

CECILIA ALZIRA FERREIRA PINTO MAGLIO



Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida pela
candidata Cecilia A. F. P. Maglio
e aprovada pela comissão julgadora.

19/04/91

IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS PAQUITENICOS DE *Coffea arabica* L.

Impl.
27/05/95

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

orientadores: Dra Neusa Diniz da Cruz (in memoriam)

Prof. Dr. Gil Martins Felipe

Campinas - SP
Estado de São Paulo - Brasil
1991

M273i

13933/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

In Memoriam

Profa. Dra. Neuza Diniz da Cruz

Aos meus pais,

Ao Jean

Ao Gustavo

Ao Guilherme

Às pessoas que contribuíram
para o meu progresso pessoal
e formação intelectual

DEDICO COM CARINHO.

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e força que me permitiram superar as dificuldades encontradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho. Porém de forma especial agradeço:

À Profa. Dra. Neusa Diniz da Cruz (in memoriam), Pesquisadora Científica da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas, pela sua dedicação, orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Gil Martins Felipe, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio e orientação prestada.

À Profa. Therezinha S. Melhem, Pesquisadora do Instituto de Botânica; Profa. Dra. Margarida L. Aguiar Perecin, do Depto. de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; Prof. Dr. George Shepherd, do Depto. de Botânica da Universidade Estadual de Campinas e Dr. Luís Carlos G. Simões, Depto. de Biologia da Universidade de São Paulo, por suas valiosas críticas e sugestões.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas outorgadas, permitindo a realização deste trabalho.

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

Ao Eng^o Agr^o Ivan Cavalin I. dos Santos, pelo imenso auxílio na digitação e impressão deste trabalho.

Às colegas pesquisadoras e às funcionárias da Seção de
Citologia do Instituto Agronômico, pela colaboração e amizade.

ÍNDICE

Relação de figuras e tabela.....	I
Resumo.....	III
Summary.....	V
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	5
2.1. O Gênero <i>Coffea</i> : Histórico da taxonomia.....	5
2.2. Citologia de <i>Coffea arabica</i>	7
2.3. A origem de <i>Coffea arabica</i> L. e sua relação com algumas espécies diplóides de <i>Coffea</i>	13
2.4. A caracterização de cromossomos na fase de paquíteno e a citogenética da plantas.....	19
3. Material.....	35
4. Métodos.....	36
4.1. Coleta e fixação do material.....	36
4.2. Considerações sobre a metodologia da coleta do material	36
4.3. Preparação das lâminas.....	38
4.4. Desenhos e fotografias.....	39
4.5. Medidas.....	39

5. Resultados.....	41
Morfologia e medidas dos cromossomos de <i>C. arabica</i>	41
6. Discussão	77
7. Conclusões.....	91
8. Referências bibliográficas.....	93

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELA

FIGURA

Pag.

1 - Cariótipo, em paquiteno, de <i>C. arabica</i> L.	48
2 - Esquemas dos 22 bivalentes do complemento de <i>C. arabica</i> L.	49

TABELA

1 - Valores do comprimento total e de braços de todos os 22 cromossomos do complemento de <i>C. arabica</i> L.	50
---	----

FIGURAS

3 a 22 - Vários aspectos dos cromossomos:

Nº 1.....	51
Nº 2.....	52
Nº 3.....	53
Nº 4.....	54
Nº 5.....	55
Nº 6.....	56
Nº 7.....	57
Nº 8.....	58
Nº 9.....	59
Nº 10.....	59
Nº 11.....	60
Nº 12.....	61
Nº 13.....	62
Nº 15.....	63

N ^o 16.....	64
N ^o 17.....	65
N ^o 18.....	66
N ^o 19.....	67
N ^o 20.....	68
N ^o 22.....	69

FIGURA

23 - <i>C. arabica</i> L., nucléolos ligados a dois cromossomos nucleolares, os cromossomos 14 e 21.....	70
24 - <i>C. arabica</i> L., nucléolos ligados a três cromossomos nucleolares, os cromossomos 14, 20 e 21.....	71
25 - Translocações observadas na meiose, fase de paquíteno, em <i>C. arabica</i> L.	72
26 - Fotomicrografia e respectiva interpretação, de translocação observada na meiose de <i>C. arabica</i> L.	72
27 - Fotomicrografias, e respectivas interpretações, de associações entre bivalentes na meiose de <i>C. arabica</i> L.	73
28 - Fotomicrografia e respectiva interpretação, de uma célula semi-completa, na fase de paquíteno, de <i>C. arabica</i> L.	74

RESUMO

Dentro do gênero *Coffea* L. a espécie de maior importância econômica *C. arabica* L., é uma exceção no gênero pois é a única espécie poliplóide com $n = 22$ cromossomos e autocompatível, enquanto todas as demais espécies são diplóides e incompatíveis.

A herança dissômica em *C. arabica* e a constatação de pareamento entre cromossomos de plantas di-haplóides dessa espécie e mesmo a facilidade de cruzamento com várias outras espécies do gênero, têm indicado ser a mesma um alopóliploide de segmento, ou seja, os genomas que fazem parte de seu complemento são considerados bastante semelhantes, apesar do comportamento meiótico ser regular sem a formação de multivalentes.

A origem da espécie *C. arabica*, apesar dos trabalhos realizados sobre o assunto, é ponto de controvérsia e continua a suscitar curiosidade tanto com relação às possíveis espécies ancestrais, como à constituição desta espécie poliplóide, a qual poderia ter surgido através de duas possibilidades a autopoliploidia ou alopóliploidia. Dentro da hipótese da alopóliploidia várias espécies têm sido sugeridas como possíveis ancestrais de *C. arabica*.

A análise comparativa de cariótipos no gênero *Coffea* baseada em cromossomos mitóticos, se mostrou difícil e, até certo ponto, ineficiente devido ao pequeno tamanho e similaridade dos mesmos, o que tem impedido a identificação de cada um dos cromossomos nos diferentes genomas. Com base nestes dados, foi feita a identificação dos 22 bivalentes do complemento de *C. arabica* na fase meiótica de paquíteno.

A análise da morfologia dos cromossomos na fase de

IV

paquíteno revelou que ocorre semelhanças estruturais entre 54% dos bivalentes, ou seja, doze pares são semelhantes entre si, dois a dois, o que talvez signifique uma certa homologia entre os cromossomos de *C. arabica*, fato este que encontra apoio na observação de duas associações secundárias parciais entre duas duplas de bivalentes, uma delas entre dois pares de bivalentes nucleolares. Com base nestes dados obtidos e outros anteriores disponíveis, é discutida a possibilidade da existência, em *C. arabica*, de um sistema genético, semelhante ao que ocorre em *Triticum* e outros gêneros, que impede o pareamento entre cromossomos homeólogos. Duas translocações foram registradas, uma delas envolvendo também um dos cromossomos nucleolares.

Durante as análises de morfologia foi constatada ainda uma variação no número de cromossomos responsáveis pela formação do nucléolo. A maioria das células apresentou dois cromossomos nucleolares, e o restante três destes cromossomos. Este fato associado à observação de outros bivalentes do complemento que apresentam uma morfologia característica de cromossomos nucleolares do gênero *Coffea*, e ao fato de *C. arabica* ser uma espécie de natureza híbrida, leva a supor que nesta espécie poderia estar ocorrendo a supressão da função organizadora do nucléolo, e também relações de dominância, entre alguns cromossomos do complemento com a função potencial de formar o nucléolo.

SUMMARY

Coffea arabica L. is an exception in the genus *Coffea* L. because it is the only species so far analysed to have $2n = 4x = 44$ chromosomes and is predominantly autogamous. All the other species are diploid with $2n = 22$ chromosomes and are self incompatible. The species *C. arabica* has been considered a segmental allopolyploid, because it presents: a diploid like behaviour, a marginal geographic distribution and a relatively easy crossability with other *Coffea* species. Di-haploid plants of this species show also some degree of chromosome pairing. The structure and the origin of *C. arabica* is a point of controversy and many coffee researchers consider this species as a segmental allopolyploid. Many diploid species have been suggested as possible parentals. Analysis of somatic metaphases chromosomes show little differences among chromosomes. It is very difficult to identify them individually.

In view of this problem, detailed morphological analysis of the pachytene chromosomes of *C. arabica* was carried out. The pachytene chromomeric patterns revealed that there occurs some structural similarities in about 54% of the 22 bivalentes. Twelve of these 22 pairs of bivalents are similar to each other, two by two, in their chromomeric patterns indicating some degree of structural homology. This fact is supported by two secondary associations observed, one of them involving one nucleolar bivalent. Based on these results and other from the literature, it is suggested that *C. arabica* has a genetic system controlling chromosome pairing like that of *Triticum* and other genera. Two translocations were observed. In one of them a nucleolar chromosome was involved. The number of chromosome

VI

attached to the nucleolus varied from one to three, but more frequently two of them. This observation, associated with the fact that other chromosomes of the complement show a characteristic morphology of the nucleolar chromosomes and the fact that *C. arabica* has a hybrid origin, lead us to suggest that nucleolar dominance relations may be occurring in this species.

1. INTRODUÇÃO

É indiscutível a importância econômica do gênero *Coffea* L. não só para o Brasil como para outros países de América Latina, como Colômbia e Costa Rica que são, após o Brasil, os maiores produtores e exportadores mundiais de café. Segundo dados do IBC (Instituto Brasileiro do Café) o Brasil produziu 23,6 milhões de sacas em 1989, contra uma produção mundial de 92,8 milhões. É justamente devido ao grande valor econômico dessa cultura que muita pesquisa tem sido feita no gênero *Coffea*, especialmente com relação à espécie *Coffea arabica* L. no que diz respeito ao melhoramento genético visando maior produtividade, resistência a pragas e doenças, adaptabilidade a condições ambientais xerofíticas e resistência ao frio (VANDER DER VOSSSEN, 1985; CARVALHO, 1988).

O melhoramento genético de café feito através de hibridações intra e interespecíficas, implicou numa demanda de pesquisas paralelas, abrangendo diversas outras espécies do gênero, numa tentativa de estabelecer relações mais claras sobre as afinidades entre as mesmas. Entre estas pesquisas destacam-se as análises citogenéticas (MEDINA, 1972; CHARRIER, 1978); bioquímicas (LONGO, 1972; LOPES & MÔNACO, 1977; LOPES & MÔNACO, 1979; HÖFLING & OLIVEIRA, 1981; RAM *et al.* 1982; LOPES *et al.* 1984); palinológicas (LOBREAU-CALLEN & LEROY, 1980; CHINNAPPA, 1981; CHINNAPPA & WARNER, 1982) e de caracterização de DNA de cloroplastos e mitocondrial (BERTHOU *et al.* 1980, 1983). De modo geral, as espécies diplóides do gênero *Coffea* apresentam alguma proximidade genética entre elas verificada através do número de quiasmas quase igual entre as mesmas e das análises citológicas de híbridos interespecíficos onde foi registrada uma alta frequência na formação de bivalentes.

Apesar da grande diversidade morfológica e fisiológica, o gênero apresenta também pouca variação com relação à estrutura e número dos cromossomos (nível de ploidia).

A espécie de maior importância econômica *C. arabica* L., responsável por três quartos da produção mundial, é uma exceção dentro do gênero *Coffea*, pois é a única espécie poliplóide do gênero com $n = 22$ cromossomos e autocompatível (KRUG & CARVALHO, 1951; CARVALHO *et al.*, 1969), enquanto as demais são todas diplóides com $n = 11$ e autoincompatíveis (MENDES, 1949; MEDINA & CONAGIN, 1959; CONAGIN & MENDES, 1961; MÔNACO, 1972).

A origem de *C. arabica*, apesar dos diversos trabalhos realizados sobre o assunto, continua a suscitar uma certa curiosidade, tanto em relação às possíveis espécies ancestrais como à constituição desta espécie poliplóide. A espécie poderia ter surgido através de duas possibilidades: a autopoliploidia ou alopolidia. Porém, a maioria dos dados disponíveis até o momento tem levado os estudiosos no assunto a aceitarem esta última hipótese como a mais provável.

A herança dissômica em *C. arabica* e a constatação de pareamento entre cromossomos dentro do complemento de plantas haplóides dessa espécie (MENDES & BACCHI, 1940; BERTHAUD, 1976; KAMMACHER, 1980) e mesmo a facilidade de cruzamento com várias espécies do gênero (CARVALHO & MÔNACO, 1967) têm indicado que a mesma é um alopolidia de segmento, ou seja, os genomas que fazem parte de seu complemento são bastante semelhantes, apesar do comportamento meiótico regular sem a formação de multivalentes (KRUG & MENDES, 1943; MENDES, 1950; MEDINA, 1950; MENDES, 1958).

Dentro da hipótese da alopolidia para *C. arabica*, várias espécies têm sido sugeridas como possíveis ancestrais. *C. eugenioides* Moore tem sido citada quase que com unanimidade, já uma

segunda espécie tem variado, de acordo com o tipo de análise efetuada, entre *C. canephora* Pierre ex Froehner, *C. liberica* Hiern, e *C. congensis* Froehner (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987). Há ainda suposições que sugerem que a segunda espécie ancestral não esteja mais presente entre as atuais espécies de *Coffea* (CHARRIER, 1978).

Os trabalhos realizados sobre a morfologia de cromossomos metafásicos somáticos através de técnicas tradicionais (BOUHARMONT, 1959, 1963) não revelaram características cromossômicas que destacassem os diferentes genomas constituintes do tetraplóide *C. arabica*. Também dados existentes sobre o uso de técnicas de bandamento para identificação de cromossomos em geral, têm revelado certo insucesso em relação a espécies vegetais que possuem cromossomos extremamente pequenos, como é o caso do café. Com base nestes dados, foi escolhida a fase meiótica de paquíteno para identificação dos cromossomos de café. A escolha da fase de paquíteno justifica-se porque os cromossomos nessa fase, além de não se acharem no estágio de condensação máxima e portanto relativamente maiores que na fase de metáfase, apresentam certas propriedades que propiciam uma análise de morfologia relativamente detalhada. Nessa fase, estando os homólogos totalmente pareados, é possível observar diversas características que permitem a identificação individual dos cromossomos como: comprimento relativo dos cromossomos, relação de braços ou posição do centrômero, tipo ou padrão de distribuição dos cromômeros, presença de possíveis aberrações, constrições secundárias e satélites, além do grau de pareamento dos homólogos.

Com o intuito de testar a caracterização dos cromossomos do gênero *Coffea* na fase de paquíteno, foi realizado em trabalho anterior (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987) o reconhecimento apenas dos cromossomos nucleolares de dez espécies do gênero, devido ao fato

destes cromossomos se apresentarem ligados ao nucléolo, o qual serviu como referencial na localização dos cromossomos dentro das células. No entanto a continuidade da análise morfológica dos cromossomos do gênero *Coffea* é de interesse no aspecto filogenético, e principalmente no que diz respeito à especiação no gênero e origem de *C. arabica*. No aspecto dos estudos genéticos, o conhecimento dos cromossomos de *C. arabica* é importante para o estudo de plantas aneuplóides que por sua vez pode trazer novas possibilidades no melhoramento através da substituição de cromossomos.

Basicamente, os objetivos deste trabalho são os seguintes:

- a) contribuir para o conhecimento dos cromossomos de *C. arabica* através da identificação, na fase de paquíteno da meiose, dos 22 bivalentes que constituem o complemento desta espécie.
- b) fornecer dados que possam subsidiar a especiação no gênero *Coffea* e principalmente a origem de *C. arabica*.
- c) demonstrar a viabilidade da metodologia de caracterização de cromossomos, em detalhes, na fase de paquíteno da meiose.
- d) fornecer subsídios para a caracterização de plantas aneuplóides de café, que por sua vez possibilitará a ampliação dos conhecimentos básicos sobre grupos de ligação e sua aplicação no melhoramento de café.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O GÊNERO *Coffea*: HISTÓRICO DA TAXONOMIA

O gênero *Coffea* L. pertence à família Rubiaceae, sub-família Cinchonoideae. Calcula-se que possua cerca de 60 espécies, a maioria delas nativas do continente africano. As espécies de *Coffea* estão distribuídas pelas regiões de florestas tropicais e subtropicais da África Central, Ocidental e Oriental; Ilhas Mascarenhas, Madagascar e Sul da Ásia (CARVALHO, 1946; CARVALHO et al. 1969; MEYER, 1965).

As diversas espécies ocupam ambientes distintos como locais baixos e úmidos, locais de florestas mais densas e outras mais abertas e lugares altos, montanhosos e mais secos.

A primeira descrição de uma planta do gênero *Coffea*, a única existente na época no Jardim Botânico de Amsterdã, foi feita em 1715 por A. de Jussieu com o nome de *Jasminum arabicanum*. Porém, foi Linneu quem criou o gênero *Coffea* em 1735 e em 1753 descreveu a primeira espécie no Species Plantarum como sendo *Coffea arabica*, apesar de já existirem publicações sobre café dois séculos antes (CARVALHO, 1946).

Dentro do gênero *Coffea*, a espécie *C. arabica* tem sido a mais cultivada e a de maior importância econômica. Esta espécie é originária das regiões altas e montanhosas do sudoeste da Etiópia, sul do Sudão e norte do Quênia e apresenta uma distribuição geográfica marginal em relação à área de todas as outras espécies do gênero (CARVALHO, 1946.)

Posteriormente várias espécies foram descobertas, principalmente durante a grande exploração das florestas africanas na segunda metade do século XIX. Foram descritas por vários botânicos o que resultou numa quantidade grande de sinônimas (CHARRIER &

BERTHAUD, 1985).

Novas delimitações para o gênero foram estabelecidas por LEBRUN (1941) e CHEVALIER (1942, 1947), sendo que o último realizou a maior das revisões taxonômicas feitas até agora para o gênero *Coffea*. Baseou seu estudo em plantas coletadas no local de origem e coleções de herbários, reduzindo então drasticamente o número de espécies, subdividindo o gênero em 4 seções: *Paracoffea* Mig., *Argocoffea* Pierre, *Mascarocoffea* Chev e *Eucoffea* K. Shum emend.

As seções *Eucoffea* e *Mascarocoffea* têm sido as mais estudadas. *Eucoffea*, que engloba os cafés de origem africana, possui as espécies de maior valor econômico e portanto as mais cultivadas, *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex Froehner. *Mascarocoffea* engloba os cafés da ilha de Madagascar, é constituída de espécies que produzem frutos cujas sementes não têm cafeína ou a possuem em teor muito baixo (CHARRIER, 1978).

A seção *Eucoffea* foi dividida por CHEVALIER (1947) em cinco subseções de acordo com critérios variados: 1) *Erythrocoffea* que possui plantas com frutos de cor vermelha e onde inclui-se a espécie *C. arabica*; 2) *Pachycoffea* com plantas de folhas grossas; 3) *Melanocoffea* com plantas de frutos de cor escura; 4) *Nanocoffea* com plantas de porte pequeno; 5) *Mozambicoffea* com plantas cuja distribuição geográfica se restringe à área da antiga Moçambique. Embora no conceito atual este tipo de classificação seja considerada insatisfatória e artificial, há muitos anos o trabalho de CHEVALIER (1947) tem sido o principal e único ponto de referência taxonômica para as espécies de café.

Outros autores, como COSTE (1955), GRAMER (1957) e PORTÈRES (1962), também revisaram a taxonomia do gênero descrevendo novas espécies.

LEROY (1967a, b, c) realizou um trabalho mais extenso que o dos autores anteriores, dedicando-se porém, mais intensamente às espécies de *Mascarocoffea*. Baseando-se principalmente no tipo de placentação e posição de inflorescências este autor restringiu a distribuição de *Coffea* "sensu stricto" à África e Madagascar. As demais espécies foram reagrupadas em um novo gênero, *Paracoffea* Leroy, o qual passou posteriormente a subgênero de *Psilanthus* Hook F., um gênero africano próximo de *Coffea*. Este mesmo autor (LEROY, 1980), através da análise do tipo de gineceu e placentação associado ao hábito de crescimento e distribuição geográfica, discriminou melhor o gênero *Coffea* em relação a outros gêneros próximos, como *Psilanthus* Hook F.. Também estabeleceu relações entre os mesmos, relações essas importantes para o melhor entendimento dos problemas taxonômicos em *Coffea*.

Num trabalho de revisão para as Rubiáceas da África Oriental, BRIDSON (1982) verificou que dentro do gênero *Coffea* havia ainda alguns *taxa*, classificados anteriormente, que necessitavam de revisão. A autora descreveu sete novas espécies e duas subespécies, além de registrar ainda novas sinonímias.

