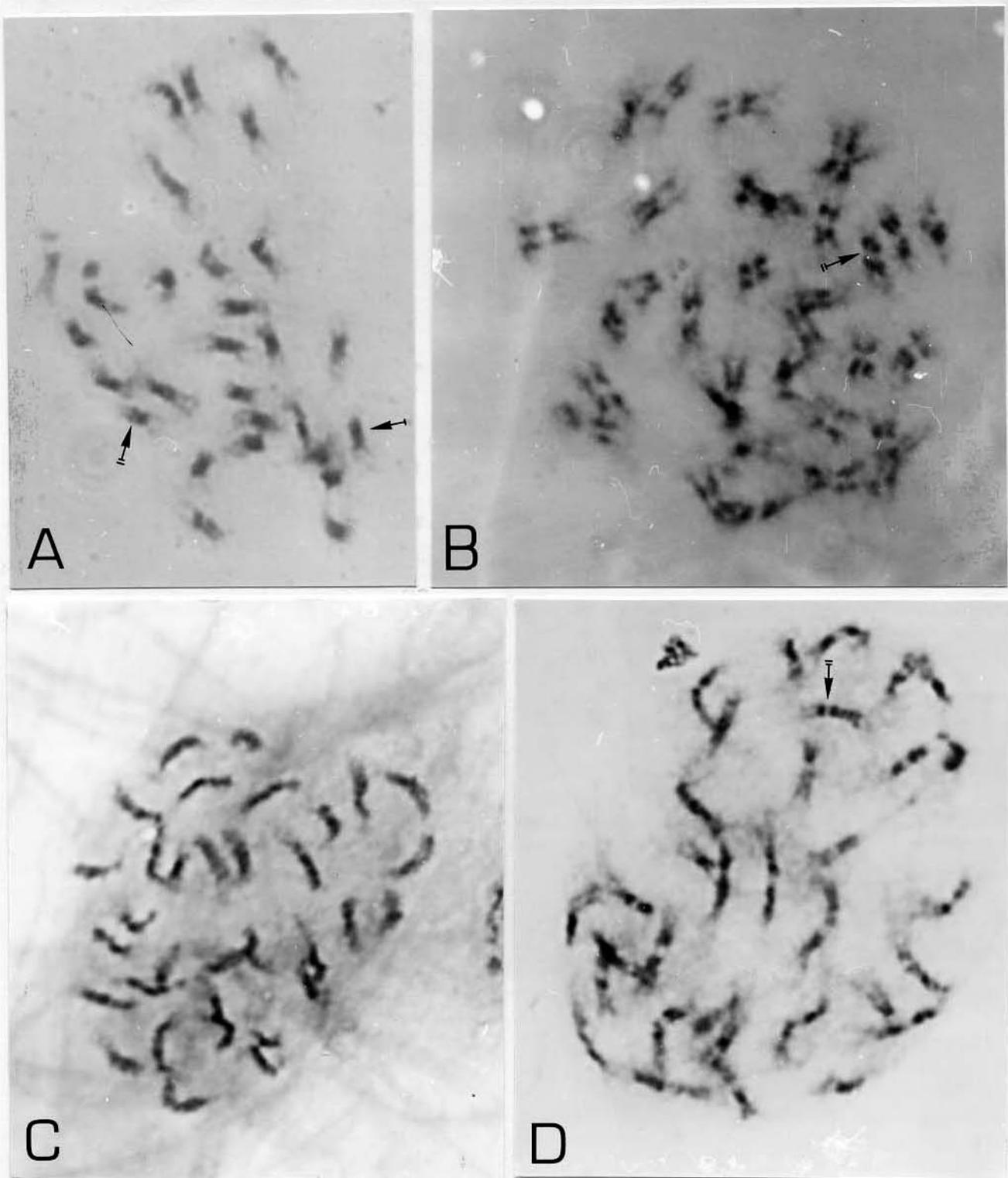


FIGURA 7: Fotomicrografia dos cromossomos prometafásicos de *Coffea*, após o emprego da tripsina:

A e B - *C. canephora* (X 2085).

C e D - *C. dewevrei* (X 2500 e X 3000, respectivamente).

→ = banda pericentromérica formando um só bloco.

⇌ = banda pericentromérica em dois blocos separados pela constrição primária.

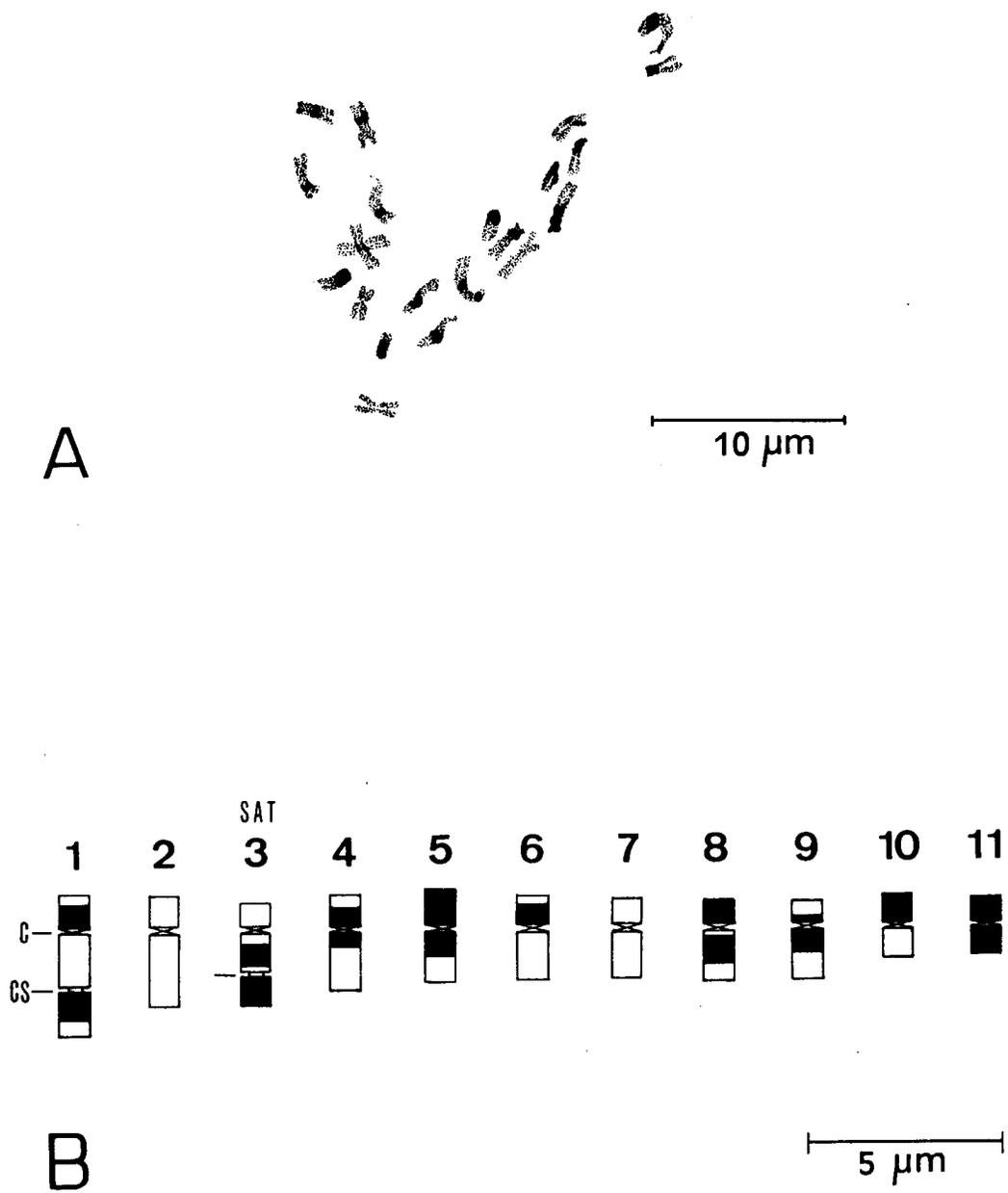


FIGURA 8: Desenho em câmara clara (A) e ideograma (B) dos cromossomos prometafásicos de uma célula de radícula de *Coffea canephora*, após o bandamento-C.

CS = constrição secundária.

C = centrômero.

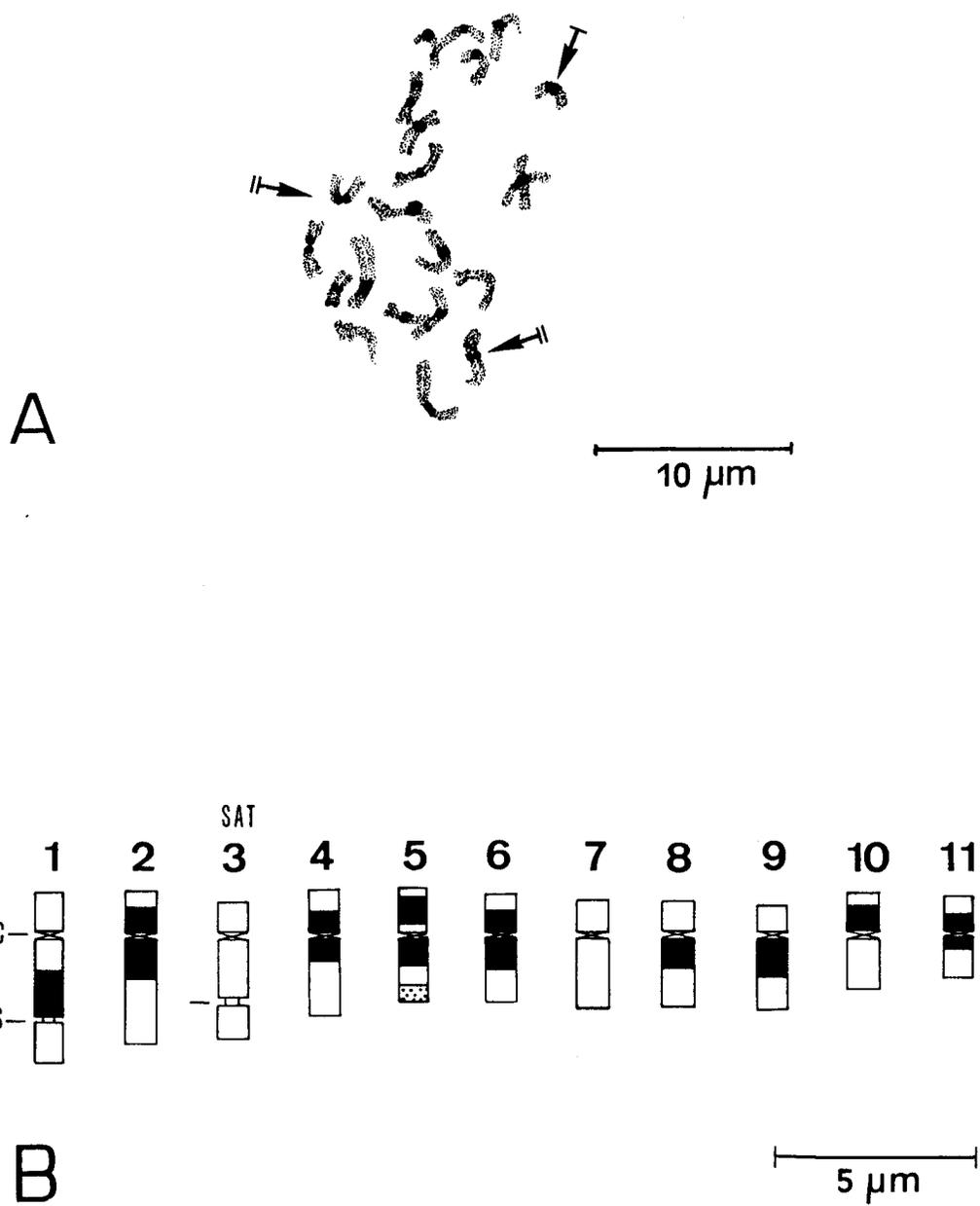


FIGURA 9: Desenho em câmara clara (A) e ideograma (B) dos cromossomos na prometáfase de uma célula de radícula de *C. canephora*, após o bandamento-C.

CS = constrição secundária; C = centrômero; ⊙ = banda clara; \rightarrow = banda pericentromérica formando um só bloco; $\parallel\rightarrow$ = banda pericentromérica formando dois blocos ao redor do centrômero.

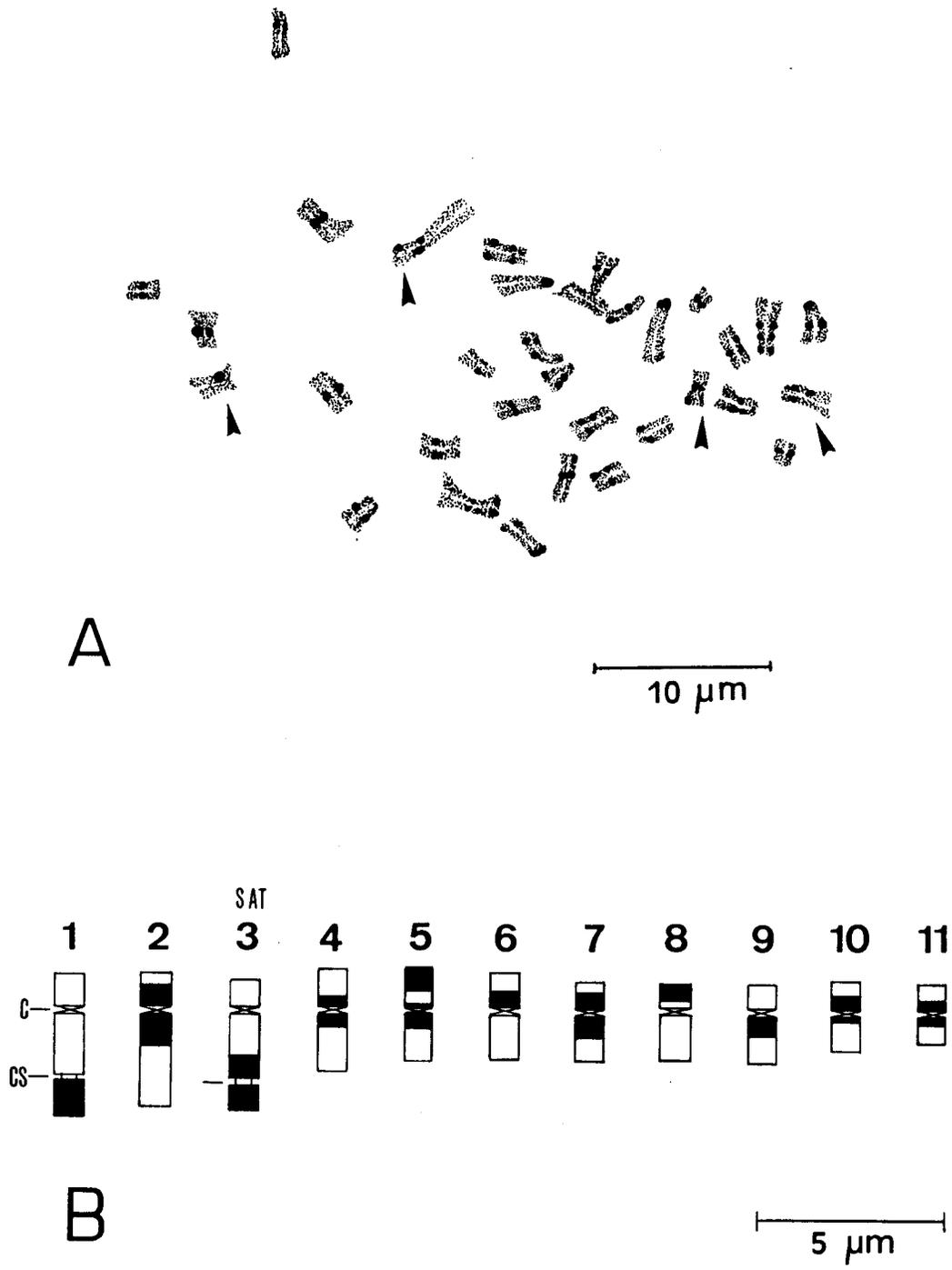


FIGURA 10: Desenho em câmara clara (A) e ideograma (B) dos cromossomos prometafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após o bandamento-C.

CS = constrição secundária; C = centrômero; ► = assimetria de bandas.

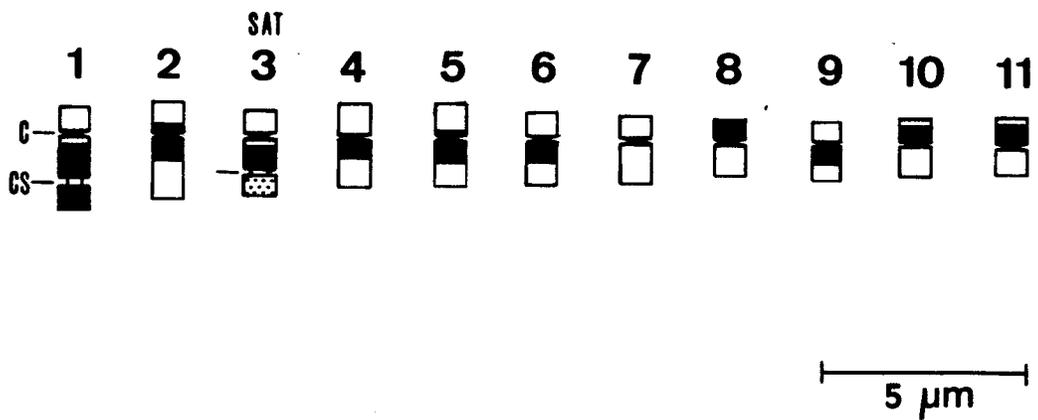


FIGURA 11: Ideograma dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após o bandamento-C.