2.2. CITOLOGIA DE *Coffea arabica*

Os primeiros trabalhos de citologia no gênero *Coffea* restringiram-se, praticamente, à contagem do número de cromossomos. VON FABER (1912) encontrou $2n = 16$ para *C. arabica*. PIZA (1929) descreveu a mitose somática em *C. arabica* sem determinar precisamente o número de cromossomos, apenas registrou serem eles pequenos e numerosos. Já Homeyer (1933 in KRUG 1934) efetuando contagens de cromossomos em várias Rubiaceae entre elas *C. arabica*, encontrou

$2n = 44$ para esta espécie e determinou $x = 11$ como o número básico para o gênero. Da mesma maneira FAGERLIND (1937) num trabalho com Rubiaceae também encontrou $2n = 44$ para *C. arabica*, confirmando os dados de Homeyer (KRUG, 1934).

No Brasil a primeira série de trabalhos sobre citologia de *Coffea* foi feita por KRUG (1934, 1937a) que resultou na contagem do número cromossômico de oito espécies e 17 variedades de *C. arabica* L. Inicialmente KRUG (1934) analisou, além de três espécies diplóides $2n = 22$, cinco variedades de *C. arabica* (amarelo de Botucatu, nacional, bourbon, laurina, e maragogipe) com relação ao número de cromossomos metafásicos somáticos e cromossomos metafásicos meióticos. Nesse trabalho, através da homogeneidade do número de cromossomos encontrados para todas as cinco variedades ($2n = 44$), o autor constatou a condição tetraplóide e questionou a natureza dessa poliploidia frente à impressionante normalidade da divisão meiótica nesta espécie.

Mais tarde KRUG (1937a) analisou 13 novas formas de *C. arabica*, além de outras quatro espécies. Novamente o autor verificou $2n = 44$ para dez das variedades com três exceções: uma forma haplóide (variedade *monosperma*), e formas hexaploides e octoploides para a variedade *bullata* Gramer. Estas foram então estudadas em detalhe (KRUG, 1937b).

Com o incremento das pesquisas visando o melhoramento de café, através de hibridações interespecíficas, fez-se necessário o estudo mais detalhado da microsporogênese de *C. arabica*, como também das principais espécies diplóides, de modo a elucidar a composição dos vários híbridos obtidos na época.

MENDES (1950) analisou o comportamento meiótico das variedades *semperflorens* e *caturra* de *C. arabica*, descrevendo em

detalhes todo o processo como: número de cromossomos nucleolares, número de quiasmas por célula, pareamento de bivalentes e formação de pólen. Foi concluído que a microsporogênese era normal nessas variedades de *C. arabica*.

MEDINA (1950) também estudou a microsporogênese de *C. arabica* L. var. *rugosa* K.M.C., porém com a finalidade de esclarecer a baixa produtividade apresentada por essa variedade como também a razão da não apresentação de rugosidade nas progênes dessas plantas. De qualquer modo, foi verificado que tais problemas não se relacionavam com a microsporogênese já que o processo era totalmente normal.

Paralelamente ao estudo do comportamento meiótico dessas variedades de *C. arabica* foram feitas análises do comportamento meiótico nas principais espécies diplóides de *Coffea*, geralmente utilizadas nas hibridações interespecíficas com *C. arabica* (MENDES, 1950; MEDINA, 1952; CONAGIN, 1961; MEDINA & RIJO, 1969 e MEDINA *et al.* 1977).

Um dos últimos trabalhos publicados sobre o comportamento meiótico em *C. arabica* foi feito por GRASSIAS & KAMMACHER (1975) em três diferentes variedades: *tana*, *guinnée*, *pita* e *caturra amarelo*. Os autores constataram algumas irregularidades como a presença de cromossomos não pareados, a presença de bivalentes em associação secundária e a formação de alguns multivalentes. Essas irregularidades, jamais registradas anteriormente, levaram esses autores a questionar a natureza da poliploidia em *C. arabica*. Avaliando seus dados citológicos frente a outros existentes, de caráter genético, os autores concluíram que *C. arabica* possui citologicamente a estrutura de um alopoliploide de segmento, formado pela junção de dois genomas, onde alguns cromossomos conservam grande similaridade.

Além da análise do comportamento meiótico das espécies de *Coffea* e variedades de *C. arabica*, a necessidade de se identificar morfológicamente os cromossomos ficou demonstrada num trabalho realizado por CRUZ (1972) em aneuplóides do cultivar "Mundo Novo" de *C. arabica*, devido à dificuldade de se associar a morfologia das plantas com os cromossomos em falta ou excesso. A não identificação dos cromossomos limita de certa forma, o prosseguimento da pesquisa e a utilização de aneuplóides em programas de melhoramento onde seja necessário fazer-se a associação de genes aos cromossomos, ou no caso de transferência de caracteres desejáveis de uma espécie para outra, por meio da substituição de cromossomos através de plantas monossômicas ou nulissômicas.

Apesar de KRUG (1934, 1937a) ter relatado algumas observações sobre tamanho e morfologia dos cromossomos de algumas espécies de *Coffea*, pode-se dizer que foi MENDES (1938a, b) quem efetuou as primeiras tentativas de descrever a morfologia dos cromossomos somáticos em *Coffea*, mais precisamente de *C. excelsa* Chev. (atual *C. deweyrei* Wild et Dur.). O autor verificou que apesar dos cromossomos desta espécie serem um pouco maiores que das demais, eram ainda pequenos (1,5 a 3,5 μ m). Este autor conseguiu apenas separá-los em três classes (A, B e C) de acordo com o comprimento, e somente os três maiores da classe A puderam ser diferenciados na sua morfologia, os restantes pouco se diferenciavam um dos outros.

BOUHARMONT (1959, 1963) foi quem efetuou o estudo mais extenso sobre a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea*, onde foram incluídos os cariótipos de 16 espécies, inclusive da espécie tetraplóide *C. arabica*. O autor constatou a grande uniformidade no comprimento e morfologia dos cromossomos das várias espécies, sendo impossível a individualização dos cariótipos de acordo com as

diferentes espécies. Devido a essa grande semelhança o autor optou pela construção de um cariótipo médio padrão para o gênero *Coffea*, do qual é possível identificar-se apenas quatro cromossomos dos 11 constituintes do complemento básico do gênero.

A similaridade entre os cromossomos do genoma de *C. arabica* tem sido notada também a partir de estudos envolvendo análise de pareamento cromossômico em plantas haplóides dessa espécie. Estudos sobre comportamento meiótico de haplóides têm sido interessantes porque a presença de um único genoma em plantas derivadas de alopoliplóides pode, de certa forma, revelar homeologias ainda presentes entre os genomas que formaram o alopoliplóide, já que neste caso o pareamento homeólogo pode ser totalmente expresso devido a ausência do pareamento homólogo preferencial que ocorre nas condições euplóides. Assim, MENDES & BACCHI (1940) ao analisarem uma variedade di-haplóide de *C. arabica* observaram 16 a 22 cromossomos na fase de metáfase I, e constatarem o pareamento ocasional de um a seis bivalentes em 71% das células analisadas.

VISHVESHWARA (1960) ao estudar também algumas plantas haplóides de *C. arabica* registrou a presença de bivalentes em 40% das células analisadas.

BERTHAUD (1976) ao contrário dos autores anteriores que estudaram di-haplóides provenientes de variedades cultivadas, estudou di-haplóides provenientes da progênie de segunda geração de plantas coletadas dentro da área de origem da espécie *C. arabica* na Etiópia. A análise de 63 células com 22 cromossomos mostrou que o número de bivalentes variou de dois a oito, sendo as células com quatro bivalentes as mais numerosas.

KAMMACHER (1980) analisando o comportamento meiótico de cinco plantas di-haplóides de *C. arabica*, dando ênfase não somente ao

pareamento na prófase, mas à capacidade de formação de quiasmas na metafase I, registrou uma frequência média de 2,29 bivalentes e uma frequência média de 3,19 quiasmas por célula, mostrando que, cerca de três cromossomos em cada genoma se correspondem. Segundo o autor, tais cromossomos teriam permanecido homossequenciais como deveriam ter sido quando da formação do alopoliplóide ancestral de *C. arabica*. Assim os genomas de *C. arabica* demonstram uma afinidade residual entre três cromossomos, o que explica o porque da formação de até seis bivalentes na meiose.

Após várias pesquisas com algumas espécies de *Coffea*, MEDINA *et al.*, (1977) concluíram que o estudo do número de quiasmas nas espécies individuais, do comportamento meiótico em híbridos interespecíficos e de cariótipos somáticos obtidos através de metodologia de coloração convencional, não constituíam critérios decisivos para o estabelecimento das relações entre as espécies do gênero. Ressaltaram que, talvez, a análise de cromossomos na fase de paquíteno, ou mesmo a comparação de cariótipos somáticos obtidos através de técnicas de bandamento, pudesse fornecer bases para uma melhor caracterização das espécies e das relações entre as mesmas.

PINTO-MAGLIO & CRUZ (1987), com base nessas informações, deram início a um trabalho de caráter metodológico, envolvendo a identificação de cromossomos nucleolares em paquíteno, em nove espécies diplóides do gênero *Coffea*, mais a espécie tetraplóide *C. arabica*. Através dessa análise foi caracterizado o padrão de cromômeros dos cromossomos nucleolares das 10 espécies e foi constatado que tal padrão nessas espécies era constituído de cromômeros localizados predominantemente próximos ao centrômero e poderia ser usado como parâmetro comparativo, haja vista, a constância e especificidade observadas dentro de cada uma das plantas analisadas.

Com relação a *C. arabica*, foi verificado que os dois cromossomos nucleolares observados eram semelhantes entre si na sua morfologia e semelhantes aos cromossomos nucleolares de *C. eugenioides* e *C. deweurei*.

Simultaneamente, PIEROZZI (1986) realizou vários experimentos visando a caracterização dos cromossomos somáticos das espécies *C. deweurei* De Wild et Dur. e *C. racemosa* Lour., através de técnicas de bandamento C, NOR e bandas reveladas pela enzima proteolítica, tripsina. Foi utilizado tecido do endosperma das sementes dessas espécies por ser um tecido de condição triplóide, e um tecido mole que dispensa pré-tratamento para parede celular. Nesse trabalho a autora caracterizou parcialmente os cariótipos das referidas espécies e demonstrou a grande dificuldade na adaptação das técnicas de bandamento para os cromossomos de café. Atualmente a autora (comunicação pessoal) vem constatando, nos cromossomos das mesmas espécies acima mencionadas e na espécie *C. canephora*, a presença de bandas C pericentroméricas e teloméricas. Não há dados sobre bandamento para a espécie *C. arabica*.

2.3. A ORIGEM DE *Coffea arabica* L. E SUA RELAÇÃO COM ALGUMAS ESPÉCIES DIPLÓIDES DE *Coffea*.

O problema da origem de *C. arabica*, a única espécie poliplóide no gênero, é um dos pontos que tem suscitado grande curiosidade dos pesquisadores.

A originalidade desta espécie tem sido um ponto de controversia principalmente no que diz respeito a determinação das possíveis espécies ancestrais. A origem de *C. arabica*, em princípio,

poderia ter ocorrido através de autopoliploidia ou de alopoliploidia. Esta última possibilidade é a que tem encontrado maior respaldo pela maioria dos estudiosos, devido a uma série de evidências.

Baseando-se, inicialmente, no comportamento meiótico e no fato de seu centro de diversidade genética estar situado marginalmente à área de distribuição das espécies diplóides, CARVALHO (1952) sugeriu, pela primeira vez, uma origem alotetraplóide. Posteriormente, o comportamento de alguns híbridos interespecíficos com *C. arabica* e o modo de herança de alguns fatores duplicados revelaram que essa espécie possui a estrutura de um alopoliploide de segmento (CARVALHO *et al.*, 1969).

Dentro da hipótese da alopoliploidia, e levando em conta os mais variados tipos de análises, algumas espécies diplóides têm sido sugeridas como possíveis ancestrais.

THOMAS (1944) registrou a ocorrência de *C. eugenioides* e *C. canephora* nas mesmas áreas de florestas de Uganda. A partir disto, sugeriu que cruzamentos entre essas espécies poderia ter resultado na síntese de *C. arabica*. Admitiu ainda, que *C. arabica* talvez pudesse ter se originado de *C. eugenioides*, pelo fato desta espécie se parecer morfológicamente com *C. arabica*, porém em tamanho menor.

KRUG & CARVALHO (1951) e GRAMER (1957) sugeriram que as espécies *C. canephora* e *C. eugenioides* poderiam estar relacionadas com a origem de *C. arabica*, não só devido à similaridade morfológica de certas formas de *C. eugenioides* com alguns mutantes de *C. arabica* mas devido à distribuição geográfica destas espécies. GRAMER (1957) sugeriu ainda que *C. arabica* poderia também ser o produto da hibridação natural de *C. eugenioides* e *C. congensis*, seguida de duplicação cromossômica e posterior diferenciação.

NARASINRASWAMY & VISHVESHWARA (1961) indicaram como

ancestrais de *C. arabica*, *C. liberica* e *C. eugenioides*. Isto porque a análise de um ramo tetraplóide de uma planta híbrida entre estas espécies ser, fenotipicamente, muito similar à *C. arabica*.

FERNIE (1966) obteve uma planta do cruzamento de *C. deweurei* com *C. eugenioides*, bastante semelhante à *C. arabica*.

GARVALHO & MÔNACO (1967) analisaram dados de 888 combinações de hibridações interespecíficas envolvendo nove espécies diplóides e *C. arabica*, resultantes de 50623 polinizações manuais efetuadas durante 35 anos. Dessa análise os autores verificaram que : híbridos entre *C. eugenioides* e *C. canephora* eram relativamente férteis e produziam quantidades razoáveis de sementes e fenotipicamente lembravam muito *C. arabica*; os híbridos entre *C. liberica* e *C. eugenioides* tiveram sucesso relativo, tendo produzido um número razoável de plântulas, a nível diplóide, também semelhantes a *C. arabica* sendo a flor e frutos mais característicos de *C. liberica*; híbridos entre *C. deweurei* e *C. eugenioides* mostraram-se vigorosos e férteis a nível diplóide, mas distintos morfologicamente de *C. arabica*. Os autores concluíram que as espécies *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. congensis* poderiam provavelmente ter participado na origem de *C. arabica*.

CHARRIER (1978) estudou, a nível de populações, os cafés da seção *Mascarocoffea*. Através de hibridações e análise citogenética dos híbridos avaliou as relações de afinidade entre 26 espécies de *Mascarocoffea* e as cinco principais espécies de *Eucoffea*: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. liberica* e *C. deweurei*. Verificou que alguns híbridos entre *C. arabica* e espécies diplóides da seção *Mascarocoffea* obtiveram sucesso comparável aos híbridos obtidos entre *C. arabica* e algumas espécies diplóides da seção *Eucoffea* e maior sucesso que alguns híbridos entre espécies diplóides de ambas as

seções. A partir dessas observações salientou que, na aloploidia de *C. arabica*, um dos genomas ancestrais desta espécie poderia estar presente tanto numa das espécies de *Eucoffea* como numa das de *Mascarocoffea*. Além disso, a síntese de *C. arabica* requereria a presença de um segundo genoma, mais diferenciado, que poderia ser encontrado em gêneros ou subgêneros próximos, como também a existência de um sistema genético de regulação de pareamento que favorecesse o comportamento dissômico da espécie *C. arabica*.

Análises citogenéticas de pareamento cromossômico em híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora* têm reafirmado simultaneamente a hipótese da aloploidia de *C. arabica* e o fato de um dos genomas desta espécie ter uma estrutura bastante próxima à estrutura cromossômica da espécie *C. canephora*.

KRUG & MENDES (1940) ao analisarem citologicamente um híbrido triplóide entre *C. arabica* ($2n = 44$) e *C. canephora* ($2n = 22$), registraram a formação de trivalentes e portanto, uma possível homeologia entre os cromossomos dessas espécies.

Outros trabalhos envolvendo análises citológicas de híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora* têm registrado um número médio de bivalentes potenciais próximo a 11, ou seja, 11 cromossomos constituintes do genoma de *C. arabica* seriam estruturalmente semelhantes ao genoma de *C. canephora* (CHINNAPPA, 1968; KAMMACHER & CAPOT, 1972; OWUOR & VAN DER VOSSEN, 1981; OWUOR, 1985; BOAVENTURA, & CRUZ, 1987).

Além dos dados de hibridações interespecíficas, análises bioquímicas, palinológicas e de DNA de organelas têm fornecido também, subsídios para o esclarecimento da estrutura e origem da espécie *C. arabica*.

LONGO (1972) e LOPES & MÔNACO (1979), numa tentativa de

melhorar a delimitação dos grupos taxonômicos dentro do gênero *Coffea*, analisaram compostos flavonóides em 10 espécies. Com relação à origem de *C. arabica*, verificaram que: *C. eugenioides* mostrou padrões destes compostos que indicaram alta afinidade com *C. arabica*; *C. liberica* e *C. deweurei* mostraram também afinidade por *C. arabica*, mas os dados para estas espécies seriam insuficientes como suporte à participação das mesmas na origem de *C. arabica*; a espécie *C. congensis*, que também tem sido considerada um dos ancestrais de *C. arabica*, não revelou proximidade; dentro da subseção *Erythrocoffea* a espécie *C. arabica* revelou maior afinidade por *C. canephora*. Sendo assim, concluíram que os dados de compostos flavonóides apenas adicionaram informações à hipótese de que *C. canephora* seria uma das espécies ancestrais do alotetraplóide, *C. arabica*.

LOPES *et al.* (1985) analisaram 13 espécies de café através de eletroforese em gel de amido, os padrões isoenzimáticos de fosfatases alcalina e ácida, esterases alfa e beta, desidrogenases alcoólica e málica. Com relação a *C. arabica* as análises revelaram boa afinidade com *C. canephora*, *C. congensis* e *C. liberica*. Novamente, seria difícil, apesar dos resultados, sugerir qual destas três espécies, juntamente com *C. eugenioides*, teria participado da formação de *C. arabica*.

A partir de análises sobre afinidades serológicas entre seis espécies de *Coffea*, HÖFLING & OLIVEIRA (1981) verificaram que *C. arabica* mostrou maior afinidade pelas espécies *C. congensis* e *C. eugenioides* e em menor grau por *C. canephora*. Os autores sugeriram a participação das duas primeiras espécies na formação de *C. arabica*.

RAM *et al.* (1982) analisaram algumas espécies de *Coffea* através de testes químicos simples para fenóis, taninos, flavonóides, esteróides e outros componentes. A afinidade química entre as espécies

foi avaliada através de um coeficiente de similaridade, a partir do qual foi verificado que, de um modo geral, tanto a nível de espécie como a nível de subseção os perfis químicos obtidos eram bastante distintos. Neste trabalho o coeficiente da espécie *C. eugenioides* evidenciou uma fraca afinidade desta espécie tanto por *C. arabica* como por *C. congensis*.

Em relação aos estudos com pólen de *Coffea*, LOBREAU-CALLEN & LEROY (1980) tentaram desenvolver algumas bases palinológicas aplicáveis à sistemática dos cafés em geral, e estudaram cerca de 50 espécies envolvendo não só o gênero *Coffea*, mas gêneros próximos como *Psilanthus* e *Notolachna*. O pólen da espécie tetraplóide *C. arabica*, quando comparado com os das demais espécies, apresentou-se extremamente variável, porém com dois tipos extremos ligados por uma série de tipos intermediários. Um dos tipos é preferencialmente comparável àquele da espécie *C. canephora* do que àquele da espécie *C. eugenioides* e o segundo tipo se aproximou mais de *C. paolia*, café este pouco explorado. Segundo os autores, o pólen de *C. paolia* é semelhante a um tipo resultante de híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora*. Em comum com *C. arabica*, *C. paolia* é a única outra espécie do gênero que é xerofítica.

CHINNAPPA & ADAMS (1974); CHINNAPPA (1981) e CHINNAPPA & WARNER (1982) estudaram a morfologia polínica de cerca de 38 espécies de *Coffea*. Descreveram o pólen de *C. arabica* como tendo grande heterogeneidade de formas, dentre todas as espécies analisadas, com a presença de seis tipos distintos. O polimorfismo do pólen de *C. arabica* foi comparável apenas ao pólen de *C. eugenioides* tendo as duas espécies apresentado inclusive alguns tipos similares entre elas. Segundo os autores este polimorfismo polínico de *C. arabica* refletiria a constituição complexa desta espécie alotetraplóide.