CS = constrição secundária; C = centrômero; ⊗ = banda clara.

Coffea deweyrei variedade *excelsa* Chev.

As porcentagens médias da somatória de segmentos corados pelo bandamento-C e presentes nos ideogramas desta espécie foi de $37.19\% \pm 3.69$, para as células em prometáfase, e de $32.78\% \pm 1.90$, para as células em metáfase.

O número de bandas presentes em todos os cromossomos variou de 9 até 22, sendo a média obtida de $13.82\% \pm 1.10$; a classe mais freqüente tem 13 bandas.

A análise comparativa no ideograma médio obtido evidenciou variações no número e na posição das bandas-C formadas na maioria dos cromossomos (FIGURA 1, fotos A a D e FIGURA 12). Foram elaborados e analisados 20 ideogramas.

- cromossomo 1: submetacêntrico e constricção secundária no final do braço longo. Presença de uma banda que ocupa o segmento final acima da constricção secundária. Esta banda pode ocorrer isolada ou em combinação com outra intercalada entre as constricções primária e secundária; ou ainda, além da banda intercalada, ocorrer junto com uma banda telomérica no braço curto.

Observou-se que em 77% das células apresentaram a banda intercalada.

- cromossomo 2: submetacêntrico. Presença de duas bandas adjacentes ao centrômero, sendo que aquela que se forma no braço longo esteve presente em 85% das células.

Em alguns casos foi verificado também uma associação entre a banda do braço longo adjacente ao centrômero com uma banda telomérica.

- cromossomo 3: submetacêntrico. A constricção secundária no braço longo, é sub-terminal e, adjacente a ela, se encontra o satélite (SAT). É caracterizado por uma banda que ocupa, na maioria dos casos, toda a região SAT e também por uma banda intercalada entre as constricções primária e secundária (85% dos ideogramas). Algumas vezes, associado às bandas SAT e intercalada, o braço curto aparece todo corado. Outras vezes,

esta banda intercalada aparece sozinha. A porcentagem de ocorrência da banda intercalada foi aproximadamente de 90%.

- cromossomo 4: submetacêntrico. Foram anotadas as seguintes variações quanto à formação das bandas: (1) duas adjacentes ao centrômero, (45%); (2) uma telomérica (13,5%); (3) uma telomérica associada a uma pericentromérica (1 célula); (4) duas teloméricas (1 célula); (5) duas teloméricas e uma pericentromérica (1 célula).

- cromossomo 5: é metacêntrico. Uma banda adjacente ao centrômero ocorreu em aproximadamente 82% das observações. Neste caso, a banda formada ou (1) era única; ou (2) associada a outra banda adjacente ao centrômero; ou (3) ocorria junto com uma banda telomérica no braço cromossômico oposto. Menos freqüente foi o aparecimento de duas bandas teloméricas.

- cromossomo 6: submetacêntrico. As duas variantes de bandas mais comumente encontradas nos ideogramas analisados se relacionavam ao aparecimento de duas bandas flanqueando o centrômero e à formação de uma telomérica que ocupou quase que totalmente um dos braços do cromossomo, acompanhada de uma pericentromérica. Foram também encontradas uma ou duas bandas teloméricas.

A presença de pelo menos uma banda pericentromérica neste cromossomo foi de 73%.

Interessante notar que 18% dos cromossomos apresentaram-se sem condensações coradas.

- cromossomo 7: submetacêntrico. Aqui, também as variações observadas estiveram em torno das bandas teloméricas e centroméricas. Notou-se a presença de uma banda adjacente ao centrômero apenas, ou combinada com uma banda telomérica no braço curto. Observou-se também a combinação de: (1) duas teloméricas, (2) uma adjacente ao centrômero e uma intercalada.

Das células analisadas, 23% mostraram ausência de bandas nesse cromossomo 7.

- cromossomo 8: submetacêntrico. Observou-se uma alternância e uma combinação entre a banda telomérica formada no braço curto e a adjacente ao centrômero do braço longo. Ora ambas, ora apenas uma delas aparecia. A banda telomérica tomando todo o braço curto do cromossomo aparece em 68% dos casos analisados, podendo aparecer também em associação com outra banda telomérica.

- cromossomo 9: é submetacêntrico. Em 40% das observações notou-se a presença de uma banda pericentromérica associada a uma coloração total do braço curto. Nas células metafásicas em seu grau maior de contração, estas duas bandas se unem dando a impressão de serem uma só. A presença de apenas uma banda adjacente ao centrômero e/ou então combinada com uma banda que ocupa todo o braço curto foi de 70%. Em apenas uma célula foi visto a formação de 2 bandas teloméricas.

- cromossomo 10: é metacêntrico. É caracterizado pela presença de banda-C que ocupa um dos braços (75%), que pode estar sozinha ou em associação com uma banda pericentromérica ou com uma banda telomérica.

Constatou-se a existência de uma variante em que o segmento corado e evidenciado é aquele da região pericentromérica.

- cromossomo 11 : muito semelhante ao cromossomo 10, é metacêntrico. Cerca de 60% das células estudadas apresentavam uma banda telomérica em um dos braços, podendo a mesma estar em combinação com uma outra telomérica. Não tão freqüente foi a formação de bandas pericentroméricas.

Entre os esquemas e ideogramas analisados, observou-se que havia um outro cromossomo que não se corava após a técnica de banda-C, de tal forma que ao elaborar a caracterização dos 11 cromossomos, todos, em maior ou menor porcentagem e em pelo menos um ideograma, não apresentaram a formação de banda.

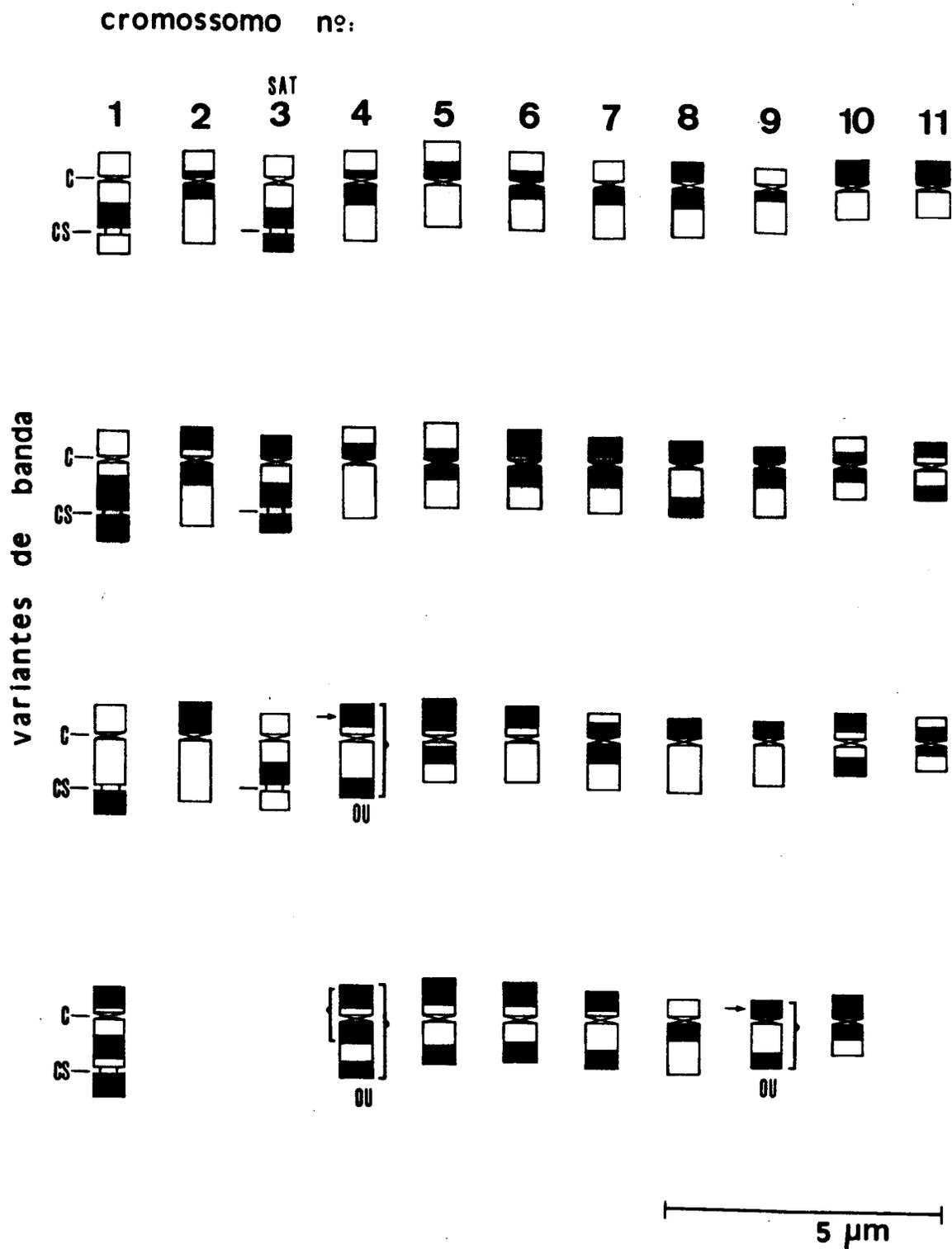


FIGURA 12: Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos de metáfases, tratados pelo bandamento-C, em células de endospermas de *C. deveurei*. As variações encontradas dizem respeito ao número e à posição de bandas-C em cromossomos homólogos da mesma ou de diferentes células.

CS = constrição secundária; C = centrômero. As chaves e as setas indicam as combinações de bandas que ocorreram.

A presença de heterocromatina telomérica ocorreu em todos os cromossomos, enquanto que a pericentromérica apareceu em todos exceto no cromossomo 3.

Através desta metodologia, cromossomos do genoma, 1, 3 e 7 apresentaram banda intercalada.

C. racemosa Lour.

As porcentagens médias da somatória de segmentos corados pelo bandamento-C e presentes nos ideogramas das células prometafásicas foi de $38.17 \pm 2.94\%$. O número de bandas-C formadas variou de 10 até 20, sendo que a média de bandas calculada por genoma foi de 15.09 ± 0.94 e o valor da mediana foi de 15. Foram obtidos 8 ideogramas.

Através das análises dos ideogramas obtidos verificou-se que as variações nas bandas-C concentram-se principalmente na ocorrência das bandas pericentroméricas e teloméricas, sozinhas ou em combinação, como se pode ver através do ideograma médio com suas variantes cromossômicas, na FIGURA 13, pelas fotomicrografias E (FIGURA 3) e A (FIGURA 4) e pelas descrições que se seguem :

- cromossomo 1: É submetacêntrico. Tem uma constrição secundária situada no terço final do braço longo.

Este cromossomo é caracterizado principalmente pela presença de uma banda telomérica e de uma intercalada que ocorre no braço longo. Tais bandas aparecem em aproximadamente 72% dos ideogramas. Nestes, ou estavam sozinhas, ou combinadas com : (1) uma banda telomérica do braço curto; (2) ou com uma pericentromérica; (3) ou com uma banda na constrição secundária. Menos comum foi o aparecimento de apenas uma banda intercalada no braço longo. As bandas intercaladas do braço longo se formaram em 90% das células analisadas.

- cromossomo 2: submetacêntrico. As variações observadas nas bandas-C envolveram principalmente a formação das pericentromé-

ricas e a coloração total do braço curto.

A banda telomérica que, em alguns casos, ocupou todo o braço curto, se formou em 54% dos cromossomos, aparecendo sozinha ou associada à banda adjacente ao centrômero, no braço longo. A porcentagem de células tendo o cromossomo 2 com pelo menos uma banda adjacente ao centrômero foi também de 54% aproximadamente.

- cromossomo 3: este cromossomo é submetacêntrico e possui uma constricção secundária associada ao organizador do nucléolo no braço longo. Apresentou uma banda distal que toma todo o segmento SAT, que aparece sozinha ou em combinação com uma banda intercalada, no braço longo, entre as constricções primária e secundária (82% das observações). Menos freqüente foi a formação de uma banda distal no braço curto em associação com as bandas distal e intercalada acima mencionadas.

- cromossomo 4: submetacêntrico. As variações ocorreram em relação às bandas pericentroméricas. Em 91% dos ideogramas constatou-se a presença de pelo menos uma banda adjacente ao centrômero. A formação de uma banda telomérica foi baixa (9%).

- cromossomo 5: metacêntrico. Foram observadas basicamente duas variantes no padrão de bandas-C e opostas entre si. A primeira esteve relacionada com a extensão das bandas pericentroméricas que se formaram em 45,5% das células vistas. A outra variante se caracterizou pela presença de pelo menos uma banda distal telomérica (54,5%).

- cromossomo 6: é um cromossomo submetacêntrico. Houve a formação de pelo menos uma banda distal acompanhada ou não de uma banda adjacente ao centrômero, ou de uma outra distal, em aproximadamente 64% dos ideogramas analisados.

Pode apresentar também ausência de bandas (27%) ou inversamente, o cromossomo pode corar-se todo.

- cromossomo 7: submetacêntrico. Em todos os ideogramas anali-

sados foi visto a presença de no mínimo uma banda adjacente ao centrômero e de extensão variada. Esta variação aconteceu principalmente na banda do braço curto que, em 63% dos ideogramas, ocupou todo esse braço.

- cromossomo 8: submetacêntrico. Ficou caracterizado pela coloração do braço curto que ocorreu em 91% dos ideogramas, a qual apareceu só ou em associação com uma banda no braço longo flanqueando o centrômero (54% dos ideogramas).

Uma outra banda distal se formou, com menor frequência, acompanhada das duas outras acima citadas.

- cromossomo 9: é submetacêntrico, caracterizado pela presença de pelo menos uma banda distal que ocupa todo o braço curto (82%). Esta pode estar só ou aparecer junto com uma banda adjacente ao centrômero, ou ainda com outra distal.

- cromossomo 10: metacêntrico. As bandas-C que se formaram: (1) ou eram teloméricas(45%); (2) ou eram pericentroméricas acompanhada ou não de uma telomérica (27%).

- cromossomo 11: metacêntrico. Interessante que em 45% das células este cromossomo não exibiu qualquer vestígio de formação de bandas-C. Constatou-se em outras a presença de 1 banda distal.

Somente uma célula teve apenas bandas pericentroméricas.

Os cromossomos de números 1, 2, 3, 6, 9, 10 e 11 apresentaram poucas variantes com ausência de banda-C. Inversamente, o cromossomo 6 corou-se totalmente em uma das células.

Os cromossomos 1 e 3 apresentaram bandas-C intercaladas.

4.2.2. Solução diluída de Giemsa

Os resultados satisfatórios obtidos apenas com o

vide página seguinte →

FIGURA 13: Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos de prometáfase, tratados pelo bandamento-C, em células de endospermas de *C. racemosa*. As variações encontradas dizem respeito ao número e à posição de bandas-C em cromossomos homólogos da mesma ou de diferentes células.

C = centrômero; CS = constrição secundária; ⊙ = banda clara.

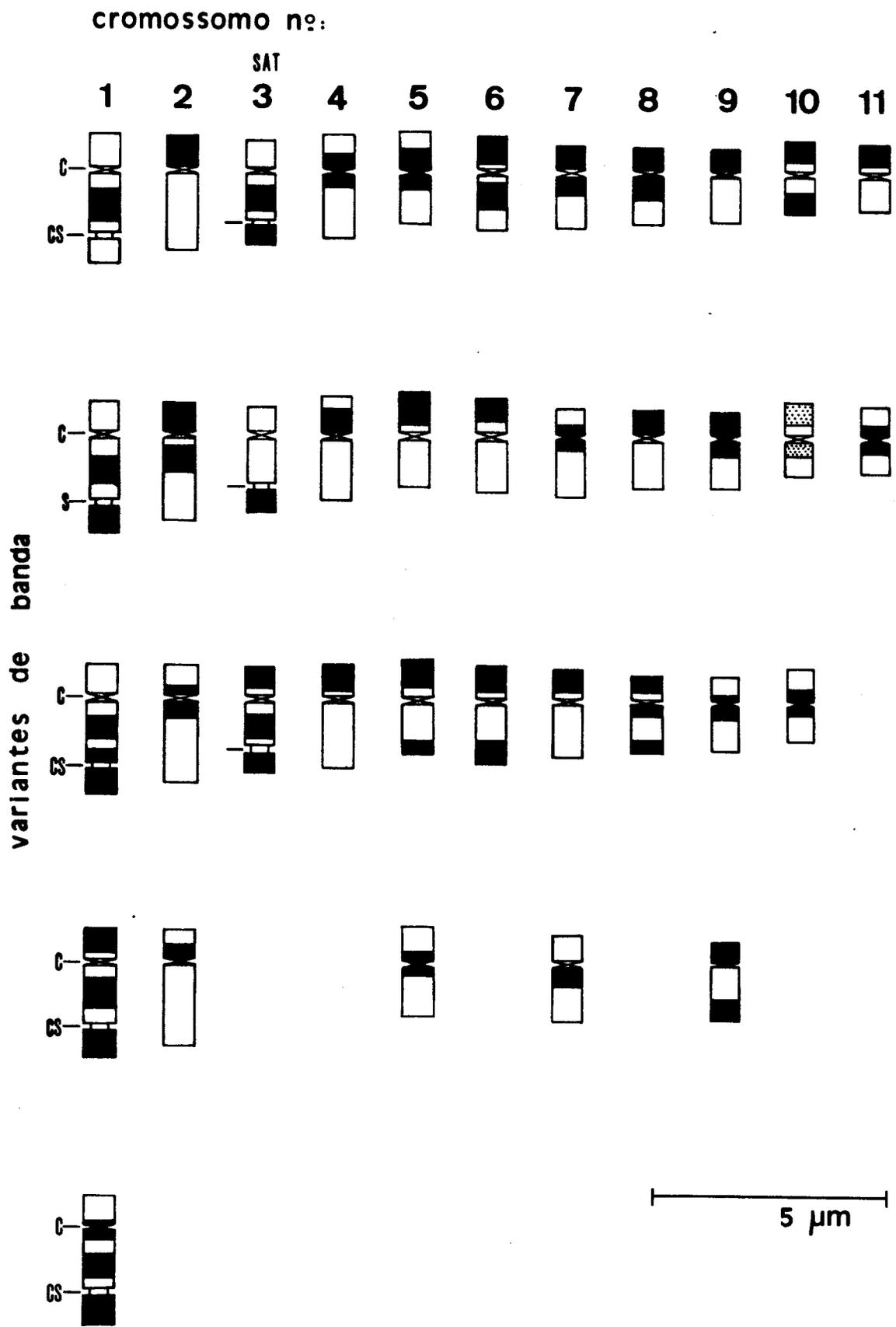


FIGURA 13: Legenda na página anterior.

uso da solução diluída de Giemsa em tampão fosfato Sörensen nos cromossomos mitóticos de células de endospermas das três espécies diplóides de café pesquisadas neste trabalho, ficaram resumidas a algumas células de *C. canephora* e *C. dewevrei*. Destas duas espécies, *C. canephora* apresentou menos variações quanto ao número e posição dos segmentos cromossômicos corados diferencialmente pelo Giemsa. Apesar dos esforços, não foi obtido qualquer resultado positivo, nos cromossomos de *C. racemosa*, por esta técnica.

Coffea canephora var. *Robusta*

As análises nos ideogramas obtidos mostram que as porcentagens médias da somatória de segmentos corados densamente pelo Giemsa ficou em $41,97 \pm 1,27$ e o número de bandas formadas oscilou entre 16 a 21, sendo a média de 18,6 e a mediana de 18. Foram obtidos 9 ideogramas.

- cromossomo 1: constatou-se a formação, neste cromossomo, de pelo menos uma banda intercalada entre as constricções primária e secundária, acompanhada ou não de pelo menos uma banda adjacente ao centrômero. O segmento acima da constricção secundária, ora se corou, ora não se corou (FIGURA 14).

- cromossomo 2: ficou caracterizado pela coloração forte ao redor do centrômero, em ambos os braços ou em um ou outro braço.

- cromossomo 3: apresentou o segmento SAT densamente corado, com uma ou duas bandas intercaladas, de extensão variada, combinada ou não com uma banda pericentromérica.

- cromossomo 4: apresentou duas bandas, uma em cada braço do cromossomo, flanqueando o centrômero, podendo se unirem, em consequência do grau maior de compactação dos cromossomos.

- cromossomo 5: apresentou muitas variações quanto à posição e

número dos segmentos corados. Algumas células apresentaram apenas coloração pericentromérica, outras, se caracterizaram pela presença de um segmento terminal todo corado, em um dos braços e acompanhado de um segmento adjacente ao centrômero densamente corado, podendo também aparecer um segmento intercalar corado em um dos braços.

- cromossomo 6: apresentou forte coloração pericentromérica.

- cromossomo 7: exibiu algumas variações na posição dos segmentos corados. Estes foram, na sua maioria, pericentroméricos. Todos os cromossomos de número 7 esquematizados, mostraram pelo menos um segmento corado adjacente ao centrômero. Em um ideograma, além desse segmento, houve forte coloração no segmento distal do braço curto e em um segmento intercalar do braço longo.

- cromossomo 8: distinguiu-se pela coloração do braço curto e de um segmento adjacente ao centrômero, no braço longo.

- cromossomo 9: formou pelo menos um segmento corado adjacente ao centrômero. Na maior parte dos ideogramas obtidos pelo emprego da solução de Giemsa diluído, este cromossomo estava com o braço curto todo corado e seguido do segmento adjacente ao centrômero, no braço longo, também todo corado, podendo ou não estarem unidos.

- cromossomo 10: apresentou um segmento corado adjacente ao centrômero em um dos braços e um outro segmento de extensão variada, também adjacente ao centrômero, no braço oposto, podendo tal segmento ocupar todo o braço formando uma única e grande banda.

- cromossomo 11: devido ao seu tamanho, a coloração ora tomou um dos braços totalmente, ora se estendeu em ambos os braços. Em oposição a essas variações, verificou-se também em dois dos ideogramas a formação de segmentos corados ao redor do centrô-

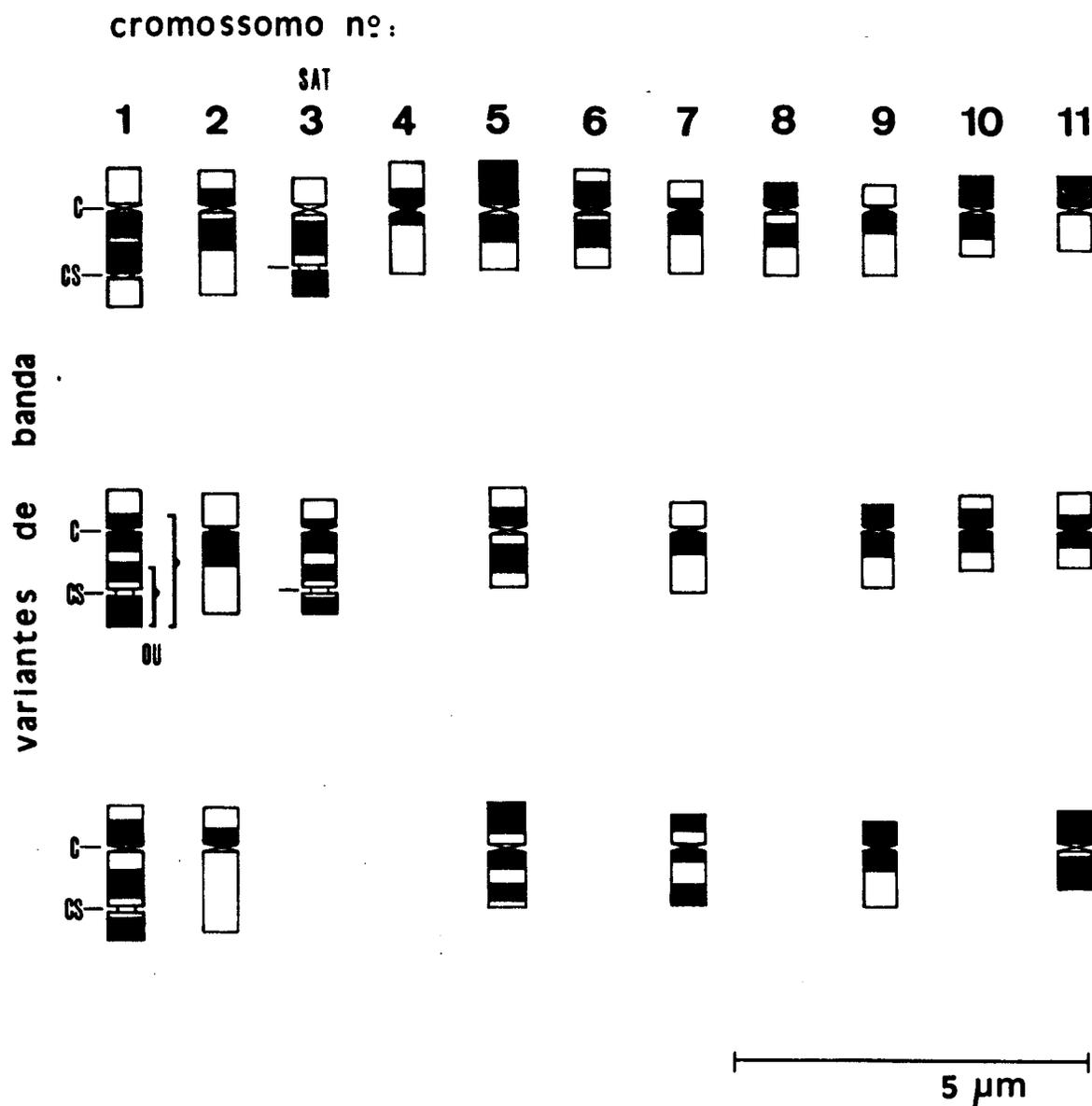


FIGURA 14: Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos metafásicos de *C. canephora* tratados apenas com solução diluída de Giemsa. As variações encontradas dizem respeito ao número e à posição dos segmentos corados em cromossomos homólogos de mesma ou de diferentes células.

CS = constrição secundária; C = centrômero. As chaves indicam as combinações de bandas que ocorreram.

mero.

Os cromossomos de números 4, 6 e 8 foram os únicos a apresentarem um só padrão de coloração pelo Giemsa.

Coffea deweyrei var *excelsa*

As porcentagens médias da somatória dos segmentos corados pelo Giemsa nos ideogramas obtidos foi de 53.79 ± 2.71 , sendo que o número de bandas variou de 17 a 25. Obteve-se um ideograma médio (FIGURA 15). Foram obtidos 8 ideogramas.

Os cromossomos foram caracterizados a partir da posição dos segmentos corados, como segue.

- cromossomo 1: distinguiu-se pela coloração constante do segmento distal do braço longo, apresentado, nos casos analisados, pelo menos uma banda intercalada. As variações abrangeram o aparecimento de uma banda pericentromérica.

- cromossomo 2: caracterizou-se pela formação de uma a duas bandas adjacentes ao centrômero que, em alguns casos avançou sobre o mesmo. Presença de um segmento corado intercalado no braço longo.

- cromossomo 3: presença do segmento corado intercalado entre as contrações primária e secundária acompanhado na maioria das vezes pelo segmento SAT todo corado e raramente por um segmento adjacente ao centrômero no braço curto.

- cromossomo 4: apresentou-se muito variado quanto à coloração pelo Giemsa, como pode ser visto na FIGURA 15. Formaram-se segmentos corados nas posições pericentromérica e/ou distal.

- cromossomo 5: mostrou-se também muito variável quanto à formação das bandas. Ocorreu a formação de (1) uma banda pericentromérica em um dos braços e de uma telomérica ou intercalar ou (2) de uma telomérica acompanhada de uma coloração quase que

total no braço oposto.

- cromossomo 6: houve a formação de um segmento corado distal em um dos braços, com extensão variada, na maior parte das células analisadas, seguido ou não pela formação de um outro segmento corado, no braço oposto, e próximo ao centrômero.

- cromossomo 7: o braço curto deste cromossomo ficou todo ou parcialmente corado em algumas das células. Apresentou também o braço longo com um segmento adjacente ao centrômero corado e/ou um segmento distal também corado. Menos frequente foi o aparecimento de um segmento intercalar corado.

- cromossomo 8: o braço curto se caracterizou pela densa coloração, acompanhada da formação de um segmento adjacente ao centrômero no braço longo. Esta formação de banda apareceu também combinada com (1) uma banda distal no braço longo; (2) ou com uma banda intercalada.

- cromossomo 9: este cromossomo apresentou a formação de pelo menos uma banda pericentromérica de extensão variada. A exceção em um dos ideogramas, foi o aparecimento de uma banda ocupando todo o braço longo.

- cromossomo 10: ficou caracterizado pela presença de segmentos corados próximos ao centrômero, em ambos os braços, e de extensão variada, chegando inclusive a abranger totalmente ambos os braços.

- cromossomo 11: apresentou variações. Em uma célula, estava todo corado; em outra, permaneceu uniformemente pálido. Foi anotada a formação de pelo menos um segmento corado adjacente ao centrômero, em algumas células.

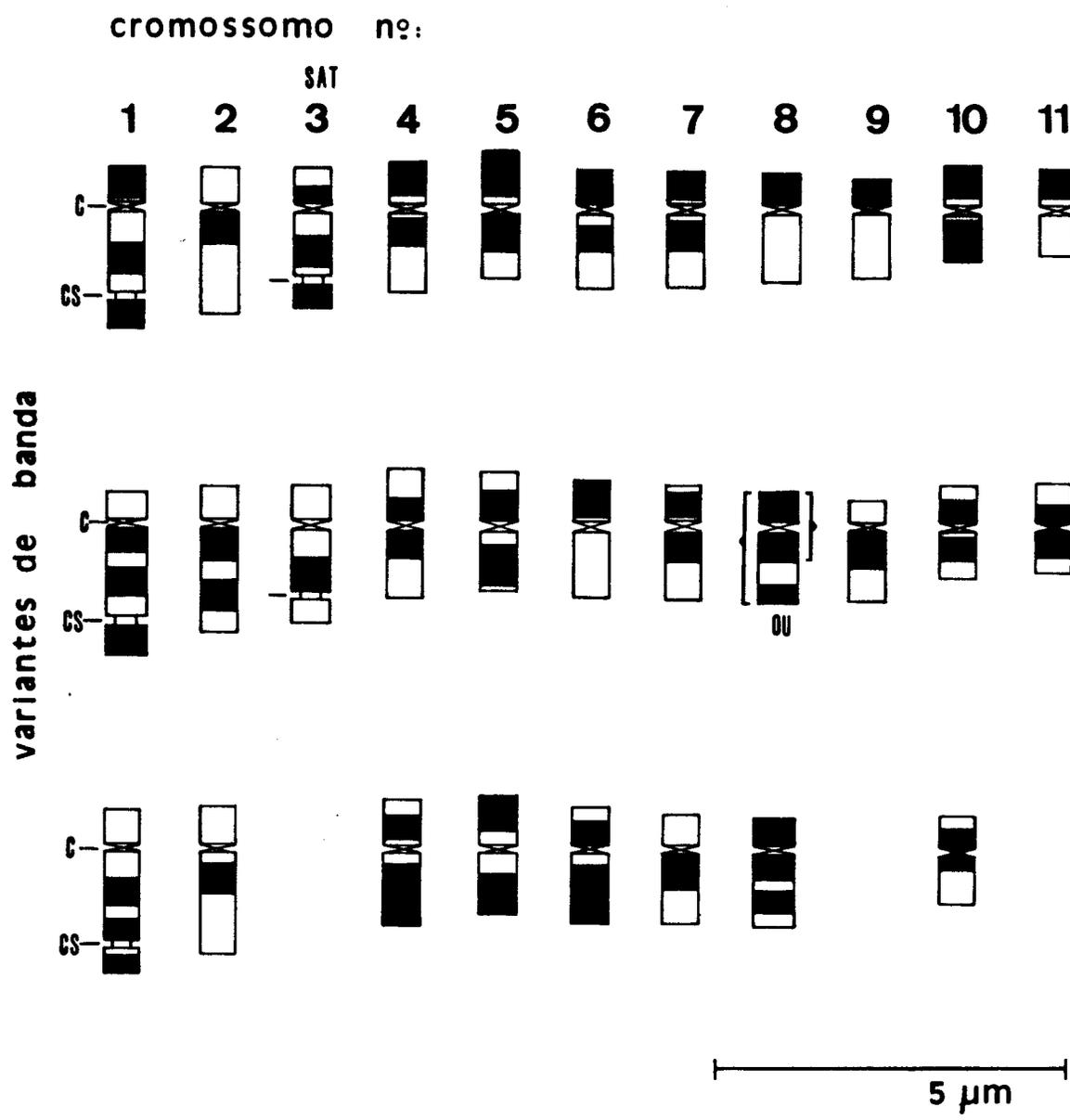


FIGURA 15: Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos metafásicos de *C. deweyrei* tratados apenas com solução diluída de Giemsa. As variações encontradas dizem respeito ao número e à posição dos segmentos corados em cromossomos homólogos de uma mesma ou de diferentes células.

CS = constrição secundária; C = posição do centrômero; a chave indica a banda ou a combinação de bandas que ocorreu.

4.2.3. Impregnação pela prata

A impregnação pela prata (AgNO_3), restrita apenas às regiões organizadoras do nucléolo (banda-RON), foi observada somente nos cromossomos de *C. racemosa*. Nas outras duas espécies *C. canephora* e *C. dewevrei*, a impregnação aconteceu também em outros segmentos cromossômicos além da região RON (FIGURAS de 16 a 19).

Coffea dewevrei var. *excelsa*

Foram obtidos apenas 2 ideogramas, sendo que em apenas um deles se conseguiu a impregnação na região do nucléolo do cromossomo 3. (FIGURA 17). O excesso de impregnação verificado no outro ideograma lembrou aquele do bandamento-C.