BERTHOU *et al.* (1982) e BERTHOU *et al.* (1983), compararam o DNA de cloroplasto e DNA mitocondrial, obtidos através de enzimas de restrição, em seis espécies de *Coffea* e uma espécie do gênero *Paracoffea*. Os padrões eletroforéticos obtidos para os fragmentos de DNA de cloroplasto da espécie *C. arabica* mostraram-se idênticos aos de *C. eugenioides*, os da espécie *C. congensis* idênticos aos de *C. canephora*. Para os fragmentos de DNA mitocondrial, os padrões obtidos para *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. congensis* mostraram-se indistinguíveis entre si. As outras espécies estudadas, inclusive a nível de gênero, apresentaram padrões distintos para os dois tipos de DNA. Concluíram que estes resultados evidenciam dois ramos evolutivos distintos dentro da subseção *Erythrocoffea* com as espécies *C. arabica* e *C. eugenioides* de uma parte e *C. congensis* com *C. canephora* de outro. Esta observação levou os autores a formularem uma hipótese sobre a origem de *C. arabica*, na qual esta espécie seria um alotetraplóide resultante da reunião destes dois ramos evolutivos, hipótese esta também apoiada em estudos com isozimas feito por BERTHOU & TROUSLOT (1977) e BERTHOU *et al.* (1980) que registraram um maior grau de afinidade enzimática entre *C. canephora* - *C. congensis* do que entre *C. eugenioides* - *C. liberica*. Com relação a *C. arabica*, foram constatadas afinidades, envolvendo diferentes isoenzimas, pelos dois grupos formados pelas espécies acima, os quais mostraram-se inclusive complementares na reconstituição dos zimogramas, para fosfatase e esterase, da espécie *C. arabica*.

2.4. A CARACTERIZAÇÃO DE CROMOSSOMOS NA FASE DE PAQUÍTENO E A CITOGENÉTICA DE PLANTAS

Um dos aspectos importantes na identificação de

cromossomos é a elaboração de ideogramas de cariótipos, os quais têm sua maior utilidade em certos tipos de estudos comparativos e de filogenia, onde constituem um dado morfológico complementar. Os ideogramas de cariótipos são elaborados, habitualmente, a partir de cromossomos somáticos na fase de metáfase. No entanto, diversos organismos podem exibir cromossomos extremamente pequenos que impossibilitam sua diferenciação, ou cromossomos sem diferenciação longitudinal quanto à posição de centrômero, relação de braços, constrição secundária, etc. Geralmente são cromossomos que resultam em cariótipos denominados do tipo simétrico (STEBBINS, 1971) onde a identificação individual, através de técnicas comuns de coloração torna-se quase impossível.

A partir dos anos sessenta o surgimento de novas técnicas citológicas mais aprimoradas, no sentido de diferenciar longitudinalmente os cromossomos e conseqüentemente permitir o reconhecimento individual de cada cromossomo (CASPERSON et al 1969), revolucionou o campo das pesquisas com cariótipos. HSU (1973), num trabalho de revisão, relata a seqüência, a partir de CASPERSON et al. (1969), do surgimento destas técnicas citológicas e sua aplicação na diferenciação longitudinal de cromossomos.

O bandamento cromossômico em plantas, por exemplo, tem permitido a visualização de características cromossômicas que muitas vezes têm sido decisivas em estudos de sistemática e evolução (FUKUDA, 1984; VOSA, 1985). O padrão de bandamento C em plantas está limitado, de um modo geral, à distribuição de heterocromatina constitutiva, já que em plantas considera-se a não existência de bandas G, bandas estas que são comuns nos cromossomos de animais (GREILHUBER, 1977).

Apesar da disponibilidade das técnicas de bandamento para a diferenciação longitudinal dos cromossomos, eventualmente ainda

ocorrem dificuldades na aplicação destas técnicas em determinados materiais vegetais, principalmente naqueles cujos complementos são constituídos de cromossomos relativamente pequenos, como é o caso do café. Isto porque, segundo GRANT (1987) as plantas, com cromossomos pequenos estariam limitadas, pelo tamanho dos cromossomos, na sua quantidade total de cromatina e portanto, também na quantidade de heterocromatina. Esta, por sua vez estaria contida em segmentos de tamanho insuficiente para se mostrarem como bandas. Nestes casos, a solução tem sido o aproveitamento da diferenciação longitudinal natural, oferecida pela fase de paquíteno da prófase meiótica, para descrição da morfologia dos cromossomos. O paquíteno é o melhor estágio do complemento cromossômico para elaboração de cariótipo nas espécies vegetais onde os cromossomos somáticos não podem ser diferenciados individualmente.

Ao contrário do bandamento, a diferenciação da fase de paquíteno é obtida através de técnicas mais simples. É empregada apenas a técnica de esmagamento de anteras, em corantes, como o carmim acético ou propiônico, ao invés de tratamentos químicos mais drásticos dos cromossomos, como aqueles utilizados para o bandamento. Além disto, a identificação de cromossomos na fase de paquíteno se adapta perfeitamente a plantas onde os cromossomos mitóticos em metáfase são pequenos. Isto porque nesta fase os cromossomos não atingiram seu grau máximo de condensação e portanto, apresentam-se bem mais longos do que em mitose. Na fase de paquíteno, quando o pareamento é completo, é possível obter-se informações tais como: comprimento total dos cromossomos, relação de braços ou posição do centrômero, tipo ou padrão de distribuição de cromômeros, constrições secundárias, zonas satélites e "knobs" (que são grandes blocos heterocromáticos sub-terminais ou terminais bastante evidentes, usados como marcadores

ou como ponto de referência na identificação de cromossomos). Estas características, a exemplo das bandas, são específicas para cada cromossomo, e quando, estabelecidas permitem a construção de ideogramas bem mais precisos do que os habitualmente construídos a partir de cromossomos somáticos em metáfase.

A análise da morfologia de cromossomos na fase de paquíteno oferece ainda, devido ao pareamento, elementos para se avaliar o grau de homologia cromossômica, a presença de aberrações e possíveis desvios dos modelos cromoméricos em híbridos, as chamadas hibridações estruturais, possibilitando uma abordagem na origem e na classificação de espécies (OURENCHY, 1963). Pode-se ainda dizer que quando o complemento de uma espécie é identificado em paquíteno o caminho está aberto para a identificação de linhas trissômicas, estoques com inversões, translocações e análise do genoma em geral, que constituem dados úteis para o estabelecimento de relações diretas entre genes e cromossomos. Com a finalidade de obter dados mais acurados sobre: morfologia de cromossomos; tentar estabelecer as relações de afinidade entre espécies (filogenia), como pré-requisito para o estabelecimento de grupos de ligação; verificar a origem e a natureza de espécies poliplóides; ou mesmo confirmar o grau de ploidia, possível em paquíteno quando se constata a ocorrência de múltiplos genomas semelhantes ou parte deles; foi utilizado para uma série de trabalhos bem sucedidos, desde a década de 50 até hoje em gêneros como: *Plantago* (HYDE, 1953), *Hordeum* (SARVELLA et al., 1958), *Mnesithea* (ROY & SINGH, 1958), *Saintpaulia* (ERLICH, 1958), *Cynodon* (OURENCHY, 1963, BRILMAN et al., 1982), *Rubus* (BAMMI, 1965), *Dichanthium* (ROY et al., 1965), *Hibiscus* (MENZEL, 1966), *Oryza* (SHASTRY et al., 1960, DAS & SHASTRY, 1963, SEN, 1963, CHU, 1967, MISRA & SHASTRY, 1967), *Prunus* (WHELAN, 1969, JELENKOVIC & HARRINGTON,

1972), *Linum* (LOBANA *et al.*, 1972), *Pennisetum* (VENKATESWARALI & PANTULU, 1968; LOBANA & GILL, 1973), *Apluda* (MURTY, 1973), *Ricinus* (JACOB, 1956; JELENKOVIC & HARRINGTON, 1973; PARIS *et al.*, 1978; PARIS, 1981), *Beta* (YU, 1977), *Crotalaria* (GUPTA & GUPTA, 1978), *Cornus* (HARRINGTON *et al.*, 1985), *Impatiens* (RAGHUVANSHI & MAHAJAN, 1985), *Coleus* (BAHL & TYAGI, 1988), *Artemisia* (TYAGI & DUBEY, 1990).

Este tipo de análise da morfologia cromossômica teve início com o trabalho realizado em milho por McCLINTOCK (1933), onde foi demonstrado o grande valor experimental da análise de cromossomos na fase de paquíteno da meiose. Pode-se dizer que a partir desse trabalho foi possível estudos citogenéticos que permitiram o estabelecimento dos vários grupos de ligação nessa planta, determinação de vários genes em pontos definidos dentro do cromossomo físico, e visualizar a comprovação citológica da permuta genética.

Longley (1938, in GHATNEKAR, 1965) também utilizou o número e a característica de formação de "knobs", observados na fase de paquíteno em milho, para sugerir que o número de "knobs" nestes cromossomos podia dar indicações sobre a origem geográfica das diferentes raças de milho. LONGLEY (1941) verificou que a posição dos "knobs" nos cromossomos em paquíteno de *Zea*, *Tripsacum* e *Euchlaena*, era uma das únicas características cromossômicas desses três gêneros que oferecia dados suficientes para sugerir a natureza das relações filogenéticas entre esses três taxons. Baseado ainda na localização desses "knobs" nos cromossomos, estabeleceu relações entre as posições dessas massas heterocromáticas e o grau de evolução no milho. A determinação por REEVES (1944) do número de "knobs" em cromossomos paquitênicos de milho de diversas regiões da América do Norte, Central e Sul, permitiu também, a formulação de hipóteses sobre a origem e a dispersão do gênero *Zea* nas Américas, bem como os graus de relação com

os gêneros próximos, *Tripsacum* e *Euchlaena*. GHATNEKAR (1965), tentando relacionar o número de "knobs" cromossômicos com a evolução de diversas populações de milho na Itália, concluiu, a partir de suas próprias observações e de dados anteriores sobre o assunto que, em milho, o número e a distribuição de "knobs" nos cromossomos em paquíteno podiam realmente fornecer índices sobre a origem geográfica de várias raças dessa planta.

Trabalhos mais recentes, também em milho, como o de AGUIAR-PERECIN (1985) e de RAYBURN *et al.* (1985), onde foi analisado o bandamento C de cromossomos somáticos na fase de metáfase, têm demonstrado que o número de bandas pode corresponder ao número de "Knobs" da fase de paquíteno.

LIMA DE FARIA (1952) estudou em centeio a morfologia dos cromossomos em paquíteno, entre outras razões, pela similaridade encontrada entre alguns cromossomos e por apresentarem todos eles regiões centroméricas medianas ou submedianas. Através dessa metodologia foi possível identificar os sete pares de cromossomos constituintes do complemento, mais um cromossomo acessório (cromossomo tipo B). A técnica possibilitou, também, a observação de alguns pares de cromômeros desiguais ou deficiências cromoméricas. Observou ainda um rearranjo estrutural envolvendo o cromossomo VI do complemento.

KRISHNAM & DE (1965, 1968, 1970), DE & KRISHNAM (1966a,b), realizaram uma série de análises em paquíteno no gênero *Phaseolus* ($x = 11$), onde os cromossomos somáticos também são pequenos, envolvendo duas espécies diplóides e uma tetraplóide, além de um híbrido entre as duas diplóides. Constataram a presença de alguns cromossomos em comum às três espécies, o que juntamente com os dados sobre a sinapse e o tipo de pareamento entre os bivalentes, associados ainda à informação dos caracteres morfológicos, permitiu o

esclarecimento sobre a origem da espécie tetraplóide, no caso um alopoliplóide. Do mesmo trabalho, ficou ainda comprovada a ocorrência de supressão da função de um cromossomo nucleolar no alopoliplóide.

GOTTSCALK (1951, 1954) foi um dos primeiros a utilizar a análise morfológica dos cromossomos em paquíteno no gênero *Solanum*, na tentativa de estabelecer algumas relações filogenéticas para o gênero. Dentre vários trabalhos baseados neste tipo de análise cromossômica efetuados no gênero *Solanum* (HAYNES, 1964; LAM & ERICKSON, 1968; MARKS, 1969; VENKATESWARALU & BHIRAVAMURTY, 1969; BHIRAVAMURTY, 1975; PINGLE & DNYANASAGAR, 1976), destaca-se o trabalho de YEH & PELOQUIN (1965a), no qual foi identificado o complemento total de *Solanum tuberosum* e confirmada a semelhança existente entre vários cromossomos constituintes dos gêneros *Solanum* (batata-inglesa ou batatinha) e *Lycopersicon* (tomate), antigamente considerados sob um gênero único, *Solanum*. Além disso, foi possível ainda a elaboração de uma chave para classificação dos cromossomos de batata-inglesa. Essa classificação dos cromossomos de *Solanum* apresentada por YEH & PELOQUIN (1965a) tem auxiliado na caracterização de trissômicos por diversos autores (LEE & ROWE, 1975; WAGENVOORT & RAMANA, 1979). Tais trissômicos, por sua vez, têm sido usados com sucesso na localização de alguns genes, como por exemplo, um gene recessivo para clorofila (HERMSEN *et al.*, 1973) e um gene mutante causador de albinismo (LAM & ERIKSON, 1971).

Em tomate (*Lycopersicon*), ($2n = 24$) os primeiros a trabalhar com cromossomos em paquíteno foram LESLEY & LESLEY (1935), que constatarem a ocorrência de heteromorfia na região do satélite do bivalente organizador do nucléolo dessa planta. LESLEY (1938) verificou também a existência de uma variação na morfologia da região satélite dos cromossomos nucleolares, porém relacionada ao

tamanho do nucléolo em três raças dessa planta. Ainda em tomate, BROWN (1949) tentou estabelecer a morfologia, em paquíteno, do complemento todo, entretanto, a identificação desse complemento limitou-se, somente, ao bivalente nucleolar. BARTON (1950), com o mesmo objetivo, foi quem identificou todos os 12 bivalentes desse complemento. Com o conhecimento adquirido sobre estes cromossomos, após a identificação dos mesmos na fase de paquíteno, foi possível não só a elaboração de uma chave para classificação dos cromossomos de tomate por KHUSH (1963), como também logo após KHUSH & RICK (1966, 1967a,b) localizarem alguns genes em determinados cromossomos e até em determinados braços dos mesmos.

No gênero *Sorghum*, várias espécies tiveram seus complementos cromossômicos analisados na fase de paquíteno. MAGOON & SHAMBULINGAPPA (1961) demonstraram em *Sorghum propinquum* ($2n = 20$) e posterior comparação destes cromossomos com os de espécies de *Sorghum* com $2n = 40$, associado ainda a alguns dados sobre caracteres morfológicos, que a espécie *S. propinquum* poderia ter participado na origem de algumas espécies do gênero que apresentam $2n = 40$ cromossomos. Magoon & Shambulingappa (1960 in SHAMBULINGAPPA, 1967) e Magoon, Shambulingappa e Ramana (1961 in SHAMBULINGAPPA, 1967) demonstraram também, que algumas espécies de *Sorghum* com $2n = 20$ eram espécies tetraplóides, onde uma espécie possuía cromossomos longos e outra cromossomos pequenos. REDDI (1970) ao analisar a morfologia e pareamento de cromossomos na fase de paquíteno de uma raça tetraplóide de *Sorghum arundinaceum*, verificou que havia 10 tipos básicos característicos de cromossomos que podiam ser reconhecidos neste tetraplóide. Além disto, num total de 132 associações em paquíteno a frequência de permutas variavam de zero a duas em cada quatro pareamentos cromossômicos. Através destes dados o autor constatou para

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

Em *Medicago* L. a partir da identificação de todo o complemento cromossômico feito por BUSS & CLEVELAND (1968) e GILLIES (1968) da espécie *M. sativa* diplóide, com a finalidade principal de usá-la no reconhecimento de trissômicos, foi dado o início para a identificação dos cromossomos de várias outras espécies na fase de paquíteno (GILLIES, 1970a, 1971, 1972a,b,c). Os dados obtidos levaram ao conhecimento de relações de afinidade inesperadas entre as diversas espécies diplóides e entre algumas diplóides e poliplóides. GILLIES (1970b), ao analisar também os cromossomos em paquíteno de *M. sativa* tetraplóide, constatou que esta espécie poderia ser um autopoliplóide em processo de diploidização ou um alopoliplóide de segmento. Isto devido à dificuldade do autor em associar os pares de bivalentes em paquíteno, à presença de diferentes quadrivalentes e à presença também de seis pares de bivalentes, antes considerados homeólogos, e que na verdade mostraram-se totalmente homólogos.

No gênero *Manihot* MAGOON *et al.* (1969), ao analisar a morfologia de cromossomos em paquíteno de um cultivar de *M. esculenta* ($2n = 36$), verificou a presença de três cromossomos nucleolares em funcionamento. Isto levou os autores a suporem que os tipos considerados diplóides seriam na verdade poliplóides, em vista do número máximo de cromossomos nucleolares serem dois em espécies diplóides. A constatação de tipos cromossômicos repetitivos dentro do

complemento confirmou essa suposição. Os atuais tipos de mandioca cultivada seriam na verdade alopoliplóides, devido à regularidade e o comportamento diplóide da meiose. Concluíram ainda que seria um alopoliplóide de segmento devido à semelhança morfológica entre os cromossomos, embora já diferenciados geneticamente. Portanto, as formas parentais seriam diplóides com $x = 9$, com dois cromossomos nucleolares cada uma. A observação de apenas três cromossomos nucleolares, ao invés de quatro, seria atribuída à supressão do organizador nucleolar desse quarto cromossomo, que foi apontado como sendo o cromossomo XII pela extrema semelhança morfológica com os outros três observados. JOS & NAIR (1979), trabalhando com várias linhagens de *Manihot esculenta* que diferiam nas taxas de fertilidade do pólen (30% a 90% de fertilidade), tentaram relacionar tais taxas às anormalidades nas várias fases da meiose. Foi verificado que as taxas de fertilidade exibidas pelas plantas eram inversamente proporcionais ao número total de cromossomos, observados na fase de paquíteno, contendo anormalidades no pareamento e/ou deleções, duplicações e inversões. Concluíram que, embora a metáfase e outras fases da divisão meiótica se apresentassem normais, as anormalidades observadas na fase de paquíteno relacionavam-se com a fertilidade do pólen nessas plantas de mandioca.

Também, no gênero *Arachis* diversos trabalhos na fase de paquíteno foram realizados. No primeiro deles feito em dois cultivares de *Arachis hypogaea* ($2n = 40$) por MURTY et al. (1982), foi confirmada a condição de alopoliplóide segmental desta cultura, através da constatação de dois tipos de genoma, A e B, no complemento do poliplóide. Para tentar determinar os presumíveis genitores de *A. hypogaea*, trabalhos posteriores complementaram o anterior através da análise da morfologia em paquíteno de híbridos (KIRTI et al. 1982;

BHARATHI et al., 1983; JAHNAVI & MURTY 1985a) e também de espécies silvestres diplóides (KIRTI et al., 1983; JAHNAVI & MURTY 1985b). Desses estudos foi concluído apenas que as três seções *Erectoides*, *Triseminale* e *Extranervosae* são taxa muito antigos do gênero *Arachis* e que, provavelmente os híbridos entre elas tenderiam a ser totalmente estéreis.

No gênero *Ipomea* foram realizadas análises do paquíteno nas espécies diplóides ($2n = 30$), *I. crassicaulis* e *I. biloba* (KRISHNAN et al., 1969 e MAGOON et al., 1972, respectivamente), em uma forma tetraplóide ($2n = 60$) de *I. biloba* (VIJAYA-BAI et al., 1969) e na espécie de maior valor comercial, *I. batatas* que é hexaplóide ($2n = 90$), (MAGOON et al., 1970). Em *I. batatas* os autores obtiveram resultados interessantes pois, dentro dos 40 bivalentes identificados surgiram 19 tipos cromossômicos, dos quais oito bivalentes tinham morfologia distinta entre si, seis tipos de bivalentes em duplicata, dois tipos em triplicata, dois tipos com quadruplicatas e um tipo com sextuplicatas, além de polivalentes. Foi demonstrado que estes dados poderiam ser interpretados como indicativos de uma origem autopoliplóide para *I. batatas*, como poderiam indicar, da mesma forma, uma origem alopoliplóide segmental a partir de três genomas de taxa extremamente próximos e com acentuada homologia cromossômica.

No gênero *Physalis* com a intenção de melhor delimitar as espécies do gênero, tendo em vista a ocorrência de variações infra-específicas e de delimitações com sobreposição entre diferentes espécies, foram realizados vários trabalhos envolvendo a identificação de cromossomos em paquíteno (GOTTSCALK, 1954; VENKASTERWARLU & RAJA-RAO, 1977; 1979a; RAJA-RAO, 1979; RAJA-RAO & PRASAD, 1984). Dentre estes destacou-se o de VENKASTERWARLU & RAJA-RAO (1979b), que estudaram uma raça da espécie *Physalis angulata* ($2n = 48$), um

tetraplóide natural. Isto porque a raça escolhida, ao contrário de outras da mesma espécie, exibía somente a formação de bivalentes na meiose. Verificaram que 16 dos 24 bivalentes em paquíteno eram semelhantes morfológicamente dois a dois, o que então formava um grupo de oito pares de bivalentes. Esses dados revelaram a ocorrência de dois genomas nessa espécie, contendo 12 bivalentes cada um, com considerável semelhança entre eles.