Coffea racemosa

Os cromossomos 3 e 8 mostraram impregnação no terço distal no organizador nucleolar, como pode ser visto pelos ideogramas das FIGURAS 18 e 19 e na fotomicrografia D (FIGURA 6).

4.2.4. Digestão enzimática pela tripsina

Os ideogramas elaborados a partir de células mitóticas de endospermas submetidas à solução diluída de tripsina se referem apenas a *C. canephora* e a *C. dewevrei*. Não se conseguiu qualquer resultado positivo com os cromossomos de *C. racemosa*.

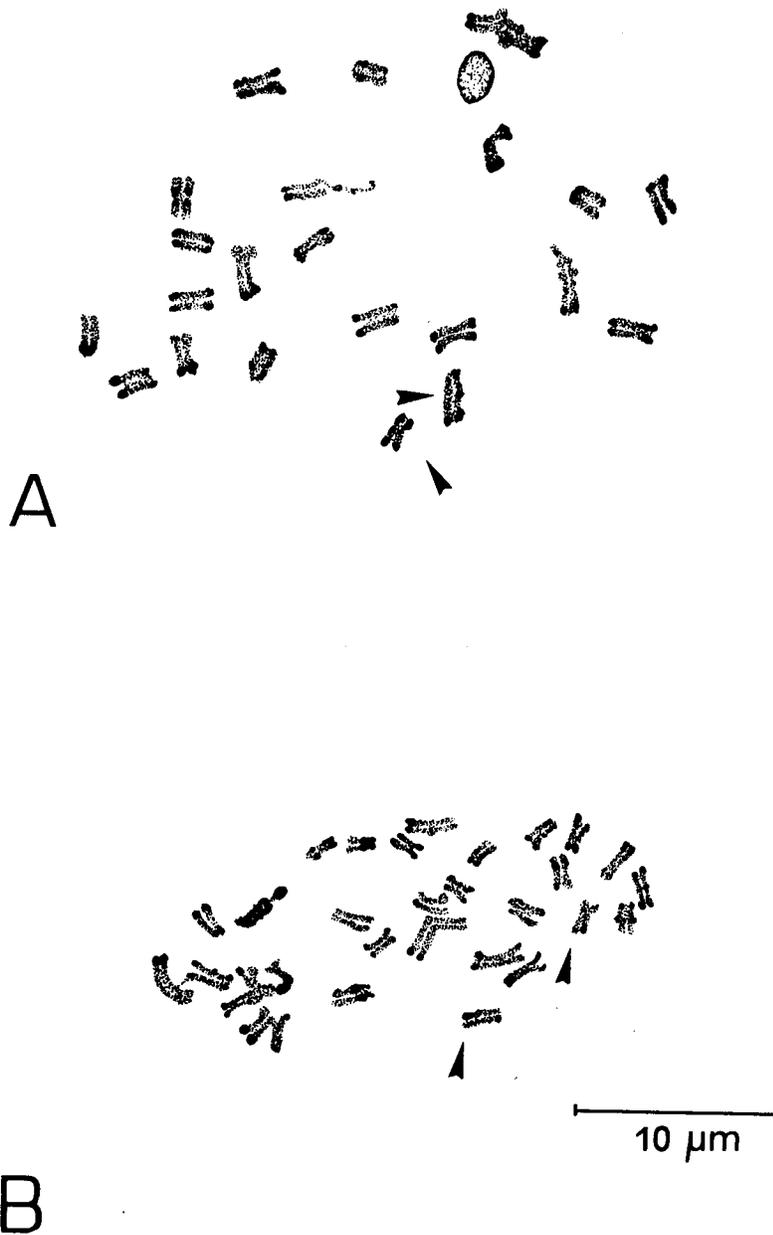


FIGURA 16: Desenhos em câmara clara (A) e (B) dos cromossomos metafásicos de duas células de endospermas de *C. canephora*, após a impregnação pela prata. Há assimetria de impregnação de prata em ambos os desenhos (setas) e que será discutida adiante.

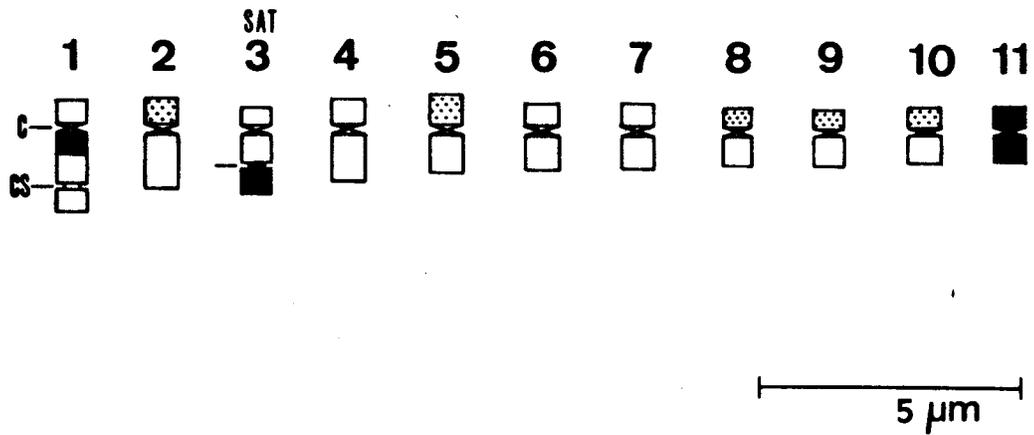


FIGURA 17. Ideograma de cromossomos metafásicos de células de endosperma de *C. deweyrei*, após a impregnação pela prata com a marcação no organizador do nucléolo (RON) do cromossomo 3. CS = constrição secundária; C = centrômero; ⊙ = banda clara.

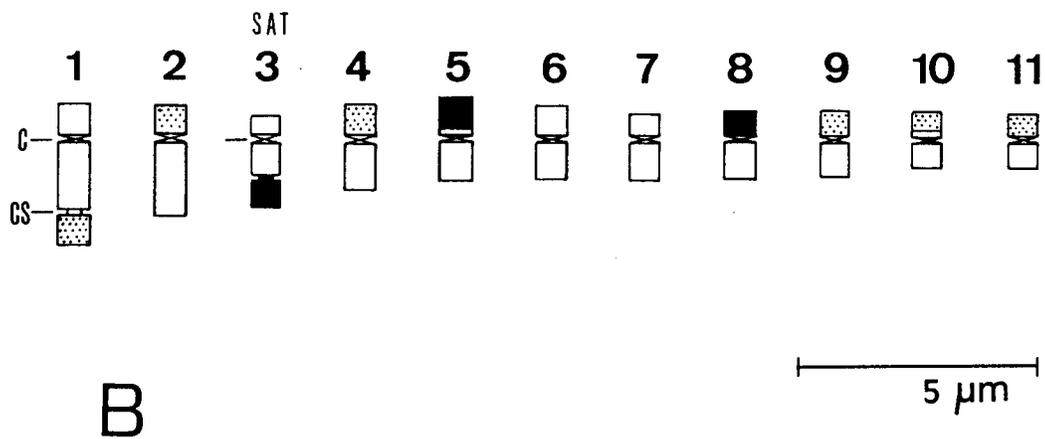
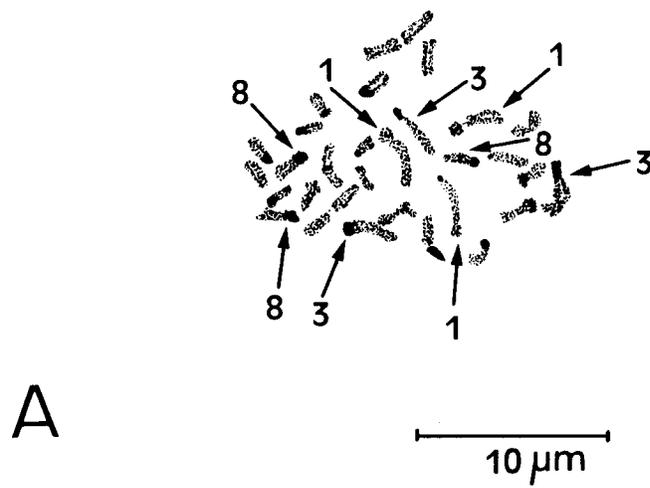


FIGURA 18. Desenho em câmara clara (A) e ideograma (B) dos cromossomos de *C. racemosa*, após a impregnação pela prata, com a marcação dos organizadores do nucléolo dos cromossomos 3 e 8, e um excedente no cromossomo 5.

CS = constrição secundária; C = centrômero; ⊙ = banda clara.

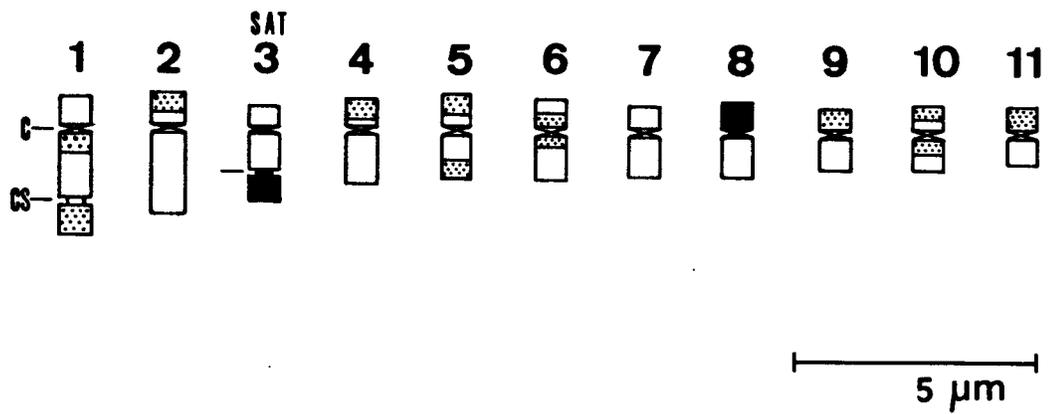


FIGURA 19. Ideograma dos cromossomos de *C. racemosa*, após a impregnação pela prata, com a marcação nos cromossomos 3 e 8, portadores da RON. CS = constrição secundária; C = centrômero; ⊙ = banda clara.

Coffea canephora var. *Robusta*

Foram obtidos apenas duas células com os cromossomos suficientemente espalhados e corados diferencialmente e que estão esquematizados nos ideogramas das FIGURAS 20 e 21. A FIGURA 7A mostra apenas a fotomicrografia de uma célula em prófase tardia.

Constatou-se a formação de bandas distais cobrindo o segmento SAT dos cromossomos 1 e 3. Também foi vista a presença de pelo menos uma banda adjacente ao centrômero nos cromossomos 2, 4, 6 e 9. O cromossomo 10 corou-se totalmente. Verificou-se também a ocorrência de uma assimetria de banda.

Coffea dewevrei var. *excelsa*

A porcentagem média de segmentos formados, após o uso da tripsina, e visualizados nos poucos ideogramas obtidos para esta espécie diplóide de café foi de $38.38 \pm 1.69\%$. O número de bandas, entre os ideogramas, variou de 15 até 24.

Houve variação quanto ao número e posição das bandas distais (teloméricas) e pericentroméricas nos cromossomos. (FIGURAS 7B e C e 22). Foram obtidos 6 ideogramas.

- cromossomo 1: presença de banda distal ocupando todo o segmento adjacente à constricção secundária acompanhada ou não de pelo menos uma banda intercalada entre as constricções primária e secundária. Pode aparecer uma banda centromérica no braço longo e que pode estar em combinação com as bandas anteriores.

- cromossomo 2: as variações que ocorreram neste cromossomo estiveram sempre relacionadas com a formação de pelo menos uma banda adjacente ao centrômero e de extensão variada, ou no braço longo, ou em ambos. Foi visto em um ideograma a formação de uma banda intercalar no braço longo.

- cromossomo 3: assim como no cromossomo anterior, as variações

que surgiram ficaram restritas a duas bandas; neste caso, às bandas SAT e intercalada. Estas apareceram combinadas ou então apenas uma delas.

- cromossomo 4: a maior parte dos ideogramas mostrou a formação de bandas pericentroméricas de extensão variada acompanhadas ou não de uma fraca banda distal ou de uma pequena banda intercalar.

- cromossomo 5: apresentou uma banda em um dos braços, com extensão variada, ocupando todo o braço ou se restringindo a uma banda pericentromérica. Esta banda de extensão variada apareceu também junto com outra adjacente ao centrômero e que se formou no braço oposto.

- cromossomo 6: com uma ou duas bandas pericentroméricas. Neste último caso, as duas bandas podem aparecer unidas, cobrindo o centrômero.

- cromossomo 7: apresentou, na maior parte, dos ideogramas analisados, uma banda adjacente ao centrômero no braço longo associada ou não a formação de uma banda tomando todo o braço curto. Ou ainda, uma banda pericentromérica e associada a uma intercalar no braço longo.

- cromossomo 8: caracterizado pela formação de uma banda que se estendeu por todo o braço curto, combinada na maior parte dos ideogramas, com uma banda adjacente ao centrômero e que aparece no braço longo.

- cromossomo 9: apresentou uma banda que tomou todo o braço curto e que ocorreu na maior parte dos ideogramas analisados, associada ou não à formação de uma banda adjacente ao centrômero, no braço longo, e/ou de uma banda distal. Observou-se um único caso onde houve a formação de uma banda adjacente ao centrômero no braço longo e de uma banda intercalar também.

- cromossomo 10: caracterizado pela formação de uma banda que ocupou um dos braços quase que totalmente. Esta banda apareceu (1) ou com a outra pericentromérica; (2) ou com uma banda distal do outro braço; (3) ou então sozinha.

- cromossomo 11: constatou-se a formação de pelo menos uma banda distal que ocupou quase totalmente o braço em que apareceu, na maior parte dos ideogramas obtidos por meio do uso da tripsina. Também foi visto que é possível a formação de bandas adjacentes ao centrômero.

Dos cromossomos analisados somente os números 7 e 11 apresentaram, em alguns ideogramas, ausência de bandas, permanecendo fracos e homogeneamente corados.

4.3. REAÇÃO NUCLEAR DE FEULGEN

A aplicação da reação nuclear de Feulgen, tal como foi descrita por LISON (1960), não forneceu qualquer resultado positivo, no que se refere à coloração diferencial dos cromossomos das espécies de café em questão.

Foram efetuadas diversas modificações nesta metodologia porém os resultados foram insatisfatórios.

A aplicação da solução de tripsina por até 4 minutos diretamente no material já esmagado (endosperma ou radícula) e antes do tratamento com ácido clorídrico (que faz parte desta reação) promoveu o aparecimento de uma coloração rosa pálida nos cromossomos. Esta, no entanto, não foi suficientemente adequada para que se pudesse comparar estes segmentos corados com aqueles bandados.

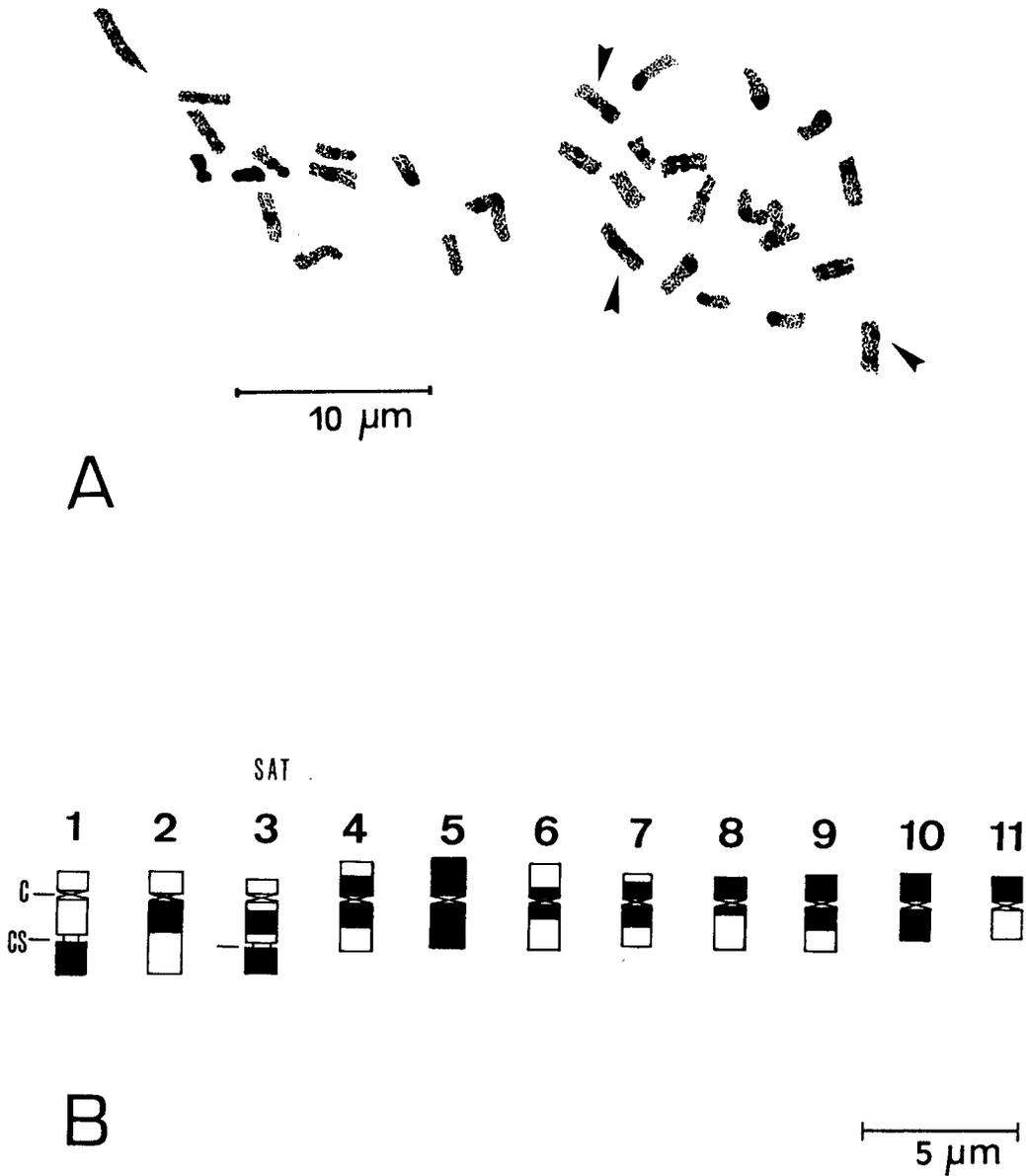


FIGURA 20. Desenho (A) e ideograma (B) dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após a digestão enzimática com a tripsina. CS = constrição secundária; C = centrômero; ► = assimetria de banda.

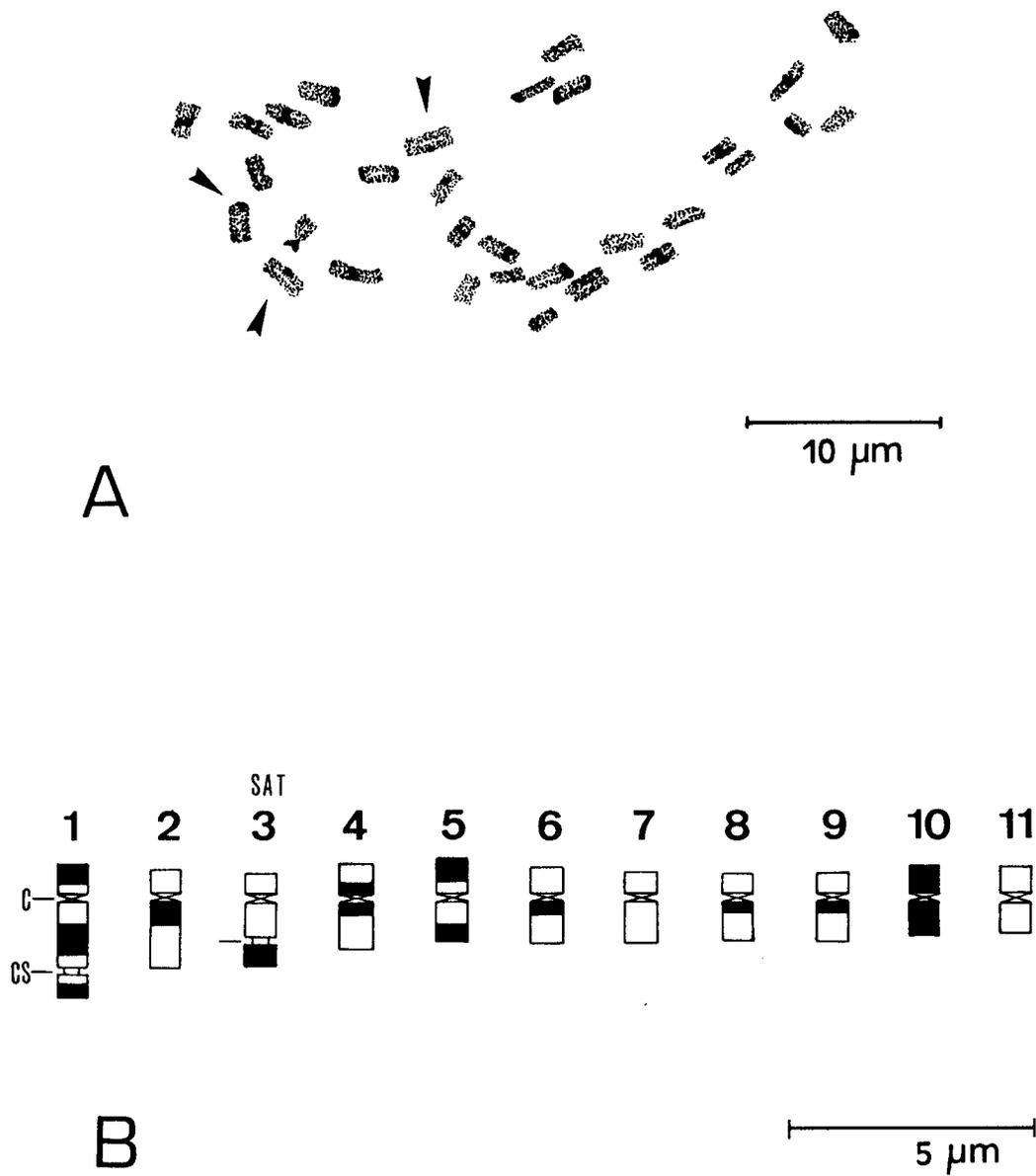


FIGURA 21. Desenho (A) e ideograma (B) dos cromossomos metafásicos de uma célula de endosperma de *C. canephora*, após a digestão enzimática com a tripsina.

CS = constrição secundária; C = centrômero. As setas indicam assimetria de bandas.

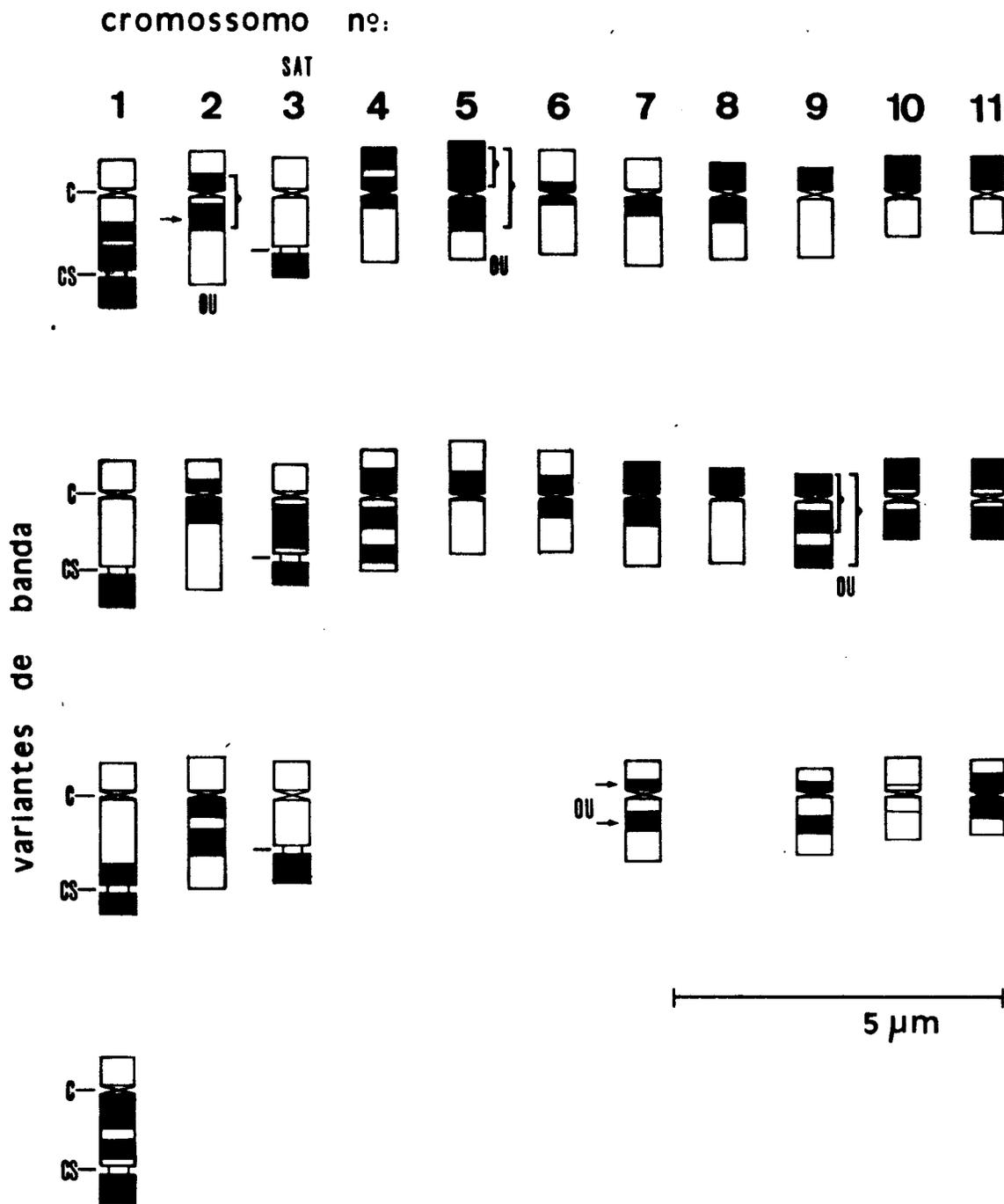


FIGURA 22. Diferentes tipos de bandamento em cromossomos mitóticos de metáfases, tratados pela enzima tripsina, em células de endospermas de *C. deweyrei*. As variações encontradas dizem respeito ao número e à posição de segmentos corados em cromossomos homólogos da mesma ou de diferentes células.

C = centrômero; CS = constrição secundária;] = indica a banda ou a combinação de bandas que ocorreu; ⊙ = banda clara.

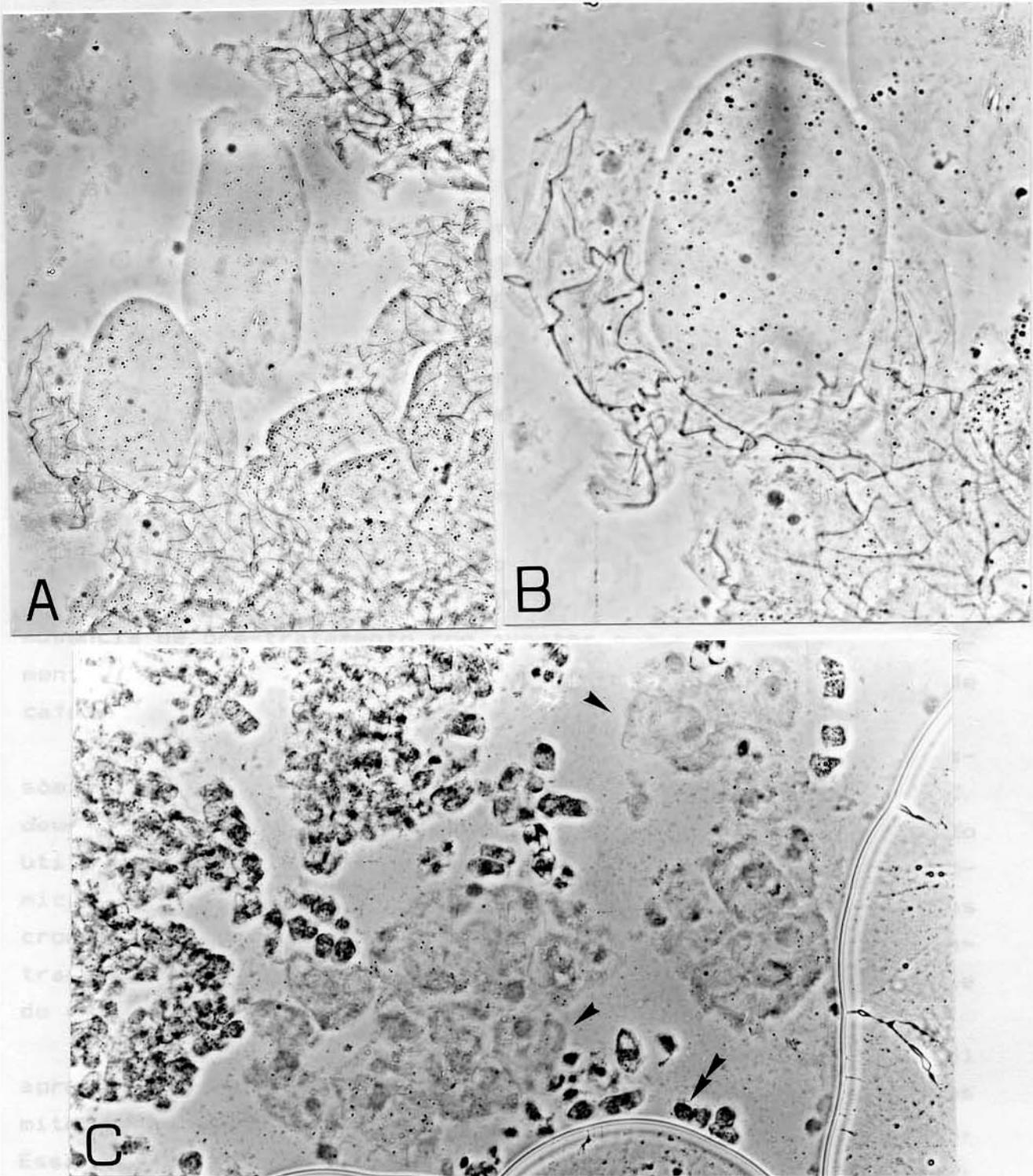


FIGURA 23. Fotomicrografia de células pertencentes a endospermas de *Coffea*, as quais foram preparadas pelo esmagamento e coradas com carmin acético, onde se vê a diferença de tamanho entre células localizadas na parte mais central desse tecido (células maiores) e células periféricas (menores). células de radículas das três espécies.

A - *C. dewevrei* (X 333); B - o mesmo assunto só que em maior aumento (X 665); C - *C. canephora* (X 333) mostrando a diferença de tamanho entre células do endosperma (►) e células do embrião (►►).

5. DISCUSSÃO

5.1. MEDIDAS CROMOSSÔMICAS

Os valores médios dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos de células de endospermas de *Coffea canephora* e de *C. deweyrei* (TABELA 1) obtidos no presente trabalho, foram maiores do que aqueles obtidos com o emprego de células de radículas, nessas mesmas espécies (TABELAS 3 e 4).

As médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos de células de radículas de ambas as espécies acima citadas foram, entretanto, similares àquelas encontradas por BOUHARMONT (1959).

Essa diferença no comprimento cromossômico entre células de endospermas e de radículas pode ser decorrente da ausência de pré-tratamento com agentes que promovem o encurtamento cromossômico os quais não foram usados nos endospermas de café.

Analisando o trabalho de caracterização cromossômica desenvolvido por MENDES (1938) para *C. excelsa* (hoje, *C. deweyrei* var. *excelsa*) pudemos observar que: (1) o autor não utilizou qualquer tipo de agente indutor de contração cromossômica mas fixou diretamente o material coletado; (2) as medidas cromossômicas por ele apresentadas são similares àquelas encontradas por nós para células de endospermas, nessa mesma espécie de café.

Com relação à *C. racemosa*, BOUHARMONT (1963) apresentou medidas apenas para os quatro maiores cromossomos mitóticos desta espécie, interpretando-os como metafásicos. Essas medidas correspondem àquelas que mostramos na TABELA 2, que se referem a esses cromossomos porém na prometáfase. Neste trabalho, Bouharmont não menciona as suas medidas anteriores dos cromossomos de *C. canephora* e de *C. deweyrei*.

Analisando-se as médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos de células de radículas das três espécies de café, verificamos que *C. canephora* tem os cromossomos maiores do que *C. deweyrei* e essas duas espécies têm os cromos-

somos maiores do que os de *C. racemosa* (TABELA 6).

Esses dados também se contrapõem aos resultados de BOUHARMONT (1959 e 1963) os quais indicam que *C. racemosa* teriam os maiores cromossomos, seguidos por *C. deweyrei* e por *C. canephora*.

Excetuando-se os cromossomos de números 5, 10 e 11, que foram classificados como metacêntricos segundo o conceito de LEVAN et al. (1964), os demais cromossomos dessas espécies de café estudadas são do tipo submetacêntrico, discordando novamente dos achados de BOUHARMONT (1959) em que a maioria dos cromossomos seria do tipo metacêntrico.

Diante do que foi exposto, acreditamos que os métodos aqui empregados para esse tipo de estudo cromossômico são muito mais precisos do que o corte histológico utilizado por Bouharmont.

5.2. BANDAMENTO

O emprego da técnica de bandamento-C, da coloração simples pelo Giemsa, da digestão enzimática pela tripsina, evidenciaram segmentos diferencialmente corados ao longo dos cromossomos mitóticos de células de endospermas das espécies aqui analisadas.

Esses segmentos evidenciáveis (bandas), no entanto, mostraram acentuadas variações no número e na posição, nos cromossomos que os contém, independente da espécie ou da planta utilizada. (FIGURAS de 3 a 22)

Através das análises dos ideogramas e dos esquemas obtidos com o emprego da técnica de banda-C, nos cromossomos mitóticos de *C. canephora* e de *C. deweyrei*, observou-se que houve a formação predominante de bandas pericentroméricas e/ou de teloméricas. As primeiras aparecem em apenas um ou ambos os lados do centrômero. Quando em ambos os lados e, de acordo com o grau de condensação do cromossomo, aparecem separadas, ou então, formando um só bloco (FIGURAS 3, 4 e 5 e FIGURAS de 8 a 13).