SHAMBULINGAPPA (1967) ao realizar uma análise citogenética envolvendo seis espécies do gênero *Digitalis* L., gênero esse que envolve espécies diplóides e poliplóides e onde verificam-se divergências quanto ao número cromossômico e a classificação taxonômica de espécies, constatou, nas várias espécies consideradas diplóides, a ocorrência de quatro tipos morfológicos de cromossomos em paquíteno. Este dado em conjunção com estudos taxonômicos pôde ser útil no esclarecimento sobre a origem, a evolução e a identificação dos possíveis parentais das espécies poliplóides do gênero.

Também WHELAN (1969), analisando os cromossomos em paquíteno de *Prunus avium*, detectou a presença de uma deleção intersticial envolvendo o braço curto de um dos homólogos do bivalente III desse complemento. A obtenção desse dado foi de importância, pois, em trabalhos anteriores foi registrado nessa planta uma taxa de aborto de pólen de cerca de 40% a 50%, sem que fosse observado qualquer tipo de anormalidade meiótica que explicasse essa frequência.

Já ONG (1975), ao identificar o complemento cromossômico de *Hevea brasiliensis* na fase de paquíteno, ressaltou a ocorrência de similaridade entre pares de bivalentes, similaridade esta confirmada pela presença de multivalentes tanto na fase de paquíteno como em metáfase. De acordo com tais resultados o autor aventou, pela primeira vez, para o *taxon*, o fato desta espécie ser um anfidiplóide e que o

número $x = 18$ até então considerado básico para o gênero, seria na verdade $x = 9$.

Da mesma maneira, a análise em paquíteno, do complemento de *Drimiopsis barteri* ($2n = 24$) por OYEWOLE (1984), levou ao estabelecimento de dois conjuntos de seis cromossomos homólogos e dois conjuntos de seis cromossomos homeólogos. Este resultado levou o autor a concluir que esta espécie, antes considerada um triplóide, devido a esterilidade, era na realidade uma espécie tetraplóide constituída de quatro conjuntos de seis cromossomos, sendo seu número básico $x = 6$ ao invés de $x = 8$; e cuja esterilidade era devido a deficiências gaméticas e não à irregularidades meióticas, comuns em indivíduos de condição triplóide.

Em híbridos, a análise prévia da morfologia de cromossomos em paquíteno tem possibilitado verificar a ocorrência da diferenciação estrutural em genomas híbridos a nível cromossômico, através da observação de inversões, translocações, deleções e outros rearranjos estruturais, além da ocorrência ou não de pareamento entre os cromossomos, ou seja, a presença de cromossomos homólogos, homeólogos ou heterólogos. Análise com essa finalidade foram realizadas tanto em híbridos interespecíficos como em híbridos intergenéricos. Por exemplo, SHASTRY & MISRA (1961) verificaram que a esterilidade existente em híbridos intervarietais de *Oryza sativa-japonica* e *O. sativa-indica* não era devida exclusivamente a causas genéticas e sim a pequenas diferenças estruturais nos cromossomos (hibridações estruturais cripticas) dos complementos dessas duas subespécies. No híbrido interespecífico, envolvendo as espécies *Oryza sativa* e *O. officinalis*, foi observado por SHASTRY et al. (1961) um pareamento total entre os cromossomos de ambos os complementos possibilitando aos autores explicarem que a ausência de

pareamento, observada por outros autores nesse mesmo híbrido em outras fases da meiose, seria no caso devido à falta de sinapse e não a falta de homologia. A observação desse híbrido em paquíteno também sugeriu a participação de *O. officinalis* na evolução do arroz cultivado, *O. sativa*.

Ao analisar a fase de paquíteno do híbrido interespecífico formado pelas espécies, da família *Tiliaceae*, *Corchorus olitorius* (espécie cultivada) e *C. trilocularis* (espécie silvestre), BASAK (1966) constatou a falta de pareamento na maioria dos bivalentes, além de uma grande quantidade de rearranjos estruturais e segmentos cromossômicos diferenciados (não homólogos) causados, estes últimos, por rearranjos menores não observáveis. Embora essa análise não fosse o suficiente para explicar verdadeiramente a origem dessas espécies, mostrou, no entanto, como as mesmas se diferenciaram a nível cromossômico.

Através da análise do pareamento, na fase de paquíteno, do híbrido interespecífico constituído das espécies *Pennisetum purpureum* ($n = 14$, com genomas A e B) e *P. typhoides* ($n = 7$), (PANTULU (1967) confirmou os dados obtidos anteriormente sobre a homologia do genoma A de *P. purpureum* com o genoma de *P. typhoides*. Este autor pôde observar a presença de sete bivalentes, cujas unidades apresentavam morfologia idênticas ao lado de um total pareamento.

Já KHRISHNAM & DE (1965) e DE & KHRISHNAM (1966a,b), tentando avaliar o grau de homologia cromossômica entre duas espécies de *Phaseolus* (*P. aureus* e *P. mungo*), espécies consideradas próximas morfológica e geneticamente, analisaram na fase de paquíteno, além dos respectivos complementos, também o pareamento cromossômico do híbrido interespecífico formado pelas mesmas. Por essa análise, foi possível constatar um alto grau de homologia entre os dois complementos, e

através de alguns rearranjos estruturais sugerir que a espécie *P. mungo* seria derivada de *P. aureus*.

Partindo da hipótese de que durante a evolução das espécies, os cromossomos sofreriam mudanças que os tornariam cada vez menos homólogos com cromossomos ancestrais ou com cromossomos de espécies descendentes de um mesmo ancestral, MENZEL (1962) estudou o híbrido intergenérico formado por *Lycopersicon esculentum* e *Solanum lycopersicoides*, pressupondo que este segundo gênero seria ancestral do primeiro. Através da comparação dos complementos em paquíteno, a autora constatou que nove dos 12 bivalentes de *S. lycopersicoides* correspondiam a nove cromossomos de *L. esculentum*, diferindo apenas no comprimento absoluto. A análise em paquíteno no complemento do híbrido intergenérico F₁ veio reforçar a similaridade desses cromossomos, pois foi verificada a ocorrência de oito bivalentes formados por cromossomos idênticos cujo pareamento foi perfeito.

Também REDDY (1981a,b,c) pôde confirmar citogeneticamente a similaridade morfológica verificada em algumas espécies dos gêneros *Cajanus* (n = 11) e *Alysiotis* (n = 11), porque no híbrido intergenérico (*C. cajan* x *A. lineata*), o autor reconheceu em pareamento total na fase de paquíteno, nove homólogos dos 11 bivalentes formados e sem nenhuma alteração estrutural cromossômica maior. Num segundo híbrido (*C. cajan* x *A. sericea*) o mesmo autor identificou todos os bivalentes, sendo dois deles heteromórficos, além de três alterações estruturais, e num terceiro híbrido (*C. cajan* x *A. scarabaeoides*), oito bivalentes foram identificados; um bivalente mostrou-se em associação não homóloga, quatro deles eram heteromórficos e três alterações estruturais foram registradas. Comparando as análises desses três híbridos foi possível ao autor sugerir claras relações de afinidade entre as espécies envolvidas, de

modo que *A. sericea* e *A. scarabaeoides* foram consideradas mais próximas entre si do que *A. lineata*, e esta a mais próxima de *C. cajan*.

3. MATERIAL

Os botões florais que foram utilizados na análise morfológica dos cromossomos foram coletados de seis plantas da espécie *C. arabica* L., sendo três plantas da variedade *arabica* L. e três do cultivar Bourbon vermelho. Todas as plantas estudadas são descendentes das plantas da antiga Coleção de café da Seção de Genética do Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas.

A escolha da variedade *arabica* se deve ao fato desta variedade ter suas características morfológicas bem conhecidas e por pertencer ao primeiro tipo de café a ser introduzido e cultivado no Brasil, há dois séculos e meio, e em outros países cultivadores de café da América do Sul. Esta variedade ocorria até há alguns anos espontaneamente na Etiópia e foi ainda o tipo usado por Linnaeus para descrição da espécie (CARVALHO, 1946; ANTUNES, F^O, 1957). Portanto, filogeneticamente tem mais importância, porque todas as outras variedades ou cultivares são descendentes de tal tipo.

O cultivar Bourbon vermelho foi também escolhido por ser um cultivar que, geneticamente, é muito próximo da variedade *arabica*, diferindo desta apenas por uma única mutação (ANTUNES F^O, 1957; CARVALHO A., comunicação pessoal). O material testemunha foi herborizado e introduzido no herbário do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC-25.032).

4. MÉTODOS

4.1 COLETA E FIXAÇÃO DO MATERIAL

O processo de coleta consistiu em se manterem ramos, com botões em fase pré-meiótica, em uma câmara úmida até o momento apropriado para a fixação. Para isso uma amostra de estames de poucos botões era submetida a uma rápida fixação prévia. Isto era feito em lâminas contendo carmim acético, afim de se efetuar exames periódicos das células mães de pólen ao microscópio para garantir a coleta de botões na fase meiótica desejada, a fase de paquíteno médio. Esses exames periódicos foram realizados a intervalos de tempos variáveis de acordo com o estágio ideal de paquíteno, ou seja, não muito inicial, pois no material com pouco tempo de fixação, os cromossomos ficam menos evidentes. Além disso, sendo a fase de paquíteno uma fase relativamente rápida, não é possível uma fixação prévia demorada, o que facilitaria a caracterização da fase com mais precisão. Obtida a fase desejada os botões de aspecto semelhante em tamanho e cor ao analisado e de mesma inflorescência eram fixados em Carnoy após ter sido retirado dos mesmos o perianto. Esse fixador era trocado cerca de três vezes em 48 horas, sendo em seguida o material resfriado até cerca de -20°C para ser armazenado. Os botões a -20°C podem permanecer estocados no Carnoy por alguns anos.

4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A METODOLOGIA DA COLETA DO MATERIAL

Durante as análises de morfologia de cromossomos, na fase de paquíteno, em *C. arabica* um dos maiores problemas foi a coleta dos botões florais na fase adequada para análise que é o estágio médio da fase do paquíteno. Isto porque, nos meses que antecedem a floração,

que corresponde ao período seco do ano, os botões florais do café se desenvolvem até um determinado ponto e depois ficam como que estagnados até que ocorra a primeira chuva, após o período de seca. Isto acontecendo é disparado o florescimento que é completo e uniforme em relação à planta toda. Assim, toda a coleta dos botões é feita nos últimos meses do período da seca. Devido ao exposto acima torna-se impraticável a coleta de material diretamente das plantas em condições ambientais, pois é necessário simular o que ocorre na natureza, para se poder obter botões em desenvolvimento por um período maior. Em decorrência disto, ramos florais com botões pré-meióticos são trazidos para o laboratório e conservados numa câmara úmida para o desencadeamento do processo meiótico. Isto exige testes regulares dos botões através de lâminas, que são preparadas sem uma fixação prévia adequada, devido ao tempo restrito, (pois a meiose prossegue) o que acarreta enganos na coleta porque dificilmente o estágio médio da fase de paquíteno é claramente visível nessas lâminas. Portanto, muitas coletas são eliminadas por não estarem na fase adequada. Além disso, em condições artificiais de laboratório a meiose ocorre a qualquer hora do dia ou da noite sendo necessário neste período uma vigilância diuturna dos botões. Isto é muito diferente do que ocorre em plantas que, de acordo com o local da inflorescência, apresentam botões em diferentes fases da meiose, e quase sempre têm inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento. Adicionalmente, os cafés em geral apresentam uma única florada anual, mais intensa e mais homogênea, sendo as outras floradas eventuais, menos intensas e com botões em estágios heterogêneos, que dificultam ainda mais a obtenção da fase desejada. Em consequência desses problemas muito tempo de pesquisa foi dedicado às coletas de material e este tipo de problema só foi superado parcialmente com a prática.

4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

A técnica de preparação das lâminas para análise cromossômica foi a de esmagamento de anteras em solução de carmim propiônico (SWAMINATHAN *et al.*, 1954), com ligeiras modificações de acordo com as necessidades exigidas pelas plantas de café. Vinte e quatro horas antes da preparação das lâminas os botões eram transferidos do Carnoy a -20°C para outro fixador resfriado à mesma temperatura e constituído de álcool etílico absoluto e ácido propiônico na proporção 3:1, respectivamente, saturado com acetato férrico. A estocagem não foi feita neste fixador porque o mesmo promove indistintamente a oxidação do material causando escurecimento do citoplasma das células mães de pólen e, portanto, dificultando a visualização dos cromossomos. Após os botões terem permanecido por 24 horas neste novo fixador, as lâminas eram preparadas. Para isso eram esmagadas duas ou três anteras sobre uma lâmina contendo poucas gotas de carmim propiônico. Esta operação era executada com o auxílio de um bastão de vidro para evitar a oxidação do material. O excesso de material, células de tecidos diferentes das células mães de pólen, era retirado da lâmina para garantir um melhor achatamento da célula e bom espalhamento dos cromossomos. A seguir uma lamínula era colocada sobre o material; então era aquecida a preparação levemente para depois serem pressionadas lâmina e lamínula fortemente enquanto quentes, afim de acentuar o espalhamento das células. Poucas lâminas foram preparadas de cada vez, pois, sendo de duração temporária, mantinha-se em boas condições por uma semana aproximadamente. A seguir as lâminas eram examinadas ao microscópio óptico comum, em contraste de fase (MEDINA & CONAGIN, 1964).

4.4 DESENHOS E FOTOGRAFIAS

As células, ou parte destas, com cromossomos que apresentaram-se razoavelmente espalhados tiveram suas posições marcadas nas lâminas e posteriormente foram desenhadas e algumas delas fotografadas em fotomicroscópio com contraste de fase. Os desenhos dos cromossomos na fase de paquíteno foram feitos com auxílio de uma câmara clara, e também em contraste de fase, com as seguintes combinações ópticas no microscópio: ocular 15x, objetiva 100x, optovar 1,6x, num aumento total de 1400 vezes. O método de desenho foi baseado em LIMA DE FARIA (1952, 1954), porém com algumas modificações. Neste método, inicialmente os cromossomos são traçados no seu comprimento total, sendo depois acrescentados os respectivos padrões cromoméricos, estrutura e localização do centrômero, segmentos heteropicnóticos e acromáticos e região de inserção do nucléolo.

Os cariótipos foram montados através dos desenhos de acordo com o comprimento total, proporção de braços e padrão dos cromômeros dos cromossomos. Para facilitar a compreensão e análise da morfologia dos cromossomos foi elaborado um ideograma comum para os cromossomos da variedade *arabica* e para os do cultivar Bourbon vermelho.

4.5 MEDIDAS

As medidas foram tiradas a partir dos desenhos feitos em câmara clara. Convém ressaltar que a técnica de esmagamento utilizada permite que o cromossomo permaneça quase que totalmente num único plano, tornando o processo de medida razoável, quanto a erros. Primeiramente calculou-se a relação de escala, a seguir os cromossomos

foram divididos em pequenas retas para serem medidas e em seguida adicionadas, obtendo-se assim o comprimento total dos mesmos.

Foram tomadas as medidas do comprimento total, braço maior e braço menor dos cromossomos, a partir de desenhos de células em um mesmo estágio de desenvolvimento. Para cada um dos cromossomos tentou-se o número máximo possível de medidas, porque é muito difícil estabelecer um número exato de medidas para cada um dos cromossomos identificados, já que na maioria das vezes obtem-se apenas partes das células e não as células completas com todo o complemento cromossômico. Mesmo assim, conseguiu-se cerca de 20 a 30 medidas para cada um dos cromossomos. A partir destas medidas foram calculadas a média ($\bar{x}$) e o desvio padrão da média ($s_{\bar{x}}$), os quais constam da tabela 1 em micrômetros (μm).

Na classificação dos cromossomos foi utilizada a nomenclatura de LEVAN *et al.* (1964) que se baseia na posição do centrômero. Os cromossomos com proporção de braço (braço longo/braço curto) entre os valores de 1,0 a 1,7 foram denominados metacêntricos (m); de 1,7 a 3,0 de submetacêntricos (sm) e de 3,0 a 7,0 de subtelocêntricos (st), e acima de 7,0 de telocêntricos (t).

5. RESULTADOS

MORFOLOGIA E MEDIDAS DOS CROMOSSOMOS DE *C. arabica*

A partir das análises efetuadas da morfologia de cromossomos, na fase de paquíteno foram elaborados cerca de 150 desenhos de células semi-completas. Destes desenhos, cerca de 60 foram obtidos a partir dos cromossomos das plantas da variedade *arabica* e o restante dos cromossomos das plantas do cultivar Bourbon vermelho.

Obteve-se o padrão cromomérico e as medidas dos 22 bivalentes constituintes do complemento da espécie. Verificou-se que a variedade *arabica* e o cultivar Bourbon Vermelho não apresentam complementos cromossômicos diferentes, ou seja, todos os tipos cromossômicos encontrados são comuns aos dois taxa.

A partir dos desenhos foi elaborado o cariótipo dos cromossomos na fase de paquíteno, que está demonstrado nos desenhos de 1 a 22 da figura 1, e esquematizado no ideograma da figura 2.

Os bivalentes foram numerados de 1 a 22 em ordem decrescente do valor da média ($\bar{x}$) de acordo com as medidas obtidas (tabela 1). Nesta tabela estão registradas as relações de braços (maior/menor) que indica a posição do centrômero. Para se ter uma idéia do grau de variação da morfologia de cada um destes bivalentes as figuras 3 a 22 mostram vários aspectos de um mesmo cromossomo.

Cromossomo 1 - Este destaca-se dentro do complemento por ter tamanho relativamente maior que os outros. Em comprimento total é apenas semelhante aos cromossomos 2 e 3 (tabela 1). O centrômero está localizado em posição mediana. Apresenta seis cromômeros mais conspicuos. Estes dispoem-se de ambos os lados do centrômero, sendo quatro em um dos braços e dois no outro (figuras 1.1, 2.1, 3).

Cromossomo 2 - É um cromossomo relativamente tão grande quanto o 1, porém, possui o centrômero numa posição submediana. Em comprimento este é semelhante também aos cromossomos 3, 4, 5, 6, e 10 (tabela 1). Apresenta uma série de cromômeros (em ambos os braços) dispostos em ordem decrescente de tamanho em direção à parte terminal dos braços (figuras 1.2, 2.2, 4).

Cromossomo 3 - Este cromossomo também pode ser enquadrado na categoria dos cromossomos maiores, juntamente com os dois anteriores, pois os três podem ser considerados quase iguais em comprimento. Entretanto, é também semelhante em comprimento aos cromossomos 4, 5, 6, 8, 9 e 10 (tabela 1), quando se considera o desvio padrão. Caracteriza-se por ter muitos cromômeros, cerca de oito. Os proximais são maiores e os distais menores. O braço menor possui seis cromômeros, e o maior, três cromômeros maiores e três menores que partem do centrômero dispondo-se gradualmente em direção às partes terminais (figuras 1.3, 2.3, 5).

Cromossomo 4: O cromossomo em questão caracteriza-se pelo seu braço menor possuir uma terminalização mais abrupta, quando comparada à do seu braço maior. Neste destacam-se dois cromômeros maiores, junto ao centrômero, e uma série de outros menores. O segmento do centrômero, em posição subterminal, é relativamente grande. O braço maior possui, junto ao centrômero, três cromômeros grandes seguidos por cerca de cinco cromômeros menores e a parte terminal menos condensada (figuras 1.4, 2.4, 6).

Cromossomo 5 - Também este cromossomo apresenta o braço menor com um final abrupto. Neste braço, a partir do centrômero, notam-se quatro cromômeros maiores e dois bem menores, terminais. No outro braço observou-se uma variação no número de cromômeros, sendo o mais comum a presença de cinco cromômeros de tamanho relativamente mediano (figuras

1.5, 2.5, 7).

Cromossomo 6 - A característica principal deste cromossomo é um cromômero relativamente grande, de forma trapezoidal, situado numa posição proximal do braço longo. Apresenta ainda em ambos os braços uma série de pequenos cromômeros, que se dispõem a partir do centrômero num dos braços, e no outro a partir do cromômero trapezoidal, em ordem decrescente de tamanho. Esses pequenos cromômeros aparecem em número variável nas diferentes células (figuras 1.6, 2.6, 8).

Cromossomo 7 - Apresenta de peculiar o seu braço menor, o qual se apresenta quase que totalmente preenchido por cerca de cinco cromômeros. Estes distribuem-se quase até o final da pequena parte terminal. O braço maior não foge ao padrão, apresentando próximo ao centrômero dois cromômeros, que, às vezes, aparecem unidos num único, seguidos por dois menores e uma longa parte terminal, sem cromômeros proeminentes (figuras 1.7, 2.7, 9).

Cromossomo 8 - Possui um cromômero destacado em uma das extremidades do centrômero, porém de forma elíptica. Em seguida a este cromômero elíptico, o mesmo braço possui de quatro a cinco cromômeros pequenos. No outro braço, aparecem três cromômeros maiores, e em algumas células além destes, três outros menores (figuras 1.8, 2.8, 10).