Nossos achados concordam com as observações de vários autores, como por exemplo, de SCHWEIZER & EHRENDORFER (1983) em membros da tribo Anthemidaea (Asteraceae), de SCHWEIZER & LOIDL (1986), de WATSON (1987 e 1988) para cromossomos de algumas espécies de Bulbine (Liliaceae). Esses autores mostraram que as bandas-C, quando presentes em cromossomos pequenos ou no braço de um cromossomo, tendiam a se localizar nas regiões teloméricas ou preferencialmente ao redor das constrictões primária e secundária.

Bandas intersticiais (ou intercalares) também podem ocorrer e são, como é esperado, mais facilmente identificáveis em cromossomos mais longos (GREILHUBER & LOIDL, 1982; SCHWEIZER & LOIDL, 1986; WATSON, 1987 e 1988; STEGIANOU, 1988).

Embora o comprimento dos cromossomos mitóticos metafásicos de *Coffea* não ultrapasse a 4 μ m, neles pode-se observar bandas-C intercalares, como mostram as FIGURAS 9 (cromossomo 5), 12 e 13 (variantes do cromossomo 1), 15 e 22 (variante do cromossomo 9).

Loidl (1981, apud GREILHUBER, 1984), GREILHUBER & LOIDL (1982) e SCHWEIZER & LOIDL (1986), trabalhando com diversas espécies de *Scilla* (Liliaceae) consideram que as bandas-C intercalares não se formam ao acaso nos cromossomos, mas deviam ser consequência de permutas que ocorreram ao longo do processo evolutivo da espécie, envolvendo regiões eucromáticas intercalares com regiões heterocromáticas terminais de cromossomos não homólogos.

Em café, bandas-C intercalares que ocorrem em alguns cromossomos de *C. canephora*, *C. dewevrei* e de *C. racemosa* (FIGURAS 9, 12 e 13) não parecem estar relacionadas com rearranjos cromossômicos, como discutiremos abaixo.

Os segmentos cromossômicos intercalares evidenciáveis pelo método da banda-C são inconstantes em seu aparecimento ou não, após o tratamento. Essa inconstância foi também notada em bandas que apareceram em cromossomos de endospermas submetidos à solução diluída de Giemsa ou pelo uso desse corante, após a digestão enzimática pela tripsina (FIGURAS 13, 15 e 22).

As espécies *C. deweyrei* e *C. racemosa* apresentaram ideogramas de bandas-C muito semelhantes entre si (FIGURAS 12 e 13). Os melhores resultados em *C. racemosa* foram obtidos em cromossomos prometáfásicos. Muitas semelhanças foram encontradas também entre essas duas espécies e *C. canephora*, a despeito do número restrito de células obtidas nesta última espécie em raiz e em endosperma (FIGURAS 8 a 11).

As porcentagens médias da somatória de segmentos corados pelo bandamento-C, em ideogramas de *C. deweyrei* e de *C. racemosa*, considerando-se as células na prometáfase, foram muito próximas ($37,19 \pm 3,69\%$ e $38,17 \pm 2,94\%$, respectivamente, não sendo, portanto, em si, um bom parâmetro para a caracterização dessas duas espécies. Essa semelhança de resultados na somatória das bandas-C ocorre também quando se compara a distribuição dessas bandas em cromossomos correspondentes das duas espécies. A grande variação na presença e/ou na distribuição das bandas nos cromossomos de *C. deweyrei* e de *C. racemosa* não permite, o que pode ser feito em outros vegetais, uma identificação de espécies por esse método.

Por outro lado, o emprego da solução diluída de Giemsa mostrou diferenças entre *C. canephora* e *C. deweyrei* que se tornaram evidentes quando se fez a somatória dos segmentos corados pelo Giemsa, a partir dos ideogramas elaborados nos cromossomos metafásicos: *C. canephora*, $41,97 \pm 1,27\%$ e *C. deweyrei*, $53,79 \pm 2,71\%$. À essas diferenças entre as duas espécies, devemos ainda acrescentar que *C. deweyrei* apresenta maior número de variantes cromossômicas de bandas, quando analisamos sua frequência e distribuição (FIGURAS 14 e 15).

GUERRA FILHO (1983 e 1988a) encontrou diferenças acentuadas entre a quantidade de segmentos cromossômicos corados pelo Giemsa e pelo bandamento-C, em espécies das famílias Rutaceae e Zingiberaceae. Segundo esse autor, o método de coloração pela solução de Giemsa estaria corando indistintamente qualquer cromatina condensada.

Ao analisarmos os dados obtidos em lâminas de *C. canephora* e de *C. deweyrei*, pelo uso da solução de Giemsa após a digestão pela tripsina, verificamos grande variação na colo-

ração cromossômica não apenas entre as espécies, como também dentro de uma mesma espécie. Somando-se essa variação no bandamento cromossômico ao pequeno número de células com cromossomos identificáveis que conseguimos obter, não achamos os dados suficientes para tirar conclusões a respeito, mas mesmo assim achamos esses resultados de interesse como sugestão para futuros trabalhos na área, daí a apresentação dos ideogramas nas FIGURAS 20 a 22.

A presença da região organizadora do nucléolo (RON), identificável pela impregnação por prata, distingue *C. racemosa*, de um lado, e *C. canephora* e *C. deuveirei*, de outro lado. A primeira tem dois cromossomos (3 e 8) portadores de região organizadora (RON), enquanto que cada uma das outras duas espécies tem região nucleolar apenas no cromossomo 3 (FIGURAS 17, 18 e 19).

Tais dados complementam aqueles obtidos por MEDINA et al. (1977) e por PINTO-MAGLIO & CRUZ (1987) para *C. racemosa*, onde as autoras constataram na diacinese e no paquíteno, respectivamente, a existência de dois pares distintos de cromossomos homólogos.

BOUHARMONT (1963), analisando cromossomos mitóticos de *C. racemosa*, constatou a presença de apenas um par de cromossomos tendo a RON na posição subterminal e nitidamente visível, acompanhada de um pequeno satélite (cromossomo 3). Provavelmente, o método do corte histológico utilizado por Bouharmont, associado ao pequeno tamanho do cromossomo 8, impediram a esse autor verificar que estes cromossomos também comportam outra RON.

Os cromossomos 3 e 8 de *C. racemosa*, quando submetidos à impregnação pela prata, permitem a identificação da RON.

A explicação mais aceita para a existência de dois conjuntos de cromossomos não homólogos portadores da RON, em *C. racemosa*, é a de terem ocorrido permutas desiguais envolvendo regiões de rDNA do cromossomo 3, com o segmento cromatínico do cromossomo 8, seguindo-se de uma posterior amplificação das seqüências de rDNA translocadas.

Quantidades apreciáveis de heteromorfismo de bandas foram observadas no presente trabalho, nos cromossomos mitóticos de *C. canephora*, *C. dewevrei* e de *C. racemosa*, não apenas entre as células de diferentes endospermas, mas também, entre células pertencentes a um mesmo endosperma (FIGURAS 6 a 11). Devemos aqui lembrar que em um mesmo endosperma existem células de diferentes camadas do tecido que não são identificáveis pelo método de esmagamento, e que devem ter funções diversas.

De acordo com GREILHUBER & SPETA (1976), a variabilidade na aparência de algumas bandas-C, deve ser reflexo de uma provável heterogeneidade de certos segmentos heterocromáticos.

Sabe-se também que as alterações nos tempos de exposição do material às soluções que evidenciam bandas-C, por exemplo, contribuem para o aparecimento de variações no número e na posição das bandas, como demonstrado por GREILHUBER & SPETA (1976) e por SHANG et al. (1988).

Contudo, as variações aqui detectadas surgiram em cromossomos de células de um mesmo endosperma e em uma mesma lâmina e, portanto, submetidas às mesmas condições de técnicas.

É provável que tal heterogeneidade de bandas, verificadas nos cromossomos mitóticos de café, incluindo aqui a heterozigose de bandas que apareceu nos braços de alguns cromossomos, seja decorrente do tecido utilizado, a saber em células do endosperma jovem ou em células do endosperma em diferentes fases de crescimento e, conseqüentemente, em fases ativas de seu desenvolvimento.

Assim, concordamos com GREILHUBER & SPETA (1976), de que a variabilidade na aparência de algumas bandas-C sejam o reflexo de uma provável heterogeneidade de certos segmentos heterocromáticos mas, no caso do endosperma de *Coffea*, acreditamos que essa heterogeneidade pode decorrer do processo de diferenciação do tecido e não apenas de translocações cromossômicas.

O endosperma é um tecido especializado de reserva, com a função de produzir e armazenar compostos como amido,

proteínas, enzimas e óleos, que são utilizados para o crescimento do embrião e também durante a germinação da semente. É um tecido que se caracteriza também pela sua efemeridade.

Na fase celular do endosperma, a atividade mitótica vai se restringindo às camadas celulares da região periférica, enquanto que as células centrais perdem essa capacidade e se diferenciam aumentando seu volume, como observado por LAMPE (1931) em milho, e por MEDINA (1964 e 1965) em café.

KOWLES & PHILLIPS (1985) encontraram um aumento considerável no tamanho das células, dos núcleos e na quantidade de DNA (endorreduplicação) das camadas centrais de endospermas em desenvolvimento de milho.

Posteriormente, KOWLES & PHILLIPS (1988), em milho, relataram a ocorrência de amplificação do DNA nos núcleos intercinéticos de células das camadas mais centrais do endosperma em crescimento, coincidindo com o aparecimento e o aumento dos grânulos de amido e de proteínas no citoplasma. Embora tal amplificação do DNA acontecesse de maneira generalizada, não se restringindo à qualquer parte específica do genoma, não se pode, no entanto, pelos dados apresentados, eliminar a possibilidade de endorreduplicação em regiões específicas dos cromossomos, como ocorre em vários organismos (BREUER & PAVAN, 1955; PAVAN *et al.*, 1975; GALLI, 1985; GALLI *et al.*, 1986; KOWLES & PHILLIPS, 1985 e NAGL, 1990.

No presente trabalho não foi elaborado qualquer tipo de experimento que pudesse detectar ou quantificar uma provável amplificação de DNA, nos núcleos de células dos endospermas das espécies de café estudadas. Observou-se, contudo, que as células intercinéticas da camada central desse tecido, apresentava sempre um volume celular e nuclear muito maiores do que as células situadas nas camadas mais periféricas (FIGURA 23), sugerindo, desta forma, um provável aumento na quantidade de DNA como citado anteriormente.

O grau de amplificação, bem como a compactação do DNA amplificado, poderiam estar relacionados com a atividade celular e a posição espacial das células, se periféricas ou se pertencentes às camadas intermediárias do endosperma.

Desta forma, a heterogeneidade das bandas e dos segmentos corados encontrados em nossos experimentos seriam, na verdade, constatação de amplificação prévia e seletiva ocorridas em alguns segmentos cromossômicos durante o crescimento do endosperma.

GALLI et al. (1986) demonstraram, através de experimentos com marcação radioativa, durante o período de germinação das sementes de *Ricinus communis*, que o decréscimo na quantidade de DNA marcado nos núcleos era acompanhado pelo aparecimento de marcação radioativa no citoplasma. O mesmo decréscimo foi visto por KOWLES & PHILLIPS (1985 e 1988) em endospermas jovens e em crescimento de milho, sugerindo uma provável utilização dos nucleotídeos pelo embrião em desenvolvimento. Parece que o conceito de DNA metabólico (PAVAN et al., 1975) estaria bem apropriado para esse fenômeno ora descrito pelos autores acima.

É provável que ampliações seletivas ocorram nos cromossomos mitóticos de células de endospermas jovens e/ou em desenvolvimento, no café, uma vez que esse tecido, produtor de várias substâncias nutritivas para o embrião, está em sua fase final de desenvolvimento e é, posteriormente, em grande parte, absorvido pelo embrião e pela plântula em seu desenvolvimento.

Sabe-se, através de estudos dos mutantes de milho dek (grãos defeituosos), que afetam o desenvolvimento do embrião e do endosperma, que tanto o processo de divisão celular como o processo de amplificação genômica, estão sob controles genéticos distintos (KOWLES et al., 1992).

Uma outra hipótese para explicar a heterogeneidade das bandas nos cromossomos das células dos endospermas de café seria a condensação diferencial de alguns segmentos cromossômicos, associada apenas à expressão gênica temporal, de acordo com o estágio de crescimento e de desenvolvimento de cada célula. Achamos essa explicação pouco provável.

Tanto a condensação diferencial da cromatina, como a amplificação seletiva de DNA, são reflexos de um processo gênico relacionado com a diferenciação celular, que no

caso do endosperma de café resultariam também em uma posterior interrupção da atividade mitótica celular.

Outro achado de interesse é o que foi encontrado na análise de cromossomos formados por cromátides irmãs separadas uma da outra, mas ainda unidas pelo centrômero. Em vários casos foram encontradas bandas evidentes em uma cromátide e ausentes na cromátide irmã correspondente. Como cada par de cromátides irmãs derivou de um cromossomo que se dividiu, é estranho que nesse processo de divisão que espera-se resulte em duas cromátides idênticas, uma apresente uma ou mais bandas que não estão presentes na cromátide irmã correspondente. GARDNER & SNUSTAD (1986) citam casos de células humanas de indivíduos com Síndrome de Bloom, onde ocorrem anomalias desse tipo que eles classificam como trocas diferenciais entre cromátides irmãs.

Pelos dados da literatura, parece que esse tipo de anomalia na divisão cromossômica pode ocorrer também em células em suas últimas divisões mitóticas no processo de diferenciação celular como mostrado por MALHEIRO *et al.* (1990), em cromossomos de linfócitos do sangue periférico de mulheres normais, ou em cromossomos de células somáticas de embriões de camundongos albinos, como demonstrado por TUCCI & SKALKO (1979).

Este fenômeno, deveras estranho, ocorre e pode ser visto em numerosas figuras de cromossomos dos mais variados organismos, sem que a maioria dos autores dêem à ele maior importância. GALLOWAY & EVANS (1975) e outros autores por eles citados, mostraram a existência do fenômeno em cromossomos de células tratadas com BrdU durante as fases de divisão e concluem pela consequência de inversões de cromatina em regiões de DNA repetitivo ou como consequência da substituição da cromatina pelo BrdU. No caso dos cromossomos corados pelo Giemsa, esses autores atribuem a assimetria de bandamento como devido a interações do DNA com proteínas e às variações no conteúdo de DNA satélite, como do DNA repetitivo das regiões de banda-C. As explicações por ora são hipotéticas, precisando de mais experiências para explicar um fenômeno que, a nosso ver, pode ter importância na dinâmica da divisão cromossômica. As

experiências mencionadas em GALLOWAY & EVANS (1975) dizem respeito a cromossomos e derivados de células tratadas com BrdU, mas como foi dito acima, há vários exemplos da ocorrência do fenômeno em células normais em divisão, como as que encontramos em células de *Coffea*. Em tecidos das espécies de café estudadas, essa assimetria de bandas em cromátides irmãs ocorre, mas, infelizmente, esse organismo não é o mais apropriado para a análise do fenômeno. Estamos aqui evidenciando a importância do problema, na esperança de que outros autores, usando organismos mais favoráveis, possam tentar solucionar um fenômeno que pode representar uma faceta importante da duplicação cromossômica em células em diferenciação.

As experiências efetuadas até o presente com a reação nuclear de Feulgen em café, indicaram que esta reação somente se opera fracamente e mesmo assim, somente quando as raízes utilizadas são recém-fixadas ou quando os endospermas já esmagados na lâmina são submetidos previamente a um tratamento com solução de tripsina. Mas, mesmo assim, nestas lâminas não foi conseguida a visualização das cromátides, e os cromossomos, embora visíveis, não são identificáveis. Uma série de variações foi testada, no tempo de duração e/ou nas temperaturas da hidrólise ácida, sem que resultados satisfatórios na identificação dos cromossomos tenham sido obtidos.

Usando a mesma reação de Feulgen, conseguimos, por outro lado, nas células das radículas de *Genipa americana*, espécie da mesma família de *Coffea* (Rubiaceae), a identificação dos cromossomos e das condensações cromatínicas, visíveis igualmente em preparados de bandas-C.

Finalizando, concluiu-se que, embora ocorra heteromorfismo de bandas e ausência da reação nuclear de Feulgen, para estudos comparativos, houve muitas similaridades entre os ideogramas das três espécies de café aqui estudadas, independente da técnica empregada. Parece claro que a evidente diferenciação morfológica e de habitats das três espécies de café aqui estudadas, não foi acompanhada de diferenciação cromossômica do tipo inversões ou translocações. A diferenciação deve ter se dado ao nível gênico, sem que mudanças evidentes na

morfologia dos cromossomos aparecessem, como sugerido por CHARRIER (1978) em outras espécies selvagens de *Coffea*.

6. CONCLUSÕES

As análises citológicas, conduzidas no presente trabalho, indicaram que as três espécies de café aqui estudadas são identificáveis pelo tamanho de seus cromossomos. *C. canephora* tem os maiores cromossomos seguida de *C. deweyrei* e esta de *C. racemosa*.

Excetuando-se os cromossomos de números 5, 10 e 11, que são metacêntricos, os demais são submetacêntricos nas três espécies de café estudadas.

A distinção cariotípica entre *C. canephora* e *C. deweyrei* pode ser também obtida pela coloração Giemsa. A somatória da largura das bandas de *C. deweyrei* ($53,79 \pm 2,71\%$) é maior do que a de *C. canephora* ($41,97 \pm 1,27\%$). Em preparados de *C. racemosa*, por esse método, não foram conseguidos resultados confiáveis.

Por outro lado, a análise das lâminas tratadas pela técnica da banda-C e pelo método da digestão por tripsina, seguida de coloração Giemsa, mostrou grande similaridade de resultados: as bandas pericentroméricas e/ou teloméricas foram praticamente as mesmas em todos os ideogramas. Houve grandes variações no aparecimento ou não das diversas bandas, mas estas variações também se repetiram nas três espécies sem possibilitar, por estes métodos, qualquer diferenciação entre elas.

A acentuada heterogeneidade na posição e no número dos segmentos corados pelos dois métodos nas três espécies foi interpretada como diferentes manifestações de células de camadas diversas do endosperma.

Pelo tamanho e volume das células interfásicas e seus respectivos núcleos, nas camadas mais centrais dos endospermas, pode-se presumir que as mesmas tenham sofrido algum tipo de amplificação gênica.

É presumível ainda que o possível fenômeno da amplificação localizada do DNA esteja relacionado com a fase do desenvolvimento da célula, associada a sua localização espacial dentro do endosperma. Este tecido tem células em fases diferen-

tes de desenvolvimento, dependendo de estarem localizadas nas regiões periféricas, intermediárias ou centrais do tecido.

Baseados em o que ocorre em outros organismos, podemos pensar na possibilidade de que as bandas dos cromossomos de endospermas estejam associadas a um processo de amplificação gênica localizada, decorrente de uma diferenciação celular.

A formação de segmentos corados em apenas uma das cromátides irmãs de alguns cromossomos que ocorre em outros organismos, ocorre também em células do endosperma de café. Para esse fenômeno, existem várias explicações, mas a situação é tão inesperada, que nenhuma delas satisfaz. É, portanto, um processo aberto e, sem dúvida, merece futuros estudos.

Usando o método da impregnação pela prata, foi confirmada a presença de dois cromossomos não homólogos, portadores da RON, em *C. racemosa*. Esses cromossomos foram identificados como os de números 3 e 8. Para *C. canephora* e *C. dewevrei*, o cromossomo 3 é o portador da RON.

7. LITERATURA CITADA

- AGUIAR-PERECIN, M.R.L. 1984. Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M.R.L.; MARTINS, P.S. & BANDEL, G. eds. 1985. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Piracicaba, Rev. Bras. Genét. p.51-67.
- AGUIAR-PERECIN, M.R.L. 1985. C-banding in maize. I. Band patterns. Caryologia, 38:23-30.
- AGUIAR-PERECIN, M.R.L. & VOSA, C.G. 1985. C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. Heredity, 54: 37-42.
- ALLEN, T.D.; JACK, E.P. & HARRISON, C.T. 1988. The three dimensional structure of human metaphase chromosomes determined by scanning electron microscopy. In: ADOLPH, K.W. ed. 1988. Chromosomes and chromatin. Boca Raton, CRC Press. v.2. p.51-72.
- ANAMTHAWAT-JÖNSSON, K. & HESLOP-HARRISON, J.S. 1990. Centromeres, telomeres and chromatin in the interphase nucleus of cereals. Caryologia, 43: 205-13.
- ANTUNES FILHO, H. & CARVALHO, A. 1954. Melhoramento do cafeeiro. VII. Ocorrência de lojas vazias em frutos de café Mundo Novo. Bragantia, 13:165-70.
- BABU, A. & VERMA, R.S. 1987. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. Int. Rev. Cytol., 108:1-60.
- BEDBROOK, J.R.; JONES, J.; O'DELL, M.; THOMPSON, R.D. & FLAVELL, R.B. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in Secale species. Cell, 19:545-60.

- BERTHAUD, J. 1986. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Paris, O.R.S.T.O.M. Travaux et Documents n° 188. 379p.
- BERTHAUD, J. & GUILLAUMET, J.L. 1978. Les caféiers sauvages en Centrafrique. Resultats d'une mission de prospection (janvier-fevrier 1975). Café Cacao Thé, 22:171-86.
- BERTHOU, F.; VEDEL, F. & MATHIEU, C. 1982. Variation dans le structures de l'ADN des organites cellulaires chez les principales espèces du genre *Coffea*. In: 10^{ème}. Colloque Scientifique International sur le Café. Salvador (Brasil), ASIC. p.67-8.
- BERTHOU, F.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F. & QUETIER, F. 1980. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. Café Cacao Thé, 24:313-26.
- BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES JR., C.J. 1988. Principles practices of coffee breeding for resistance to rust and other deseases. In: CLARKE, J.R. & MACRAE, R. eds. 1988. Coffee. Agronomy, v.4. Essex, Elsevier App. S. Pub. p.119-234.
- BLOOM, S.E. & GOODPASTURE, C. 1976. An improved technique for seletive silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Human Genet., 34:199-206.
- BOUHARMONT, J. 1959. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre Coffea. Bruxelles, INEAC. 94p. (Série Scientifique).
- BOUHARMONT, J. 1963. Somatic chromosomes of *Coffea* species. Euphytica, 12:254-7.
- BREUER, M.E. & PAVAN, C. 1955. Behaviour of polytene

- chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma, 7:371-86.
- BRIDSON, D.M. 1982. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. Cinchonoideae) for part 2 of "Flora of Tropical East Africa": Rubiaceae. Kew Bull., 36:817-59.
- BRIDSON, D.M. 1987. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). Kew Bull., 42:453-60.
- BRIDSON, D.M. 1988. *Coffea* botany. In: WRINGLEY, G. ed. 1988. London, Longmans. p.62-8.
- BROWN, S.W. 1966. Heterochromatin. Science, 151:417-25.
- BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. 1982. A relation between G-, C- and N-band patterns as revealed by progressive oxidation of chromosomes and a note on the nature of N-bands. Genetica, 58:3-9.
- CAI, Q. & CHINNAPPA, C.C. 1987. Giemsa C-banded karyotypes of seven North American species of *Allium*. Amer. J. Bot., 74:1087-92.
- CARVALHO, A. 1941. Instabilidade dos alelos *Na-na* de *C. arabica* L. Bragantia, 1:453-8.
- CARVALHO, A. 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie arabica. Separatas dos Boletins da Superintendência dos Serviços do Café, São Paulo, 226/228 e 230. 33p.
- CARVALHO, A. 1958. Recent advances in our knowledge of coffee trees. Genetics. Coffea & Tea Industries and the flavor field, 81:30-6.
- CARVALHO, A. 1960. Genética de *Coffea*. XXV. Ligação genética

- dos fatores anormalis e anomala. Bragantia, 19:191-5. Nota n^o 38.
- CARVALHO, A. & KRUG, C.A. 1946. Genética de *Coffea*. IX. Observações preliminares sobre quimeras genéticas em *Coffea arabica* L. Bragantia, 6:239-50.
- CARVALHO, A. & KRUG, C.A. 1949. Genética de *Coffea*. XII. Hereditariedade da cor amarela da semente. Bragantia, 9:193-202.
- CARVALHO, A. & MONACO L.C. 1959. Híbridos entre *Coffea* e *Psilanthopsis*. Bragantia, 18:21-9.
- CARVALHO, A. & MONACO L.C. 1967. Genetic relationships of selected *Coffea* species. Ciênc. Cult., 19:151-65.
- CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O. & LIMA, M.M.A. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro. Rev. Bras. Genét., 14:135-83.
- CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E.J.; SIMONSSON, E.; WAGH, U. & ZECH, L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exptl. Cell Res., 49:219-22.
- CHARRIER, A. 1977. La structure génétique du genre *Coffea*; ses conséquences pour l'amélioration des caféiers cultivés. In: 7^{ème}. Colloque Scientifique International sur le café. Abidjan, ASIC. p.399-405.
- CHARRIER, A. 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache. Mascaro-coffee. Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eu-coffee). Paris, O.R.S.T.O.M. Mémoires n^o 87. 223p.
- CHARRIER, A. 1985. Progrés et perspectives de l'amélioration génétique des caféiers. In: 11^{ème}. Colloque Scientifique

- International sur le Café. Lomé, ASIC. p.403-25.
- CHARRIER, A. & BERTHAUD, J. 1985. Botanical classification of Coffee. In: CLIFFORD, M.N. & WILSON, K.C. eds. 1985. Coffea: botany, biochemistry and production of beans and beverage. London, AVI Pub. Comp. Inc. p.13-47.
- CHEVALIER, A. 1929. Les caféiers du globe: I. Généralités sur les cafés. Paris, Paul Lechevalier. 196p. (Encyclopédie Agricole n° 5)
- CHEVALIER, A. 1947. Les caféiers du globe: III. Systematique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insects nuisibles. Paris, Paul Lechevalier. 356p. (Encyclopédie Biologique n° 22)
- CHINNAPPA, C.C. 1981. Palynology and systematics of the genus *Coffea* J. Coffee Res., 11:55-69.
- COMINGS, D.E. 1972. The structure and function of chromatin. Adv. Hum. Genet., 3:237-431.
- CRAMER, P.J.S. 1957. Review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba, SIC. Ed. Int. Amer. Inst. Agric. Sc. 262p.
- 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 doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba. 106p.
- D'AMATO, G. & MARCHI, P. 1983. Heterochromatin in *Borago officinalis* L. (Boraginaceae): Comparison between Feulgen and Giemsa stained heterochromatin segments Ann. Bot. (Rome), 41:165-8.
- D'AMATO, G. & TROJANI, Zh. 1985. Giemsa banding karyotype in

- three species of Anchusa (Boraginaceae). Caryologia, 38:13-21.
- DARLINGTON, C.D. & LA COUR, L. 1940. Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. J. Genet., 60:185-213.
- DE CANDOLLE, A.P. 1830. Rubiaceae. In: DE CANDOLLE, A.P. ed. 1824/1873. Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Paris, Treuttel et Wurtz. v.4, p.341-621.
- DEMARLY, Y. 1975. Amelioration du caféier liée aux progrès génétique. In: 7^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café. Abdijan, ASIC. p.423-35.
- DEUMLING, B. & GREILHUBER, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. Chromosoma, 84:535-55.
- DIAZ, M. & PAVAN, C. 1964. Alterações da morfologia e fisiologia de cromossomos politênicos provocadas por agentes infeccionantes. Ciênc. Cult., 16:247.
- DILLE, J.E.; GUSTAFSON, J.P.; BROWN, M. JR.; APPELS, R. & CRAIG, S. 1987. Topographical changes in rye chromosome structure caused by the C-banding procedure. Genome, 72:203-24.
- DREWRY, A. 1982. G-banded chromosomes in *Pinus resinosa*. J. Hered., 73:305-6.
- DUTRILLAUX, B. 1973. Application to the normal karyotype of R-band and G-band techniques involving proteolytic digestion. Nobel Symp., 23:38-42.
- DUTRILLAUX, B.; GROUCHY, J.; FINAZ, C. & LEJEUNE, J. 1971. Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). C.R.

Acad. Sci. Paris sér. D, 273:587-8.

FABER, F.C. von. 1912. Morphologish-Physiologische unter-sunchungen an Blüten von *Coffea*-arten. Ann. Jard. Bot. Buitenz., sér. 2a, 25:59-160 (tradução).

FUNAKY, K.; MATSUI, S.I. & SASAKI, M. 1975. Location of nucleolar organizers in animals and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. Chromosoma, 49:357-70.

GALLI, M.G. 1985. DNA synthesis in storage organs of germinating seeds: an autoradiographic analysis. J. Exptl. Bot., 36:963-73.

GALLI, M.G.; BALZARETTI, R. & SGORBATI, S. 1986. Autoradiographic and cytofluorimetric analysis of DNA synthesis in endosperm and cotyledons of germinating castor bean. J. Exptl. Bot., 37:1716-24.

GALLOWAY, S.M. & EVANS, H.J. 1975. Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man. Preliminary notes Exptl. Cell Res., 94:454-9.

GARDNER, E.J. & SNUSTAD, D.P. 1986. Genética. Rio de Janeiro, Guanabara S.A. 497p. 7a. ed.

GEBER, G. & SCHWEIZER, D. 1988. Cytochemical heterochromatin differentiation in *Synapsis alba* (Crucifera) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. Plant Syst. Evol., 158:97-106.

GERLACH, W.L. 1977. N-banded karyotype of wheat species. Chromosoma, 62:49-56.

GOMES, F.P. 1985. Curso de estatística experimental. Piracicaba, Livraria Nobel. 466p. 11a. ed.

- GREILHUBER, J. 1977. Why plant chromosomes do not show G-bands. Theor. Appl. Genet., 50:121-4.
- GREILHUBER, J. 1984. Chromosomal evidence in taxonomy. In: HEYWOOD, V.H. & MOORE, D.M. eds. 1984. Current Concepts in Plant Taxonomy. London, Acad. Press. v.25, p.157-80.
- GREILHUBER, J. & SPETA, F. 1976. C-banded karyotype in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica* and *S. porschkina* (Liliaceae). Plant. Syst. Evol., 126:149-88.
- GREILHUBER, J. & LOIDL, J. 1982. On regularities of C-banding patterns, and their possible cause. In: BRANDHAM, P.E. & BENNETT, M.D. eds. 1983. Kew Chromosome Conference II. London, George Allen & Unwin. p.344.
- GUERRA FILHO, M.S. 1983. O uso de Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandamento. Ciênc. Cult., 35:190-3.
- GUERRA FILHO, M.S. 1988a. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). Plant Syst. Evol., 158:107-15.
- GUERRA FILHO, M.S. 1988b. Introdução à Citogenética Geral. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara. 141p.
- GUERREIRO FILHO, O. 1992. *Coffea racemosa* Lour. Une revue. Café Cacao Thé, 36:171-86.
- HAARER, A.E. 1958. Modern coffee production. London, Leonard Hill Ltd. 467p.
- HARRISON, C.J.; ALLEN, T.D. & HARRIS, R. 1983. Scanning electron microscopy of variation in human metaphase chromosome structures revealed by Giemsa bandings. Cytogenet. Cell Genet., 35:21-7.

- HAYASHI, S.; RUDELL, A.; SINCLAIR, D. & GRIGLIATTI, T. 1990. Chromosomal structure is altered by mutations that suppress or enhance position effect of variegation. Chromosoma, 99:391-400.
- HENEEN, W.K. & BRISMAR, K. 1987. Rye heterochromatin in the somatic chromosomes of triticale in relation to grain shrivelling. Hereditas, 107:137-45.
- HENIKOFF, S. 1990. Position effect variegation after 60 years. Trends in Genetics, 6:422-6.
- HERSHFIELD, B. & SWIFT, H. 1990. Characterization of a tandemly repeated DNA from the fleshfly *Sarcophaga bullata*. Chromosoma, 99:125-30.
- HERSKOWITZ, M. 1961. The hypothesis of nucleotide sharing by adjacent functional units of DNA. Genetics, 46:870.
- HOLMQUIST, G. 1979. The mechanism of C-banding depurination and β -elimination. Chromosoma, 72:203-4.
- HOLMQUIST, G. 1988. DNA sequences in G-bands and R-bands. In: ADOLPH, K.W. ed. 1988. Chromosomes and chromatin. v.2.
- HOUK, W.G. 1938. Endosperm and perisperm of coffee with notes on the morphology of the ovule and seed development. Amer. J. Bot., 25:56-61.
- HSU, T.C. 1974. Longitudinal differentiation of chromosomes. Ann. Rev. Genet., 7:153-76.
- JACK, E.M.; HARRISON, C.J.; ALLEN, T.D. & HARRIS, R. 1985. The structural basis for C-banding. A scanning electron microscopy study. Chromosoma, 91:363-8.
- JORDAN, E.G. 1987. Nucleolar organizers in plants. In: STAHL, A.; LUCIANI, J.M. & VAGNER-CAPODANO, A.M. eds. 1987.

Chromosomes Today, v.9., London, Allen & Unwin. 317p.

JOUVE, N.; GALINDO, C.; NESTA, M.; DIAZ, F.; ALBELLA, B.; GARCIA, P. & SOLER, C. 1989. Changes in triticales chromosome heterochromatin visualized by C-banding. Genome, 32:735-42.

KAKEDA, K.; FUKUI, K. & YAMAGATA, H. 1991. Heterochromatin differentiation in barley chromosomes revealed by C- and N-banding techniques. Theor. Appl. Genet., 81:144-50.

KAKEDA, K.; YAMAGATA, H.; FUKUI, K. ; OHNO, M.; WEI, Z.Z. & ZHU, F.S. 1990. High resolution bands in maize chromosomes by G-banding methods. Theor. Appl. Genet., 80:265-72.

KATO, H. & MORIWAKI, K. 1972. Factor involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. Chromosoma, 38:105-32.

KENTON, A. 1991. Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). Chromosoma, 100:467-78.

KHUONG, N.T. & SCHUBERT, I. 1985. Silver staining of nucleolus organizing regions in *Zea mays*. Caryologia, 38:331-4.