Cromossomo 9 - Sua característica está na parte terminal do braço menor, que se apresenta sempre com aspecto duplo. Isto ao contrário do braço maior deste e dos demais bivalentes cujas terminações apresentam-se unidas a ponto de mostrarem sempre o aspecto de um fio único. Além disto, os dois grandes cromômeros deste braço menor, junto ao centrômero, são seguidos por uma série de outros pequenos cromômeros que aparecem em número inconstante, variando de três a

cinco, e que distribuem-se até o final do braço. O braço maior apresenta uma distribuição de cromômeros relativamente comum, sendo dois cromômeros junto ao centrômero, em seguida três menores e a parte terminal. O centrômero ocupa posição submediana (figuras 1.9, 2.9, 11).

Cromossomo 10 - Possui o aspecto geral semelhante ao 9. No entanto, a parte terminal do seu braço menor termina com aspecto de fio único e seus cromômeros dispõem-se em dois conjuntos de três cada um, separados por pequeno segmento menos condensado, que poderia ser confundido com um centrômero. O centrômero ocupa uma posição um pouco mais subterminal que no cromossomo 9. O braço maior possui dois cromômeros maiores e uma série variável de outros menores (figuras 1.10, 2.10, 12).

Cromossomo 11 - Caracteriza-se por apresentar no seu braço menor, apenas três cromômeros bastante distintos e um final de braço relativamente curto. O braço maior desse cromossomo apresenta, junto ao centrômero, dois cromômeros também distintos, em seguida, um segmento menos condensado e alguns cromômeros relativamente pequenos que aparecem em número variável de dois a quatro (figuras 1.11, 2.11, 13).

Cromossomo 12 - Tem no braço menor, bem junto ao centrômero, dois cromômeros maiores seguidos por outros dois menores e um cromômero isolado localizado em posição subterminal. Este cromômero caracteriza este cromossomo juntamente com o pequeno segmento terminal que o segue. No braço menor ocorrem apenas dois cromômeros bem próximos entre si, eventualmente seguidos por outros menores (figuras 1.12, 2.12 14).

Cromossomo 13 - Segue o aspecto geral do 7, cujo padrão é bastante simples e restrito às pequenas regiões cromoméricas que flanqueiam o

centrômero. Neste cromossomo o braço menor possui quatro cromômeros e no braço maior apenas três, todos eles junto a um centrômero localizado subterminalmente (figuras 1.13, 2.13, 15).

Cromossomo 14 - Este é um dos três cromossomos que se mostraram ligados ao nucléolo. O centrômero é quase imperceptível, pois seu tamanho é equivalente aos outros espaços entre os quatro cromômeros que constituem o padrão deste cromossomo. O braço menor possui, além de três cromômeros, um pequeno satélite terminal junto ao qual fica ligado o nucléolo. No braço maior há três cromômeros relativamente pequenos seguidos por dois outros ainda menores (figuras 1.14, 2.14, 23).

Cromossomo 15 - Verifica-se um destacado centrômero em uma posição quase subtelocêntrica, e em cujas extremidades estão presentes dois segmentos heteropiconóticos positivos. No braço menor, logo após o segmento junto ao centrômero, um ou dois pequenos cromômeros podem ocorrer, seguidos de um pequeno segmento terminal. No braço maior, em seguida ao segmento heteropiconótico, aparece um número variável de pequenos cromômeros, seguidos por sua vez, por uma longa região terminal (figuras 1.15, 2.15, 16).

Cromossomo 16 - Possui realmente quase todo o seu padrão cromomérico localizado no seu braço menor, o qual possui também uma parte terminal bastante curta. Os cromômeros desse braço são em número de quatro e estão dispostos, a partir do centrômero, num grupo de três localizados próximos entre si, seguidos por outro cromômero de mesmo tamanho, mas isolado na parte terminal. O braço maior mostra, como padrão cromomérico, apenas dois cromômeros de tamanho idêntico e que em algumas células, mostraram-se como se fossem um único cromômero. Em seguida, neste braço, vem a parte terminal, que se mostrou bem mais longa que a do braço menor (figuras 1.16, 2.16, 17).

Cromossomo 17 - Tem seu centrômero localizado na posição intermediária submediana-subterminal. É reconhecido dentro de uma célula por possuir um padrão cromomérico bastante simples, e concentrado em um de seus braços. O padrão cromomérico é caracterizado por dois cromômeros relativamente maiores, que se dispõem de maneira peculiar; um deles localiza-se próximo à parte terminal do braço menor, e que é bastante curta. O outro cromômero marca o início, deste braço, sendo esses dois cromômeros intercalados por dois cromômeros menores. O braço maior possui alguns cromômeros bastante pequenos, que aparecem em número variável nas diferentes células (figuras 1.17, 2.17, 18).

Cromossomo 18 - Ladeando o centrômero, possui cromômeros relativamente pequenos. Num dos braços apresenta uma série desses cromômeros em justaposição, sendo que o último deles localiza-se um pouco mais afastado dos demais, em seguida vem a parte terminal desse braço. No outro braço, ocorre um número variável de cromômeros, mais comumente quatro, que se dispõem dois a dois e que são seguidos pela parte final (figuras 1.18, 2.18, 19).

Cromossomo 19 - Assemelha-se ao 6, no que se refere a um cromômero maior em um dos lados do centrômero. No entanto, difere do anterior pelo menor número de cromômeros em ambos os braços. Num dos braços apresenta apenas dois cromômeros e no outro, em média, três de tamanho variável (figuras 1.19, 2.19, 20).

Cromossomo 20 - Eventualmente ligado ao nucléolo este cromossomo assemelha-se bastante ao cromossomo 22, no que diz respeito ao cromômero terminal num dos braços e a terminalização sem cromômeros no outro. Entretanto, este cromossomo diferencia-se pelo número total dos cromômeros e sua disposição. No braço em que ocorre o cromômero terminal, verifica-se a partir do centrômero, quatro cromômeros. No

braço oposto, há dois cromômeros mais próximos ao centrômero e em seguida, já na parte terminal, aparecem outros menores, em número variável nas diferentes células (figuras 1.20, 2.20, 21).

Cromossomo 21 - Foi observado, juntamente com o cromossomo 14, frequentemente associado ao nucléolo. Seu padrão é bastante simples. É constituído de quatro cromômeros e o satélite terminal, espaçados regularmente. Na verdade apresenta inclusive com o espaço do centrômero idêntico aos espaços entre os cromômeros, o que a princípio dificultou a localização do mesmo. Aparecem dois cromômeros no braço menor seguidos pelo satélite e dois cromômeros no braço maior. A região organizadora do nucléolo localiza-se portanto junto ao satélite no braço menor em posição terminal como nos outros dois cromossomos associados ao nucléolo (figuras 1.21, 2.21, 23).

Cromossomo 22 - Apresenta, ladeando o centrômero, indicado nas figuras por pequeno traço, uma série de cromômeros bastante unidos, aparentando inclusive um segmento único. Além dessa série de cromômeros, mostra como característica diferencial, um cromômero terminal em um dos braços. O outro braço possui terminalização alongada sem final distinto, típica da maioria dos cromossomos de café, na fase de paquíteno (figuras 1.22, 2.22, 22).

Em comprimento total, de acordo com a tabela 1, quando considera-se o desvio padrão, os cromossomos podem ser agrupados em 7 grupos. Grupo 1: cromossomos 1, 2 e 3. Grupo 2: cromossomos 2, 3, 4, 5, 6 e 10. Grupo 3: cromossomos 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10. Grupo 4: cromossomos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Grupo 5: cromossomos 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20. Grupo 6: cromossomos 5, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. Grupo 7: cromossomos 10, 12, 14, 17, 19, 20, 21 e 22. No entanto, tais grupos são muito relativos pois um mesmo cromossomo, em

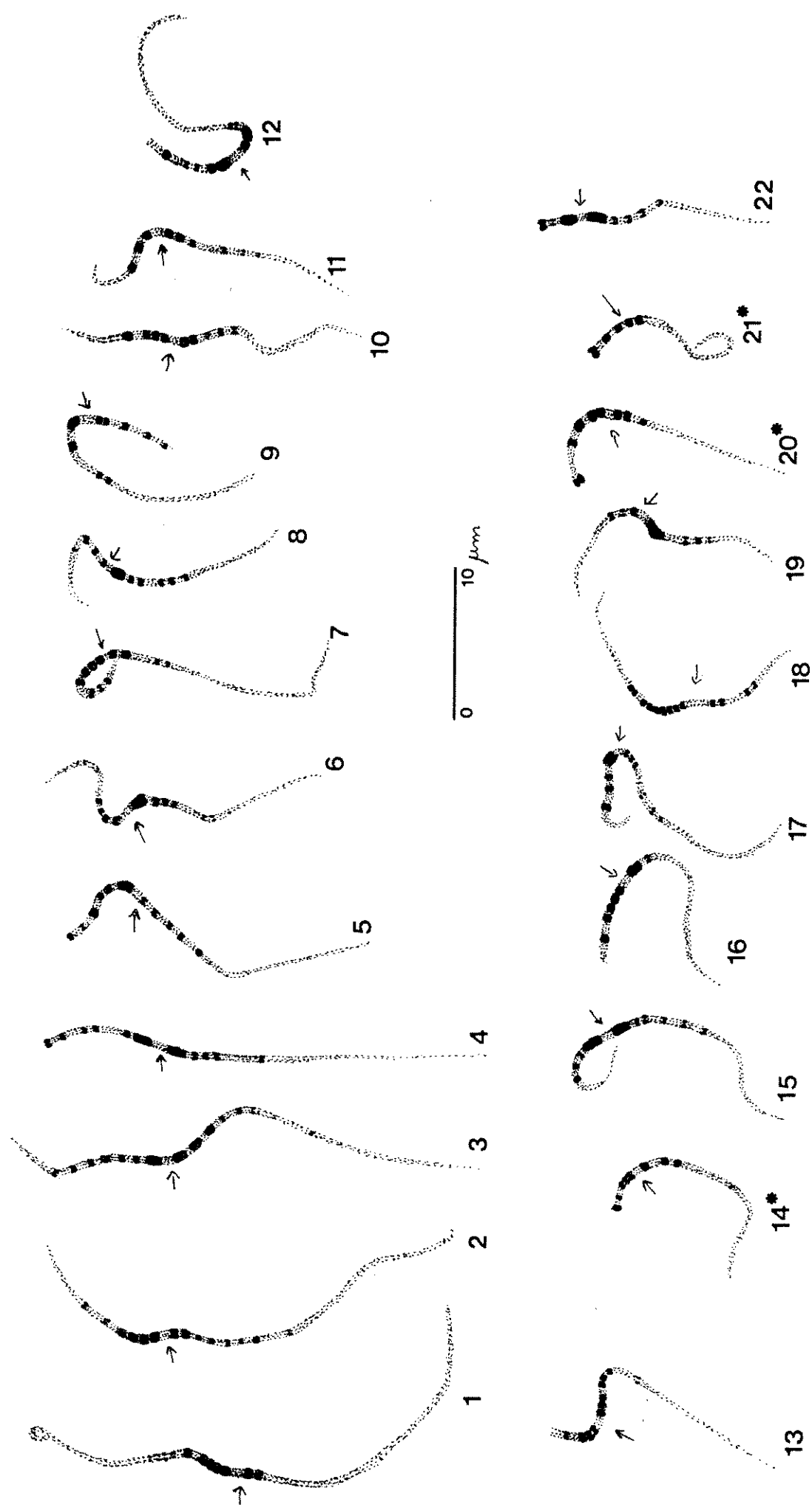


FIGURA 1 - Cariótipo, em paquíteno, de *C. arabica* L.
 *cromossomos nucleolares
 (→) centrômero

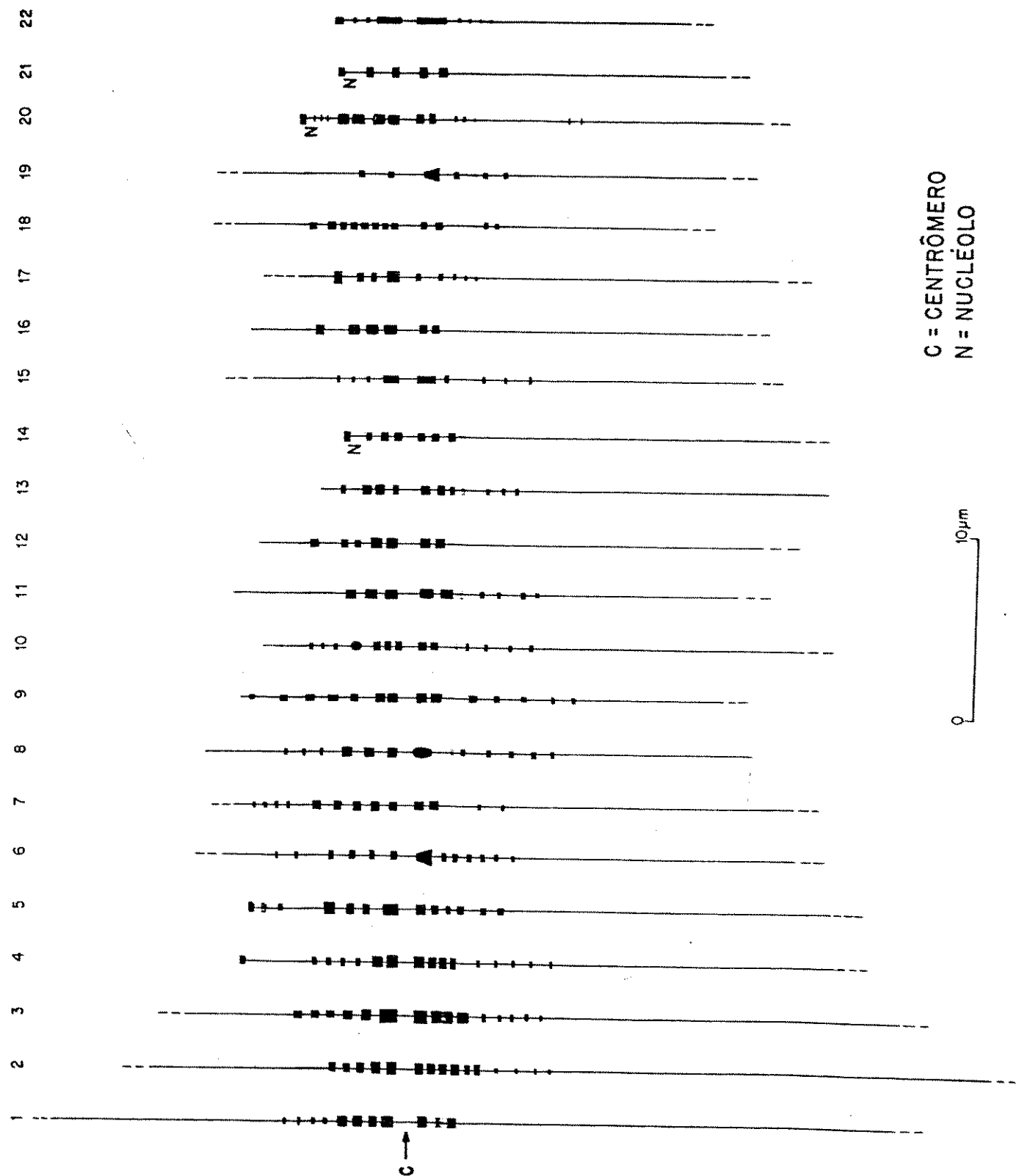


FIGURA 2 - Ideograma dos cromossomos em paquíteno de *C. arabica* L.

Tabela 1 - Comprimento total e de braços dos 22 bivalentes do complemento de C. arabica L. ($\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$) em micrômetros (μm).

Cromossomo	Comprimento total	Braço maior (M)	Braço menor (m)	Relação de braços (M/m)	Posição do centrômero
1	41,56 ± 4,02	23,23 ± 2,86	18,32 ± 2,63	1,26	m
2	40,34 ± 6,97	27,55 ± 7,11	12,79 ± 2,54	2,15	Sm
3	34,88 ± 3,46	24,22 ± 4,00	10,65 ± 1,53	2,27	Sm
4	29,68 ± 7,04	21,15 ± 5,50	8,09 ± 1,54	2,61	Sm
5	29,28 ± 7,91	21,72 ± 6,85	7,60 ± 1,68	2,85	Sm
6	28,45 ± 3,32	19,47 ± 3,01	8,97 ± 2,29	2,17	Sm
7	27,29 ± 2,87	19,31 ± 2,25	7,98 ± 0,93	2,41	Sm
8	27,02 ± 4,55	16,97 ± 3,73	10,04 ± 2,16	1,69	m
9	26,90 ± 5,10	18,80 ± 6,00	8,00 ± 1,00	2,35	Sm
10	26,70 ± 7,10	19,60 ± 5,70	7,10 ± 2,00	2,76	Sm
11	25,49 ± 4,35	15,00 ± 3,18	9,65 ± 2,58	1,55	m
12	25,37 ± 5,80	17,79 ± 5,15	7,57 ± 2,63	2,35	Sm
13	25,27 ± 3,31	20,64 ± 3,34	4,62 ± 0,69	4,46	St
*14	24,30 ± 5,90	20,80 ± 6,00	3,50 ± 0,50	5,94	St
15	24,22 ± 3,60	16,84 ± 3,34	7,64 ± 1,52	2,20	Sm
16	23,94 ± 2,71	16,19 ± 1,84	7,75 ± 1,46	2,08	Sm
17	23,91 ± 4,51	18,06 ± 4,56	5,84 ± 1,29	3,09	Sm
18	23,61 ± 2,86	15,12 ± 3,46	8,59 ± 1,75	1,56	m
19	23,33 ± 3,74	14,94 ± 3,51	8,23 ± 1,29	1,81	Sm
*20	21,12 ± 2,84	17,67 ± 2,60	6,17 ± 1,30	2,86	Sm
*21	19,26 ± 2,50	14,89 ± 2,40	4,33 ± 1,60	3,43	St
22	17,27 ± 3,20	13,73 ± 2,53	3,93 ± 3,49	3,49	St

* cromossomos nucleolares

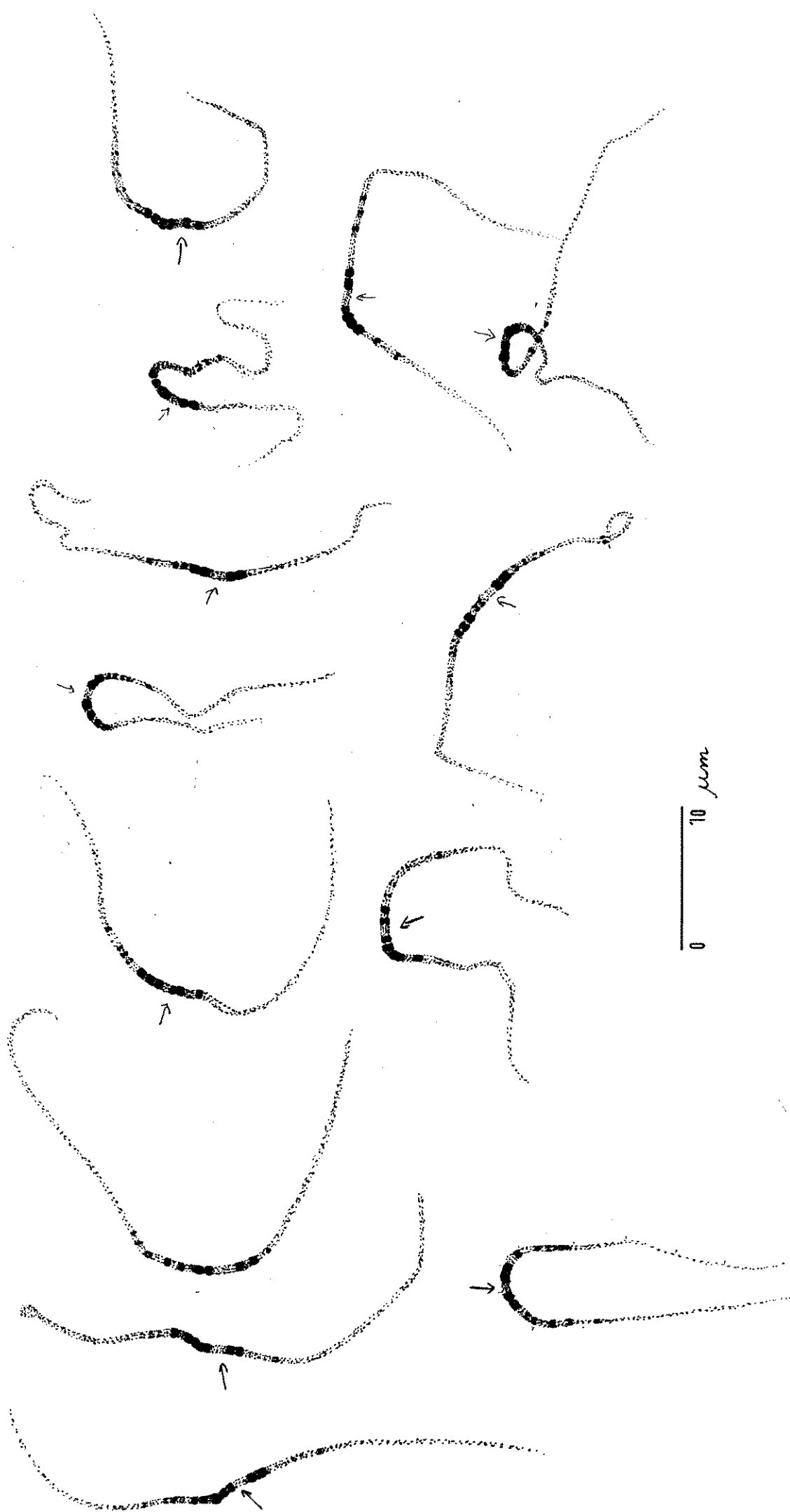


FIGURA 3 - Vários aspectos do cromossomo 1 de *C. arabica* L.