KONISHI, T. & LINDE-LAURSEN, I. 1988. Spontaneous chromosomal rearrangements in cultivated and wild barley. Theor. Appl. Genet., 75:237-43.

KOWLES, R.V. & PHILIPS, R.L. 1985. DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7010-14.

KOWLES, R.V. & PHILIPS, R.L. 1988. Endosperm development in maize. Int. Rev. Cytol., 112:97-136.

- KOWLES, R.V.; McMULLEN, M.D.; YERK, G.; PHILLIPS, R.L.; KRAEMER, S. & SRIENC, F. 1992. Endosperm mitotic activity and endoreduplication in maize affected by defective kernel mutations. Genome, 35:68-77.
- KRUG, C.A. 1934. Contribuição para o estudo da cytologia do gênero *Coffea*. Campinas, Instituto Agronômico. 10p. (Boletim técnico nº 11).
- KRUG, C.A. 1936a. Estudos cytologicos em *Coffea*. II. Campinas, Instituto Agronômico. 5p. (Boletim técnico nº 27).
- KRUG, C.A. 1936b. Genética de *Coffea*. Campinas, Instituto Agronômico. 39p. (Boletim técnico nº 26).
- KRUG, C.A. 1937. Observações citológicas em *Coffea*. III. Campinas, Instituto Agronômico. 19p. (Boletim técnico nº 27).
- KRUG, C.A. 1939. Genética de *Coffea*. I. Hereditariedade de um tipo anão-nana. Campinas, Instituto Agronômico. 13p. (Boletim técnico nº 47).
- KRUG, C.A. 1949. Mutações em *Coffea arabica* L. Bragantia, 9:1-10.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A. 1939. Genetical proof for the existence of coffee endosperm. Nature, 144:515.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A. 1951. The genetics of *Coffea*. Adv. Genet., 4:127-58.
- LAMPE, L. 1931. A microchemical and morphological study of the developing endosperm of maize. Bot. Gazet., 91:337-76.
- LAVANIA, U.C. & SHARMA, A.K. 1983. Chromosome banding in evolutionary plant cytogenetics. Proc. Indian Acad. Sci.

(Plant Sci.), 92:51-79.

LELIVELD, J.A. 1939. Vruchtzetting bij Koffie. Arch. voor der Koffie-cultuur in Ned. Indie., 3:127-64 (tradução).

LEROY, J.F. 1960. Sur un caféier sauvage du Ghana, le *Coffea brenanii* J.F. Ler. et sur des espèces apparentées. J. Agric. Trop. Bot. Appl., 7:713-4.

LEROY, J.F. 1961. *Coffea novae Madagascariensis*. J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 8:1-20.

LEROY, J.F. 1962a. Prospection des caféiers sauvages: rapport préliminaire sur une mission scientifique à Madagascar et aux Îles Mascareignes (27 avril - 15 juillet 1962). J. Agric. Trop. Bot. Appl., 9:211-44.

LEROY, J.F. 1962b. Sur l'existence d'un caféier sauvage aux Îles Philippines: *Coffea mabesae* (Elmer) J.F. Ler. (Subg. *Paracoffea*). J. Agric. Trop. Bot. Appl., 9:417-9.

LEROY, J.F. 1962c. *Coffeae novae Madagascariensis et Mauritianaes*. J. Agric. Trop. Bot. Appl., 9:525-30.

LEROY, J.F. 1967a. Diagnose différentielle du genre *Paracoffea* Ler. J. Agric. Trop. Bot. Appl., 14:226.

LEROY, J.F. 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, sér. D, 265:1043-5.

LEROY, J.F. 1980. Les grandes lignées de caféiers. In: 9^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café. Londres, ASIC. p.473-7.

LEROY, J.F. 1981. Les caféiers du genre *Psilanthus* (Rubiaceae) en Afrique Orientale et en Asie et Îles du

- Pacifique. Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. Sect. B. Adamsonia Bot. Phytochim., 3:251-8.
- LEROY, J.F. & PLUS, A. 1966. Sur les nombres chromosomiques des *Coffea* malgaches. Café Cacao Thé, 10:216-7.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERD, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52:201-20.
- LIMA-DE-FARIA, A. 1959. Incorporation of tritiated thymidine into meiotic chromosomes. Science, 130:503-4.
- LIMA-DE-FARIA, A. & JAWORSKA, H. 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature, 217:138-42.
- LINDE-LAURSEN, I.; BOTHMER, R.V. & JACOBSEN, N. 1980. Giemsa C-banding in asiatic taxa of *Hordeum* section *stenostachys* with notes on chromosomes morphology. Hereditas, 93:235-54.
- LINNAEUS, C. von. 1762. Specie Plantarum. 2.ed. Stockholm, Laurentii Salvi. v.1, p.245-6.
- LISON, L. 1960. Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars. 842p.
- LONGO, C.R.L. 1972. Estudos dos pigmentos flavonóides e sua contribuição à filogenia do gênero *Coffea*. Tese de doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba. 91p.
- LOPES, C.R. & MÓNACO, L.C. 1979. Chemotaxonomic studies of some species of the genus *Coffea*. J. Plant. Crops., 7:6-14.
- LOPES, C.R.; SHEPHERD, G.J. & CURI, P.R. 1985. Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de *Coffea*. In: V Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, Botucatu. p.65. Resumos.

- LOPES, C.R. & SHEPHERD, G.J. 1991. Phylogenetic studies of some species of the genus *Coffea*. I. Numerical analysis of flavonoid compounds. Rev. Bras. Genét., 14:425-35.
- LOUARN, J. 1972. Introduction à l'étude génétique des *Mascarocoffea*; Nouvelle détermination de leurs nombres chromosomiques. Café Cacao Thé, 16:312-6.
- LOUARN, J. 1985. Études de combinaisons interspécifiques entre caféiers africains diploïdes: fertilité et comportement méiotiques des hybrides entre *Coffea canephora* Pierre et *C. racemosa* Lour. In: 11^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café. Lomé, ASIC. p.453-60.
- LOZANO, R.; SENTIS, C.; FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. & REJÓN, M.R. 1991. In situ digestion of satellite DNA of *Scilla siberica*. Chromosoma, 100:439-42.
- MAGLIO, C.A.F.P. 1983. Morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno no gênero *Coffea* L. Tese de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas. 92p.
- MALHEIRO, I.; PORTO, B. & GOYANES, V. 1990. Morphometric analysis of human chromosome satellites and NOR asymmetries by transmission electron microscopy. Cytobios, 61:31-40.
- MARKS, G.E. 1983. Feulgen banding of heterochromatin in plant chromosomes. J. Cell Sci., 62:171-6.
- MARKS, G.E. & SCHWEIZER, D. 1974. Giemsa banding karyotype differences in some species of *Anemone* and *Hepatica nobilis*. Chromosoma, 44:405-21.
- MEDINA, D.M. 1964. O endosperma de café como material para estudos citológicos. Bragantia, 23:179-86.
- MEDINA, D.M. 1965. Novas observações citológicas no

endosperma de café. Bragantia, 24:369-84.

MEDINA, D.M. 1972. Caracterização de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Tese de doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba. 110p. + 29 quadros.

MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. 1964. Técnicas citológicas. Campinas, Instituto Agronômico. 108p. Publicação n^o 2610.

MEDINA, D.M. & RIJO, L. 1969. Microsporogênese em *Coffea stenophylla* G. Don e *C. salvatrix* Swynn et Phil. Bragantia, 28:307-22.

MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. & CRUZ, N.D. da. 1977. Microsporogenesis in diploid species of *Coffea*. Caryologia, 30:13-25.

MEDINA, F.J.; SONANILLA, E.L.; SÁNCHEZ-PINA, M.A.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E. & RISUEÑO, M.C. 1986. Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. Chromosoma, 94:259-66.

MELLO, M.L.S. 1978. Heterocromatina. Ciênc. Cult., 30: 290-303.

MENDES, A.J.T. 1938. Morfologia dos cromosômios de *Coffea excelsa* Chev. Campinas, Instituto Agronômico. 8p. (Boletim técnico n^o 56)

MENDES, A.J.T. & BACCHI, O. 1940. Observações citológicas em *Coffea*. V. Uma variedade haplóide (di-haplóide) de *C. arabica* L. Jornal de Agronomia (Piracicaba), 3:183-206.

MENDES, A.J.T. & MEDINA, D.M. 1955. Controle genético dos frutos chochos no café "Mundo Novo". Bragantia, 14:87-99.

MENDES, A.J.T.; MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. 1954.

- Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café "Mundo Novo". Bragantia, 13:257-79.
- MÓNACO, L.C. & CARVALHO, A. 1975. Coffee breeding for leaf rust resistance. In: 7ème Colloque Scientifique International sur le Café. Abdijan, ASIC. p.437-45.
- MORRIS, K.L.D. & GILL, B.S. 1987. Genomic affinities of individual chromosomes based on C- and N-banding analyses of tetraploid *Elymus* species and their diploid progenitor species. Genome, 29:247-52.
- MURATA, M. & ORTON, T.J. 1984. G-band-like differentiation in mitotic prometaphase chromosomes of celery. J. Hered., 75:225-8.
- NAGL, W. 1990. Gene amplification and related events. In: BAJAJ, YPS. ed. 1990. Biotechnology in Agriculture and Forestry. v.11. Somaclonal variations in Crop improvement. I. Berlin, Springer-Verlag. p.153-201.
- NAGL, W. & CAPESIUS, I. 1977. Repetitive DNA and heterochromatin as a factor of karyotype evolution in phylogeny and ontogeny of orchids. In: CHAPPELLE, A. & SORSA, M. eds. 1977. Chromosomes Today .6. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biom. Press. p.141-52.
- NOGUCHI, J. & OHNO, T. 1989. The reaction to C-banding of C-banded constituents during mitotic cycle of *Crepis capillaris*. Bot. Mag. Tokyo, 102:207-18.
- ODD, J.L. & SCHOLTEN, R. 1982. The staining of constitutive heterochromatin, and A-T and G-C rich DNA in lymphocytes and primary spermatocytes of the chinese hamster. Genetica, 58:55-63.
- PARDUE, M.L. & GALL, J. 1968. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168:1356-8.

- PARDUE, M.L. & HENNIG, W. 1990. Heterochromatin: junk or collectors item? Chromosoma, 100:3-7.
- PARIS CONFERENCE. 1971. Standardization in human cyto genetics. Birth Defects. Orig. Art. Ser. VIII. 7, 1972. New York, The National Foudation. p.1-46.
- PAVAN, C. 1946. Two types of heterochromatin in *Drosophila nebulosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 32:137-45.
- PAVAN, C. 1965. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation. Brookhaven Symp. Biol., 18:222-41.
- PAVAN, C.; BRITO DA CUNHA, A. & SANDERS, P. 1975. *Rhynchosciara*. In: KING, R.C. ed. 1975. Handbook of Genetics. 3. New York, Plenum Press. p.207-56.
- PIEROZZI, N.I. & CRUZ, N.D da. 1988. Número e identificação dos cromossomos de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) através de técnicas de banda-C. Ciênc. Cult., 40:802. Resumos.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. 1991. Identificação dos cromossomos paquitênicos de *Coffea arabica* L. Tese de doutorado apresentada à Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas. 123p.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. & CRUZ, N.D. da. 1987. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. Caryologia, 40:7-23.
- PIZA, S.T. 1929. Observações sobre a caryocinese na raiz do cafeeiro. Rev. Agric. (Piracicaba), 4:9-12.
- RAMACHANDRAN, C. & NARAYAN, R.K.J. 1990. Satellite DNA specific to knob heterochromatin in *Cucumis metuliferus* (Curbitaceae). Genetica, 80:129-38.

- RUAS, C.F. 1989. Evolução cariotípica no gênero *Mikania* Wild (Compositae). Tese de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" (ESALQ), Piracicaba. 137p.
- SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R. & DÍAZ DE LA GUARDIA, R. 1989. Quantitative analysis of silver staining of the nucleolar organizing region in *Elymus quercinus*. Genome, 32:978-82.
- SCHUBERT, I. 1984. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae s.lat.)? - Interferences from the specificity of silver staining. Plant Syst. Evol., 144:291-305.
- SCHUBERT, I. 1990. Restriction endonuclease (RE-) banding of plant chromosomes. Caryologia, 43:117-30.
- SCHWEIZER, D. 1982. Distamycin - DAPI bands: properties and occurrence in species. In: BRANDHAM, P.E. & BENNETT, M.D. eds. 1983. Kew Chromosome Conference II. London, Allen & Unwin. p.43-51.
- SCHWEIZER, D. & AMBROS, P. 1979. Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. Plant Syst. Evol., 132:27-51.
- SCHWEIZER, D. & EHRENDORFER, F. 1983. Evolution of C-band patterns in Asteraceae-Anthemidae. Biol. Zentrab., 162:637-55.
- SCHWEIZER, D. & LOIDL, J. 1986. A model for heterochromatin dispersior and the evolution of C-band patterns. In: STAHL, A.; LUCIANI, J.M. & VAGNER-CAPODANO, A.M. eds. 1987. Chromosomes Today. London, Allen & Unwin. p.61-74.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. & HAMILTON, B. 1987. Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. In: HENNIG, W.

- ed. 1987. Results and problems in cell differentiation 14. Structure and function of eukaryotic chromosomes. Heidelberg, Springer-Verlag. p.235-54.
- SHANG, X.M.; JACKSON, R.C. & NGUYEN, H.T. 1988. Heterochromatin diversity and chromosome morphology in wheats analysed by the HKG banding technique. Genome, 30:956-65.
- SHIRAISHI, Y & YOSIDA, T.H. 1972. Banding patterns analysis of human chromosomes by use of a urea treatment technique. Chromosoma, 37:75-85.
- SPECTOR, D.L.; OCHS, R.L. & BUSCH, H. 1984. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B₂₉ e C₂₉. Chromosoma, 90:139-48.
- STEFFENSEN, D.M. 1986. Genetics of heterochromatin in *Drosophila* and maize. In: STAHL, A.; LUCIANI, J.M. & VAGNER-CAPODANO, A.M. eds. 1987. Chromosomes Today. v.9. Cambridge, Allen & Unwin. 317p.
- STERGIANOU, K.K. 1989. Habit differentiation and chromosome evolution in Pleione. Plant Syst. Evol., 166:253-64.
- SWANSON, C.P.; MERZ, T. & YOUNG, W.J. 1981. Cytogenetics. Englewood Cliffs, Prentice-Hall Inc. 577p. 2nd. ed.
- SYBENGA, J. 1960. Genética y citología del café. Una revisión de literatura. Turrialba, 10:83-137.
- TAUNAY, A.E. 1939. A história do café no Brasil. In: TAUNAY, A.E. ed. 1939. A história do café no Brasil. Rio de Janeiro, Ed. do Departamento Nacional do Café do Rio de Janeiro. 1939/1943. v.1, 338p.
- TUCCI, S.M. & SKALKO, R.G. 1979. Chromosome lateral asymmetry: a sensitive assay for screening teratogenic

- agents. J. Environ. Pathol. Toxicol., 2:625-32.
- UTAKOJI, T. 1973. Differential staining of human chromosomes after oxidation treatment. Nobel Symp., 23:346-9.
- VOSA, C.G. 1975. The use of Giemsa and other staining technique in karyotype analysis. Curr. Adv. Plant Sc., 6:495-510.
- VOSA, C.G. 1976a. Chromosome banding pattern in cultivated and wild barleys (*Hordeum* spp). Heredity, 37:395-403.
- VOSA, C.G. 1976b. Heterochromatic patterns in *Allium*. I. The relationship between the species of the cepa group and its allies. Heredity, 37:383-92.
- VOSA, C.G. 1977. Heterochromatic patterns and species relationships. The Nucleus (Calcutta), 20:33-9.
- VOSA, C.G. 1979. Heterochromatic banding patterns in the chromosomes of *Brimeura* (Liliaceae). Plant Syst. Evol., 132:141-8.
- VOSA, C.G. 1980. Chromosome analysis and heterochromatin recognition in the southern african species of *Ornithogalum*:
1. *Ornithogalum seineri* (Engl. & KR.) Oberm. J.S. Afr. Bot., 46:445-50.
- VOSA, C.G. & AGUIAR, M.L.R. 1972. New chromosome technique for knobs detection in mitotic chromosomes in maize and teosinte. Maize Genet. Coop. Newsletters, 46:165-7.
- VOSA, C.G. & MARCHI, P. 1972. Guinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. Nature (New Biol.), 237:191-2.
- WARD, E.J. 1980. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. Can. J. Genet. Cytol., 22:61-7.

- WATSON, E.M. 1987. C-banding patterns in the Australian *Bulbine* (Liliaceae): the perennial group, *B. bulbosa* s. lato. Plant Syst. Evol., 157:201-17.
- WATSON, E.M. 1988. C-banding patterns in the Australian *Bulbine* (Liliaceae): the annual group, *B. semibarbata* s. lato. Plant Syst. Evol., 159:1-17.
- YANG, X. & ZHANG, Z. 1988. In situ induction of G-bands and macrocoils in plants chromosomes. Hereditas, 109:45-51.
- YUNIS, J.J. & YASMINEH, W.G. 1971. Heterochromatin, satellite, DNA and cell function. Science, 174:1200-9.