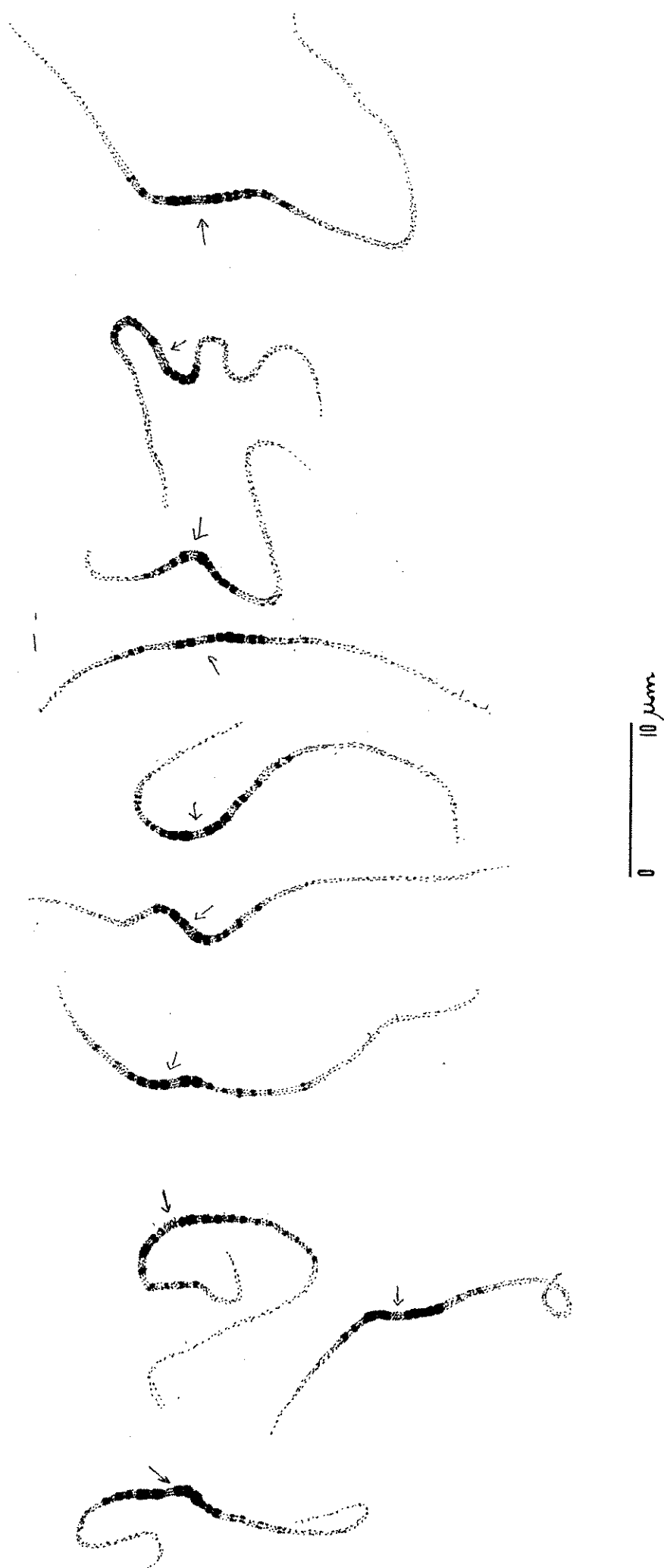
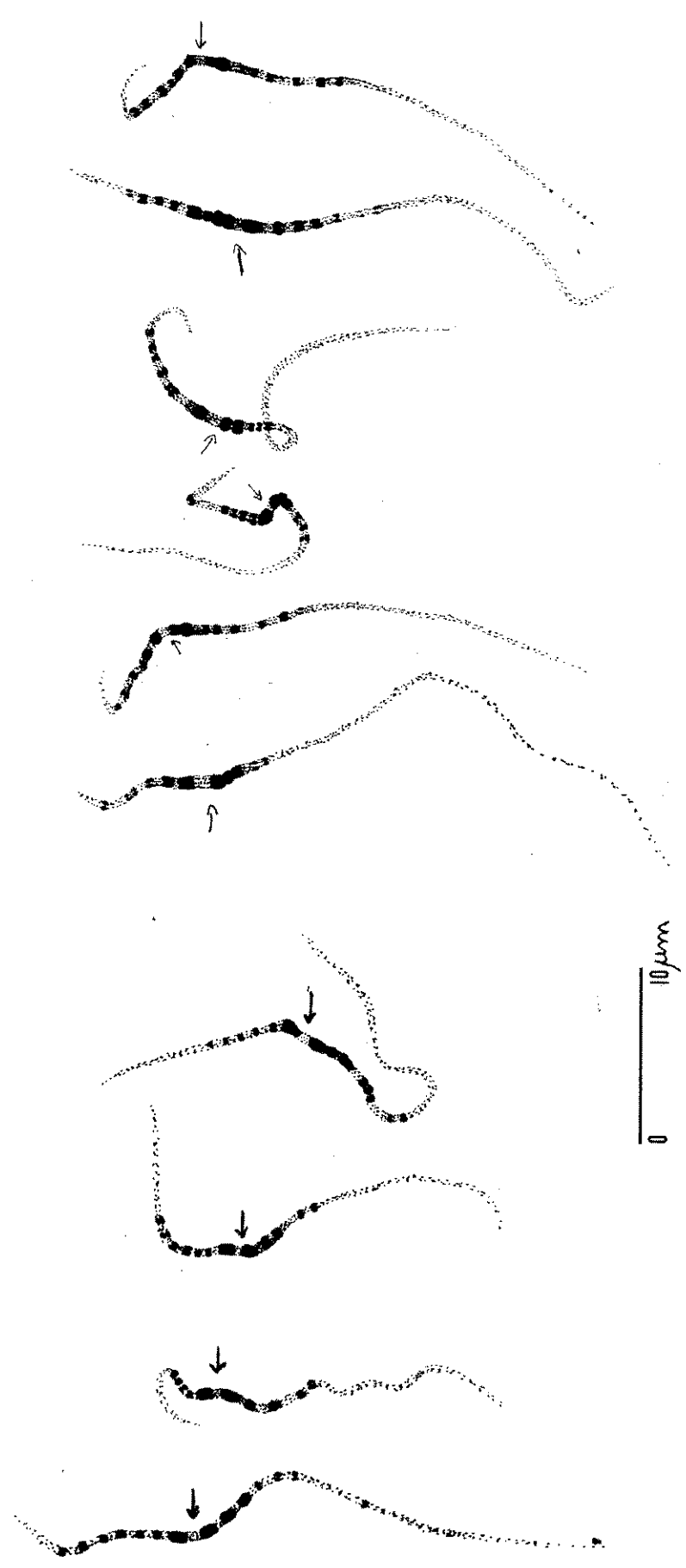


FIGURA 4 - Vários aspectos do cromossomo 2 de C. arabica L.

FIGURA 5 - Vários aspectos do cromossomo 3 de C. arabica L.



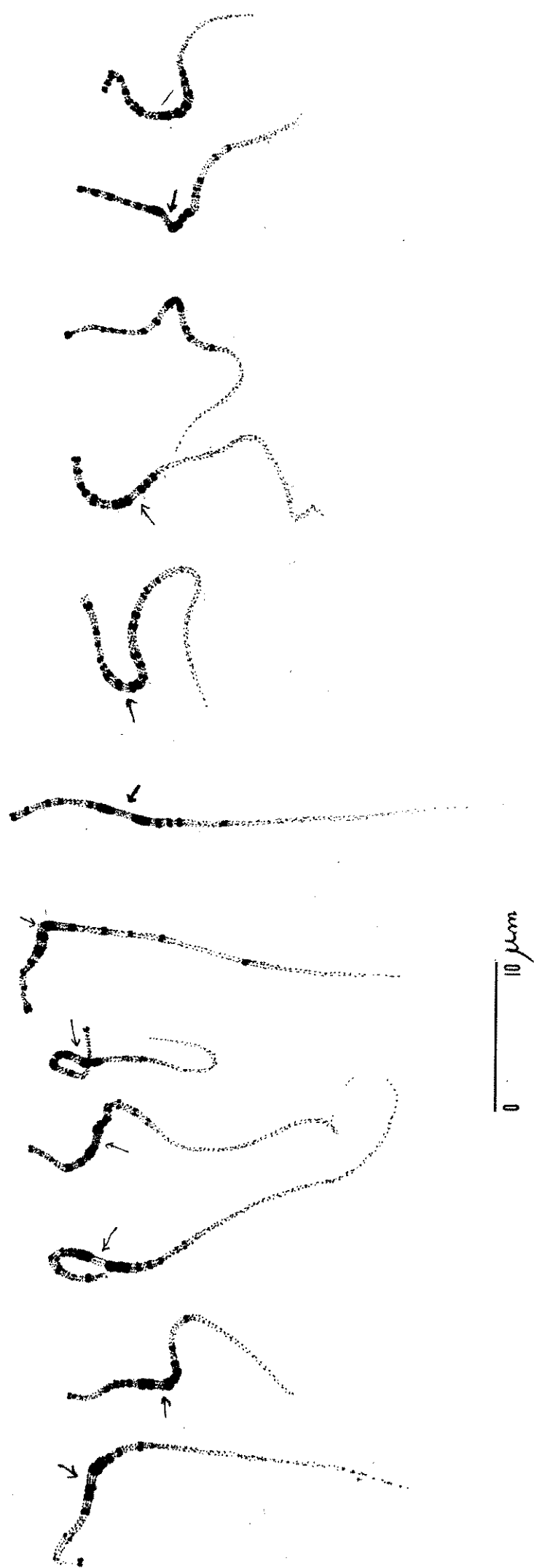


FIGURA 6 - Vários aspectos do cromossomo 4 de *C. arabica* L.

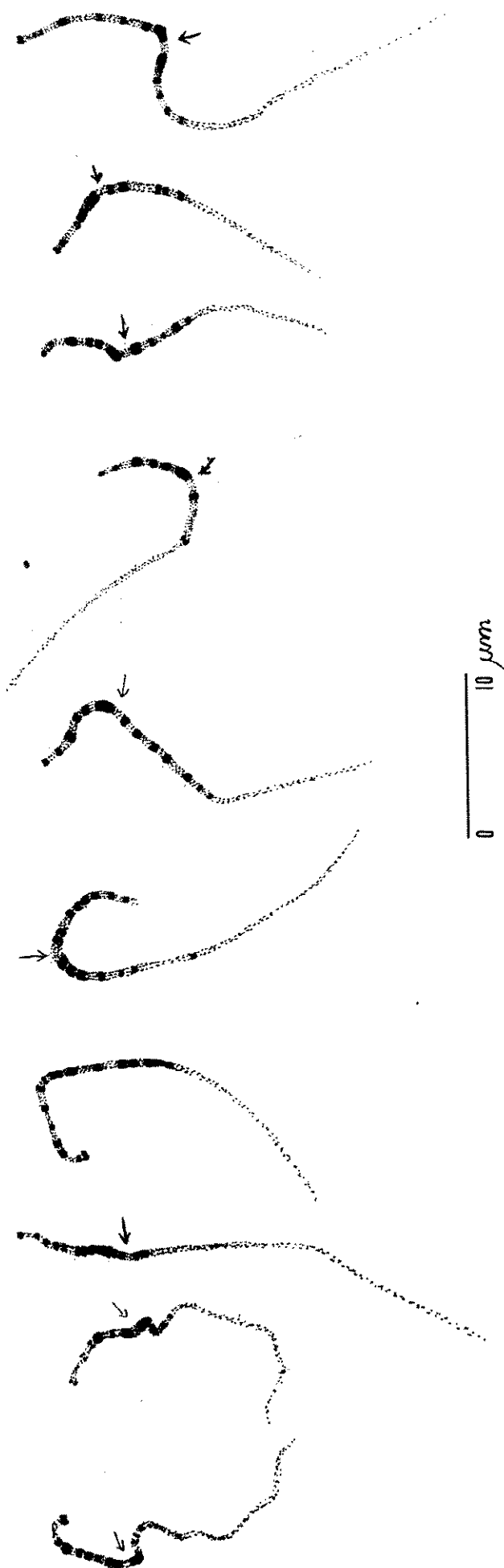


FIGURA 7 - Vários aspectos do cromossomo 5 de *C. arabica* L.

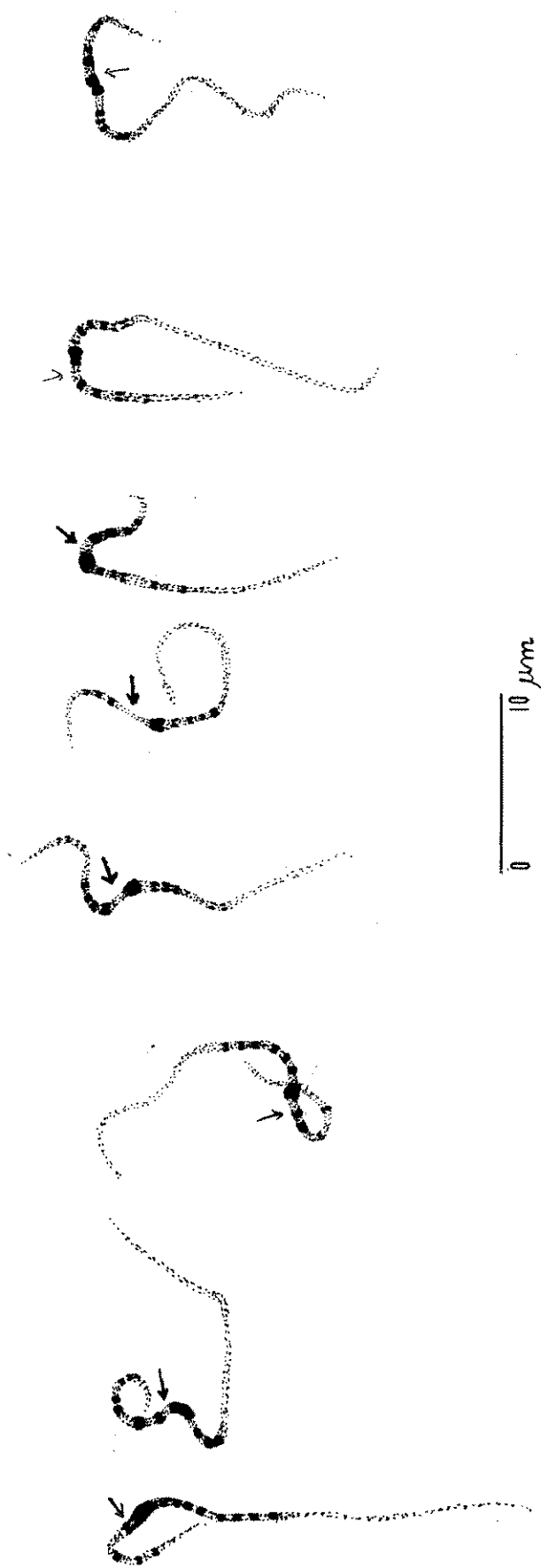


FIGURA 8 - Vários aspectos do cromossomo 6 de *C. arabica* L.

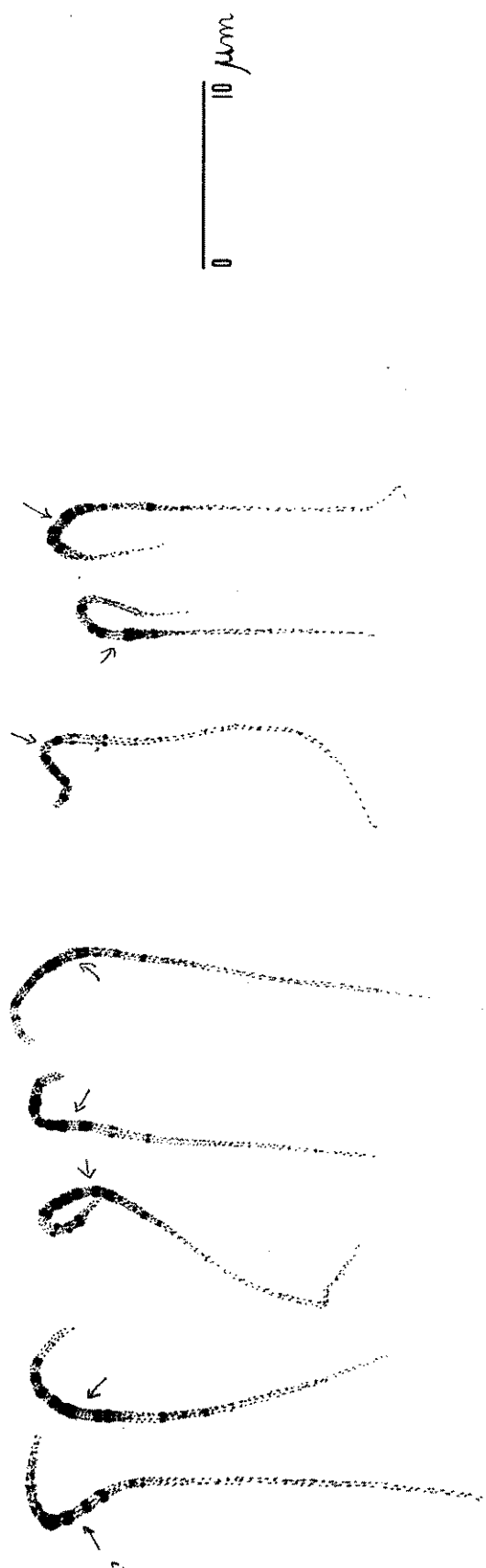


FIGURA 9 - Vários aspectos do cromossomo 7 de C. arabica L.



0 10 μm

FIGURA 10 - Vários aspectos do cromossomo 8 de *C. arabica* L.

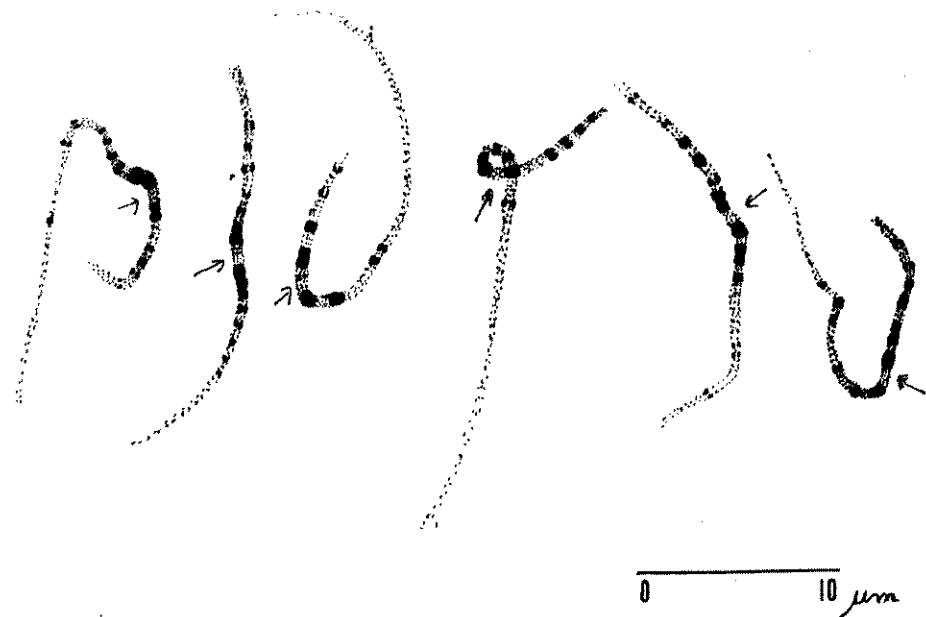


FIGURA 11 - Vários aspectos do cromossomo 9 de C. arabica L.



FIGURA 12 - Vários aspectos do cromossomo 10 de C. arabica L.

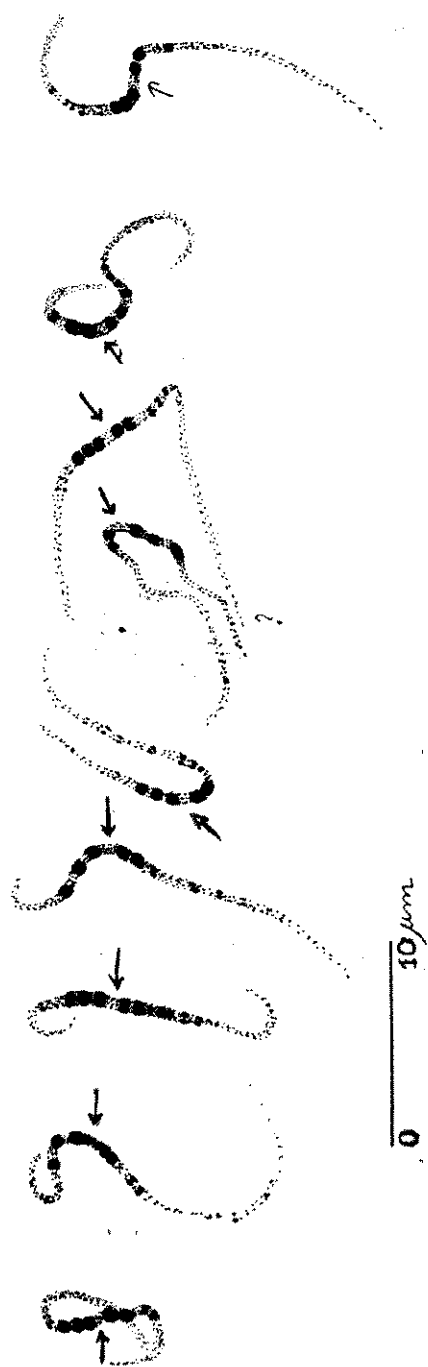
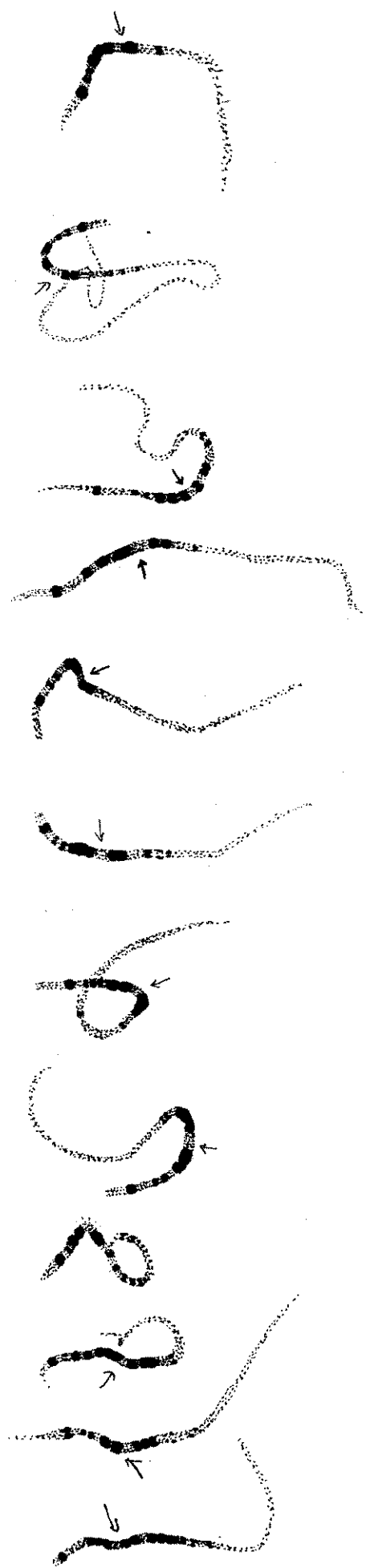


FIGURA 13 - Vários aspectos do cromossomo 11 de C. arabica L.



0 10 μm

FIGURA 14 - Vários aspectos do cromossomo 12 de *C. arabica* L.

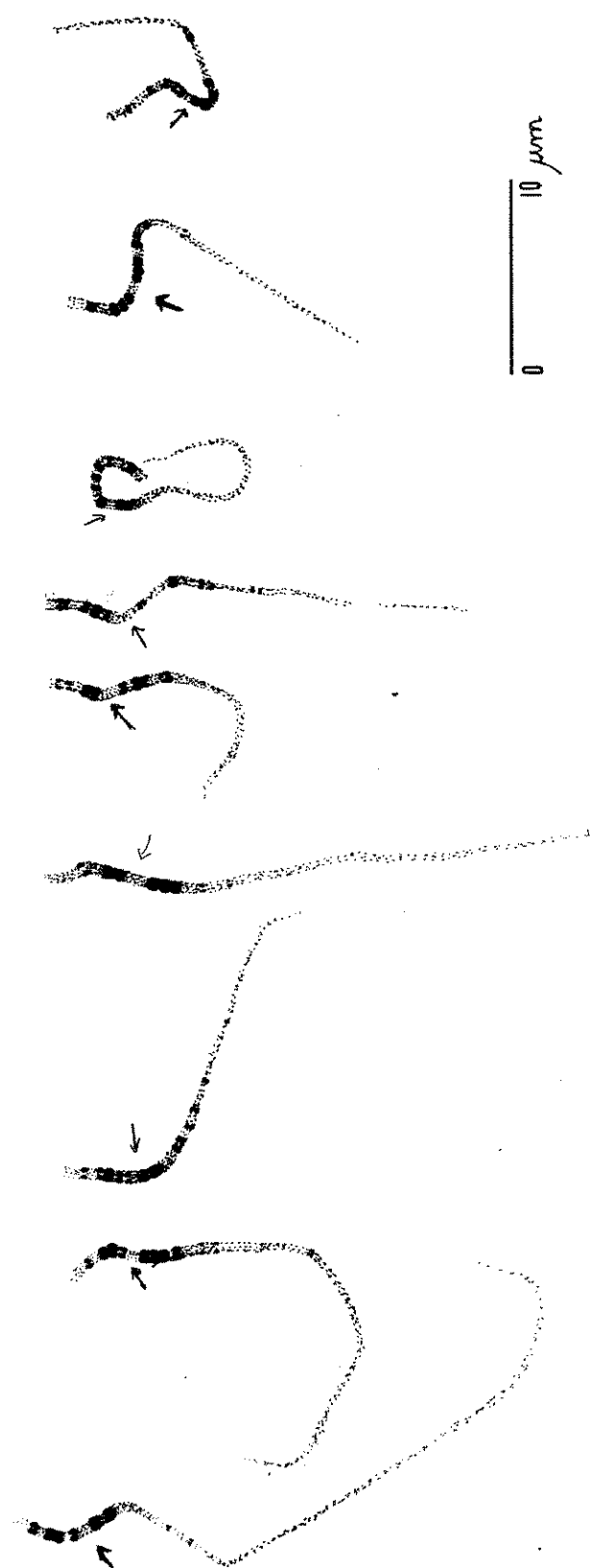
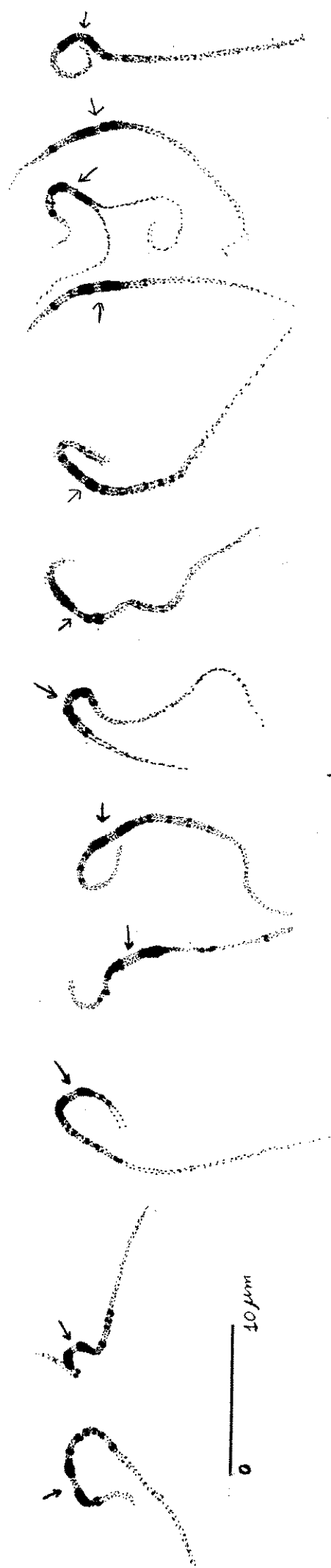


FIGURA 15 - Vários aspectos do cromossomo 13 de C. arabica L.



0 10 μm

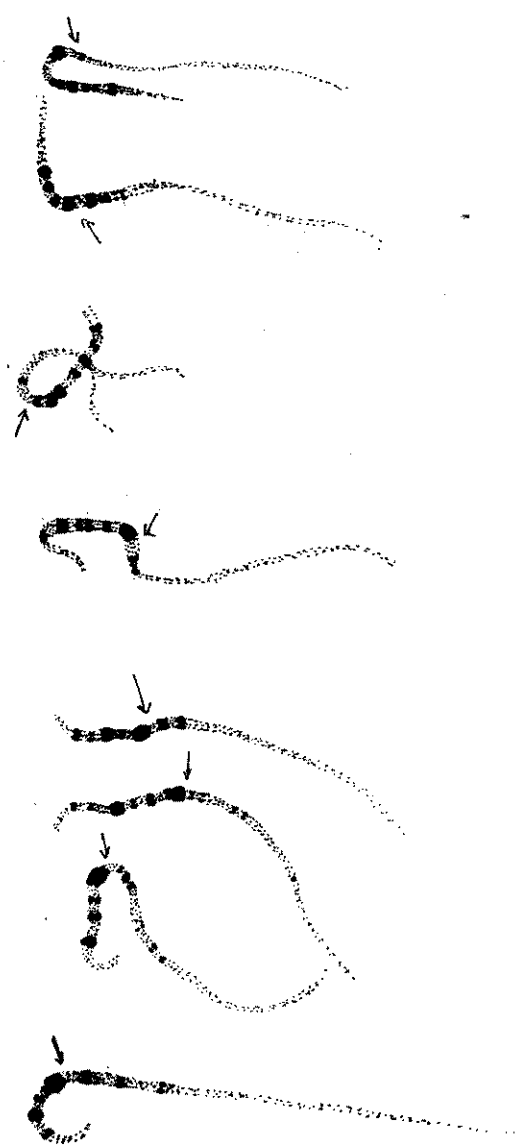
0 10 μm

FIGURA 16 - Vários aspectos do cromossomo 15 de *C. arabica* L.



0 10 μm

FIGURA 17 - Vários aspectos do cromossomo 16 de C. arabica L.



0 10 μm

FIGURA 18 - Vários aspectos do cromossomo 17 de C. arabica L.

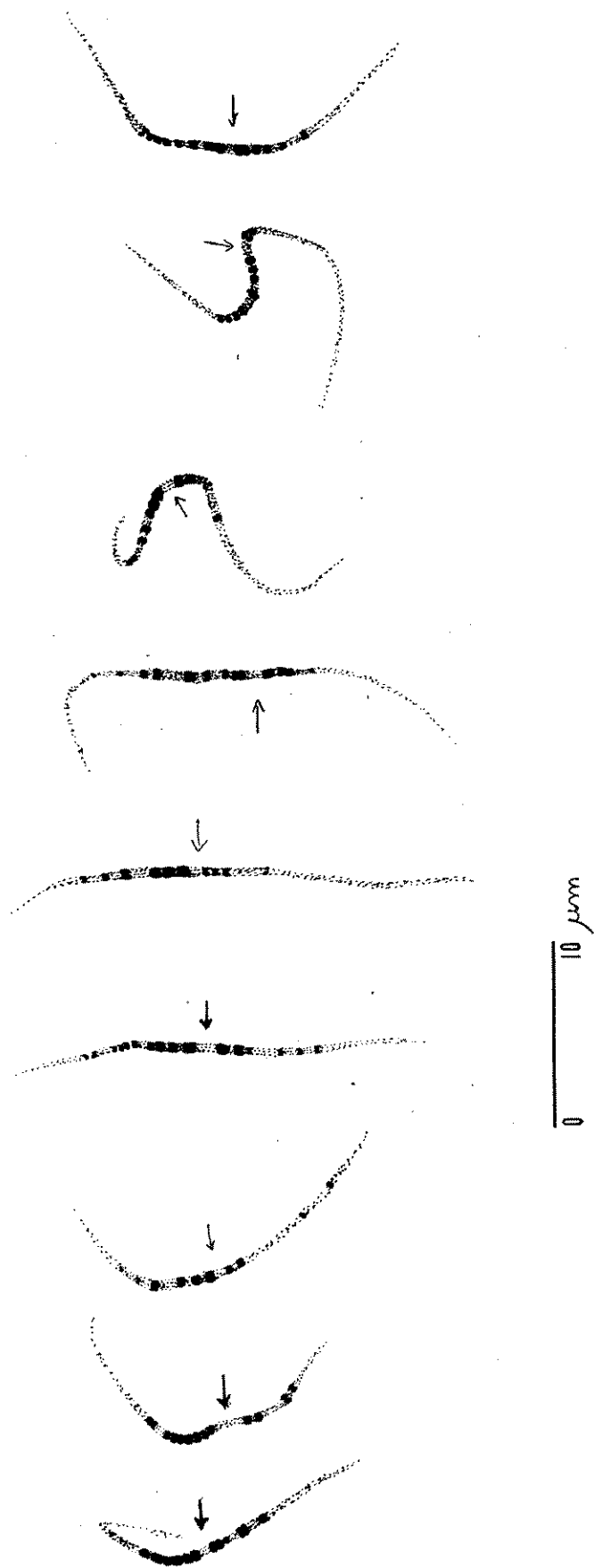
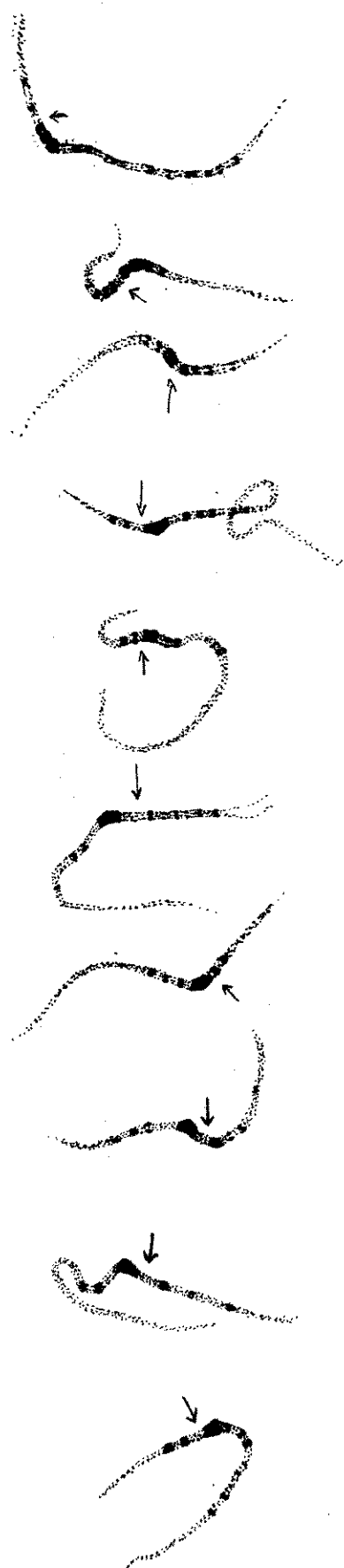
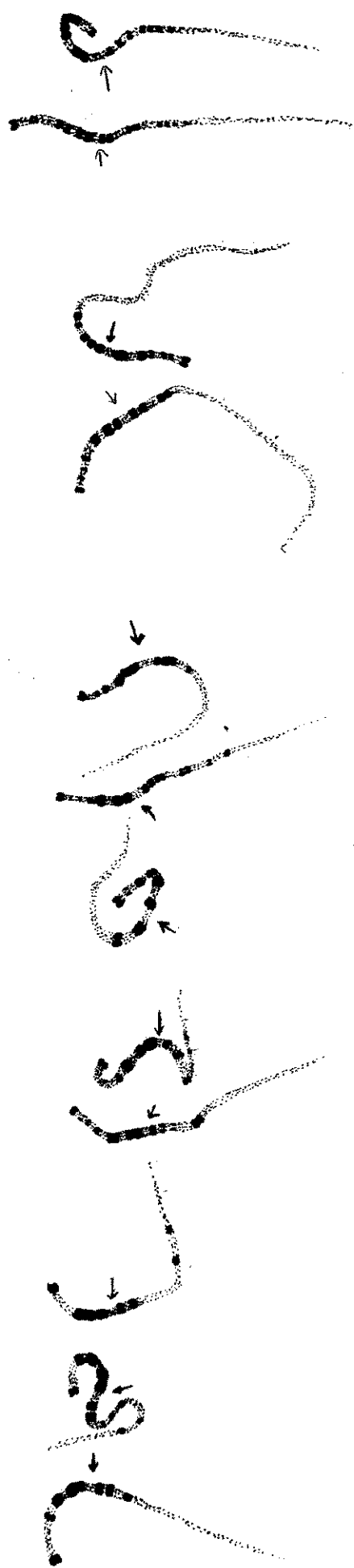


FIGURA 19 - Vários aspectos do cromossomo 18 de *C. arabica* L.



0 10 μm

FIGURA 20 - Vários aspectos do cromossomo 19 de C. arabica L.



0 10 μ m

FIGURA 21 - Vários aspectos do cromossomo 20 de *C. arabica* L.

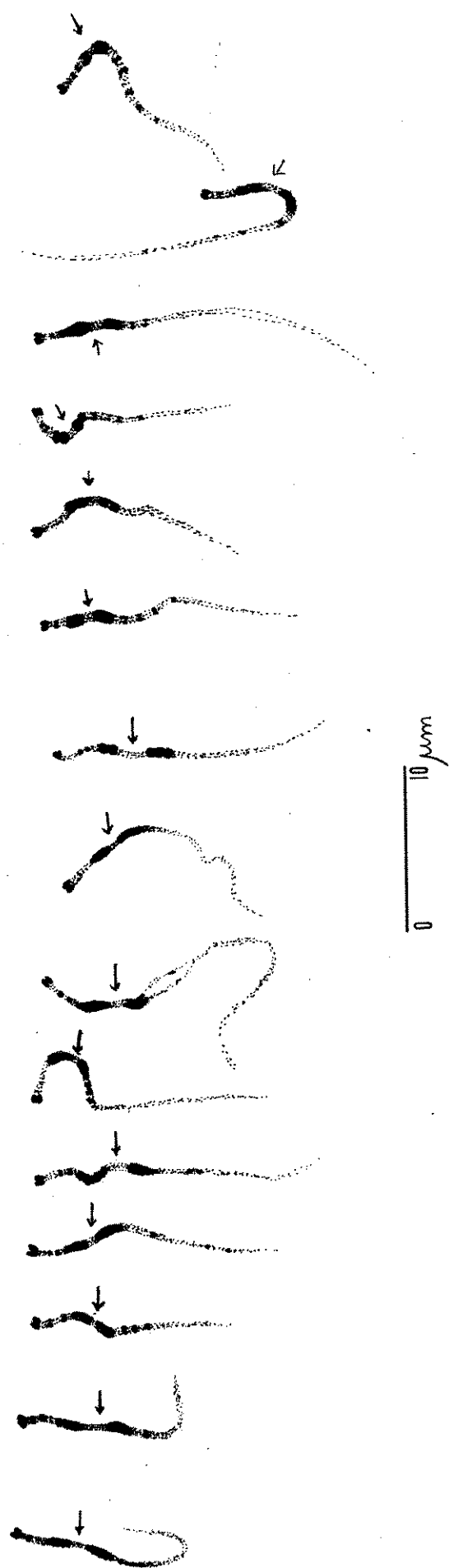


FIGURA 22 - Vários aspectos do cromossomo 22 de *C. arabica* L.

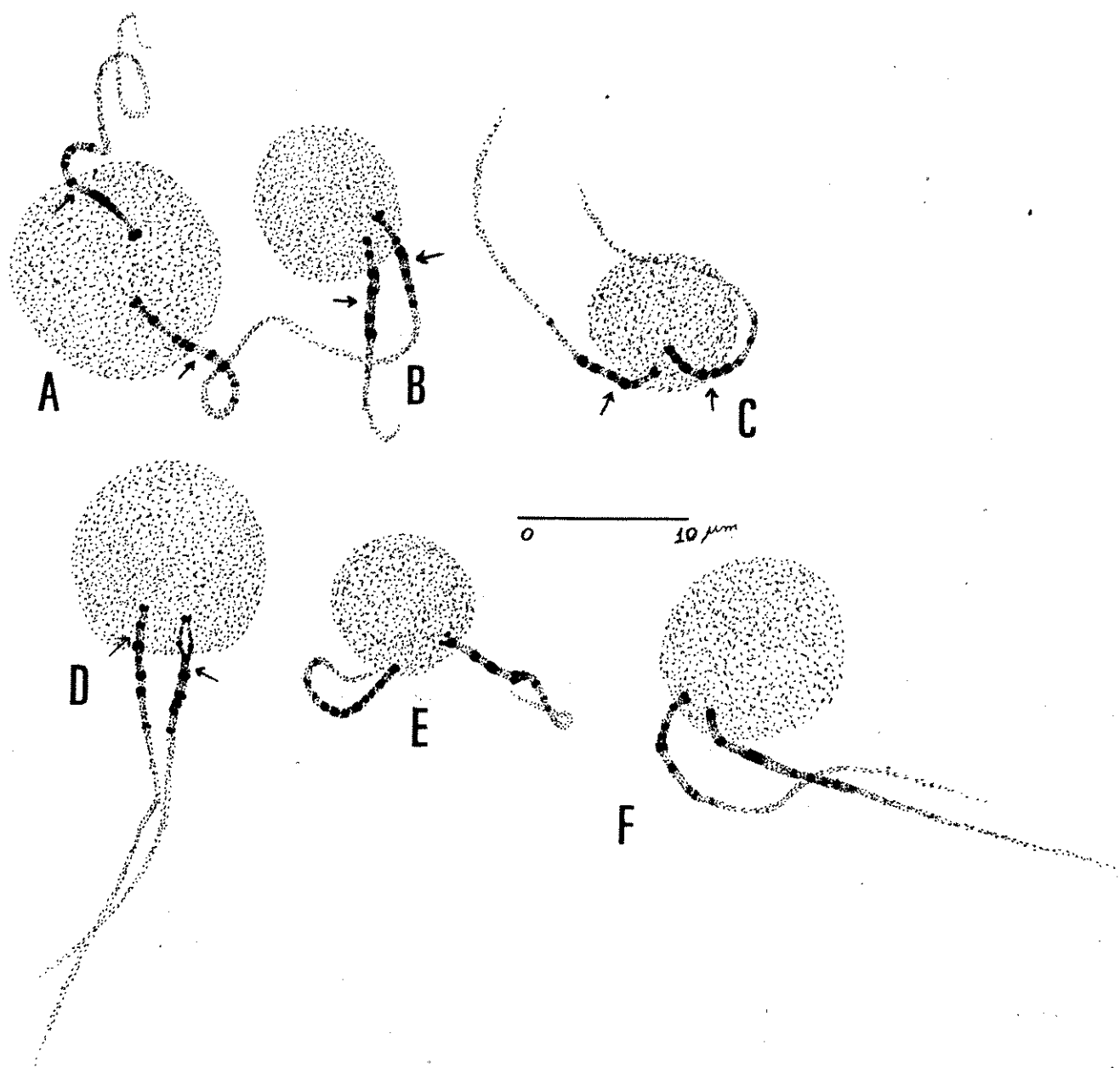


FIGURA 23 - *C. arabica* L. A, B, C, D, E, e F mostram nucléos ligados a dois cromossomos nucleolares, os cromossomos 14 e 21.

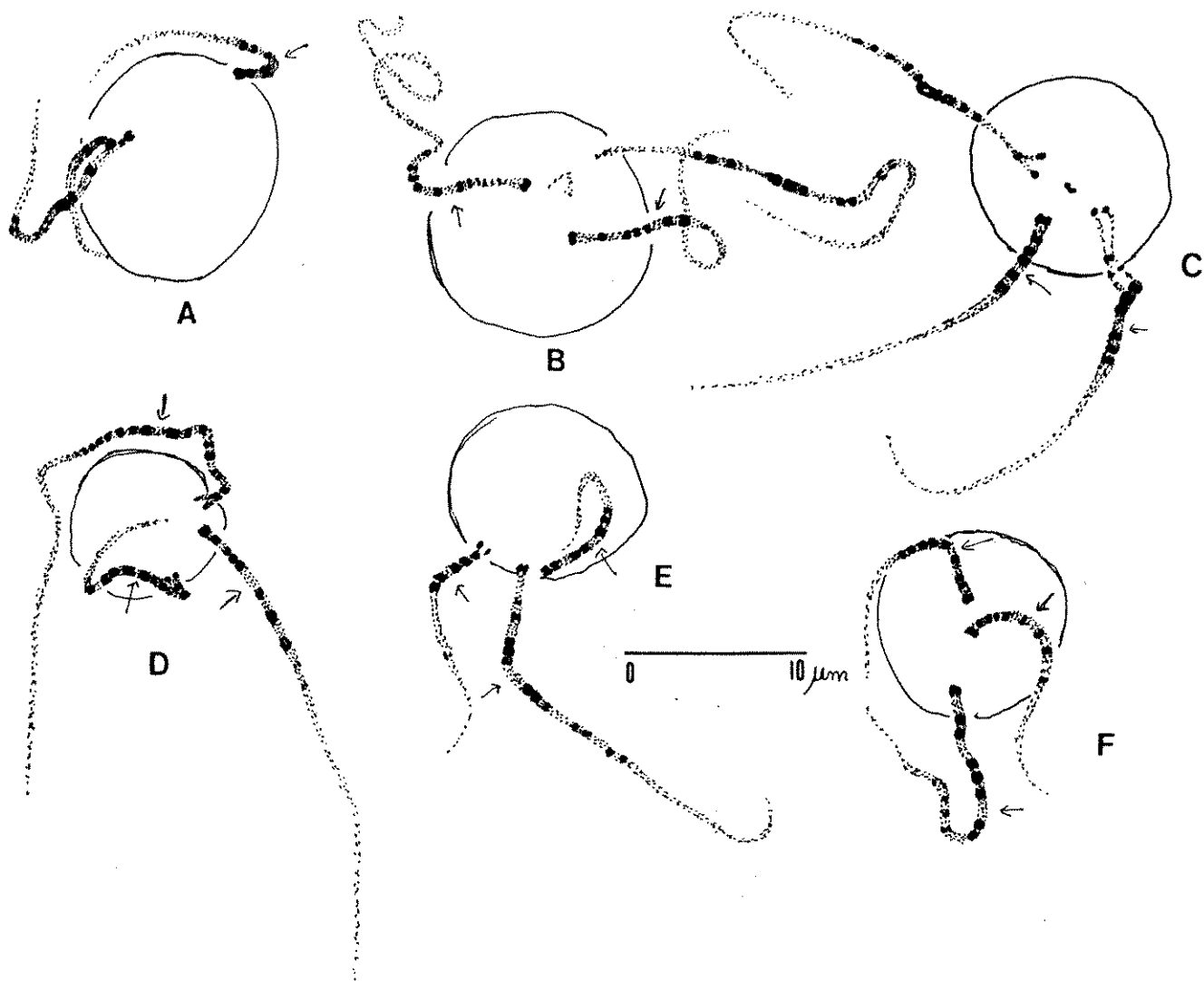


FIGURA 24 - *C. arabica* L. A, B, C, D, E, e F mostram nucléolos ligados a três cromossomos nucleolares, os cromossomos 14, 20 e 21.

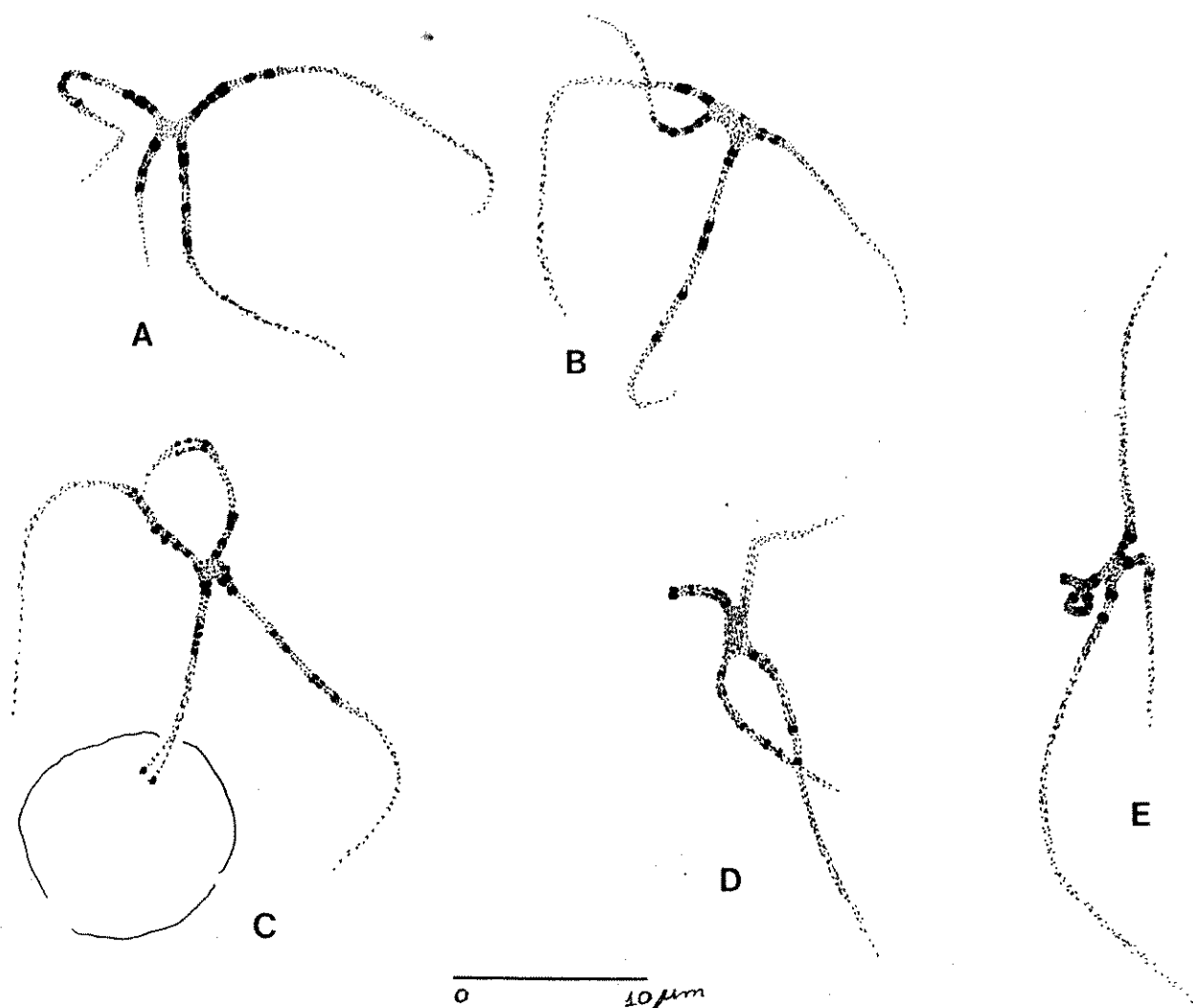


FIGURA 25 - A, B, C, D e E evidenciam translocações observadas na meiose, fase de paquíteno, em *C. arabica* L.

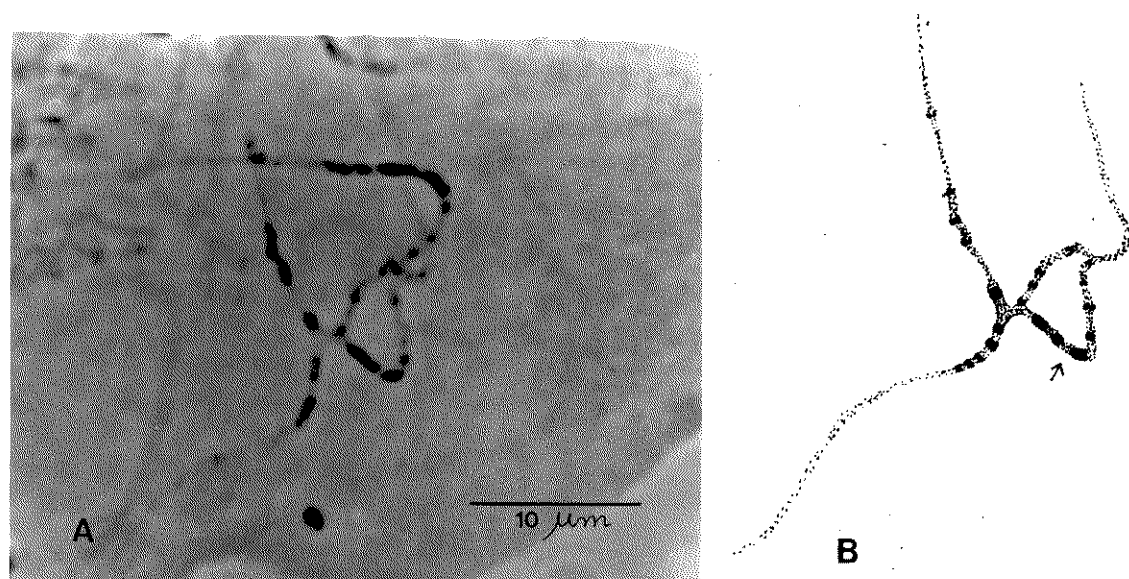
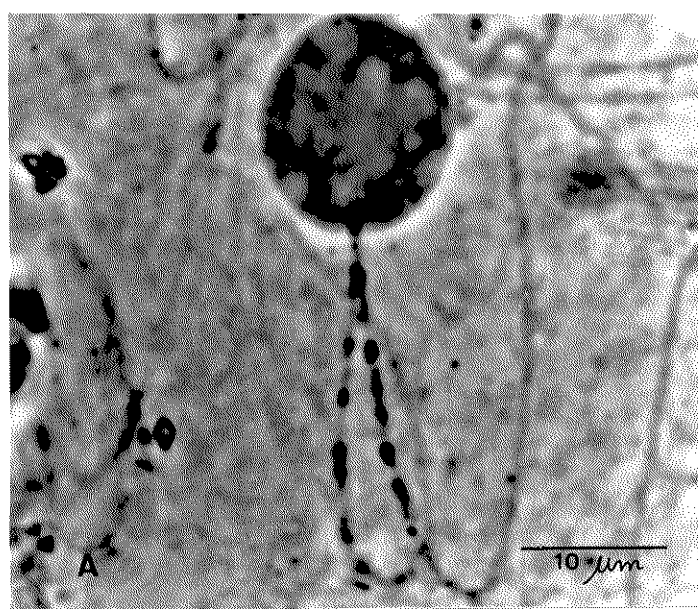
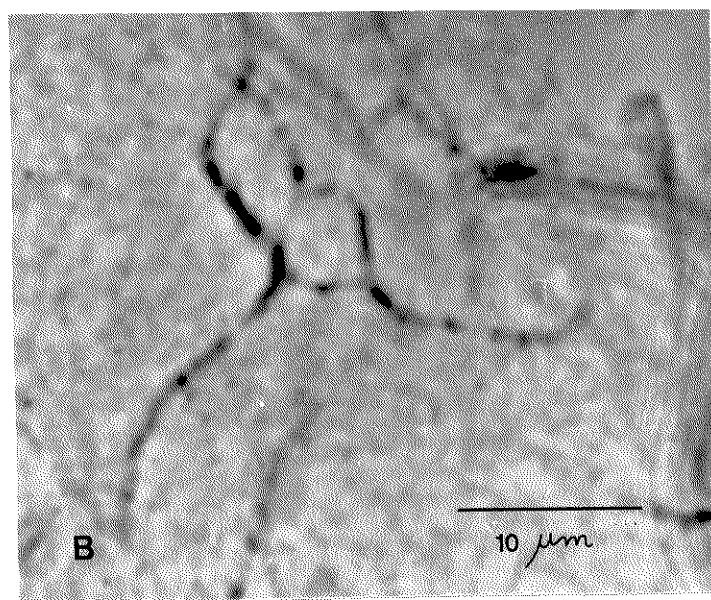
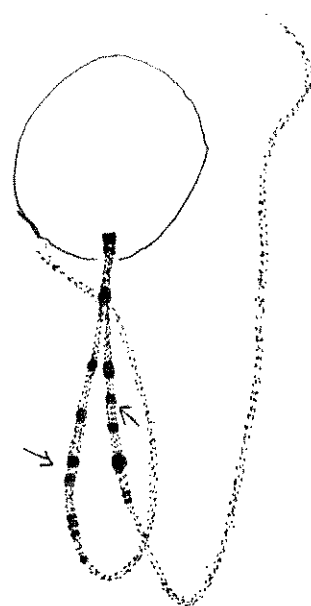


FIGURA 26 - A) Fotomicrografia e B) interpretação de translocação observada, na meiose, em *C. arabica* L.



C



D

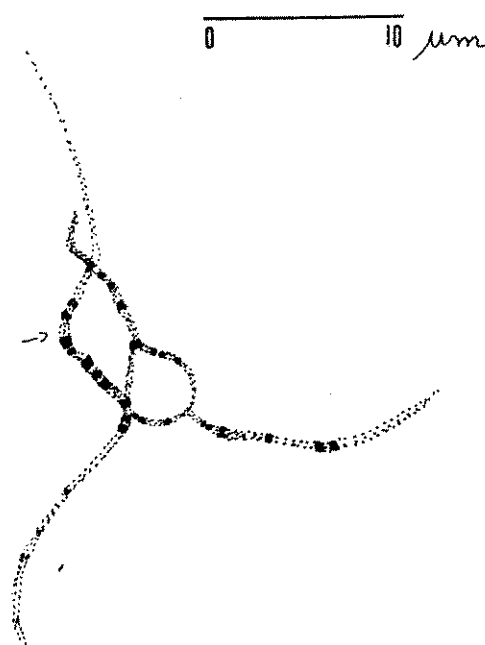


FIGURA 27 - Fotomicrografias A e B, e respectivas interpretações, C e D, de associações entre bivalentes na meiose de C. arabica L.

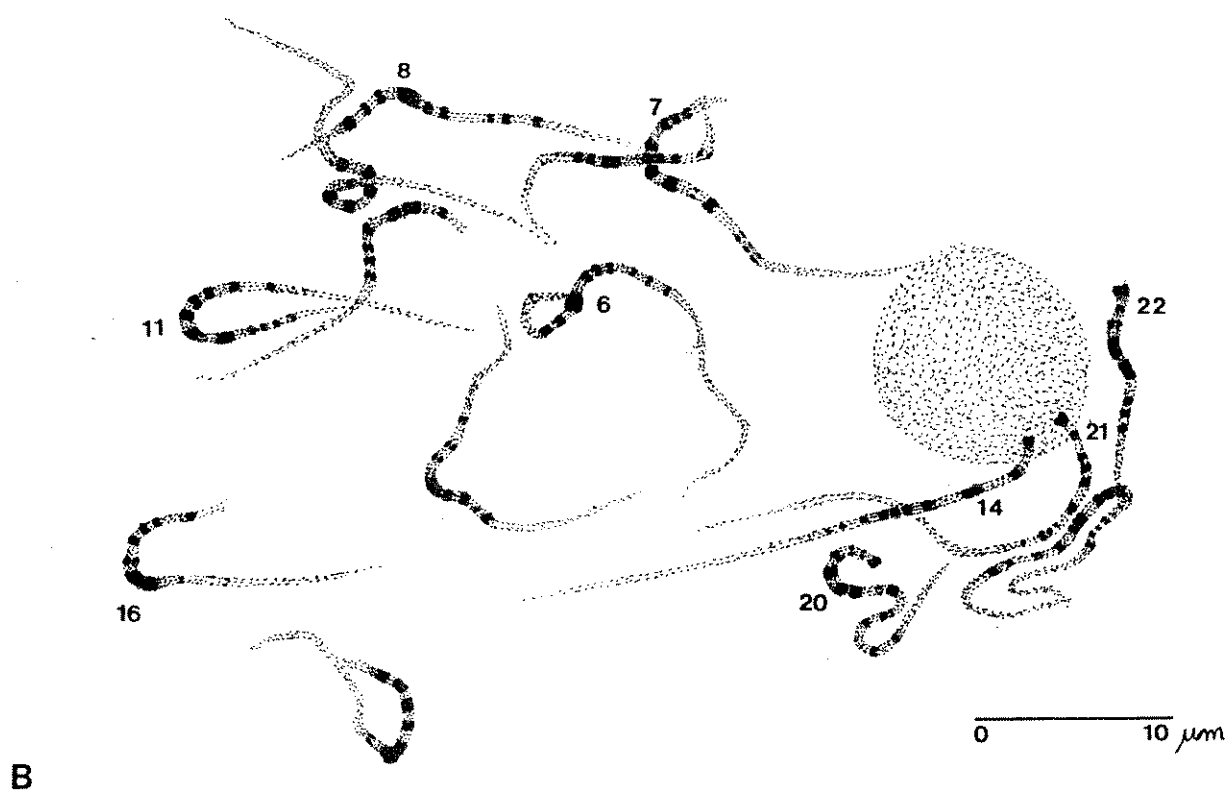
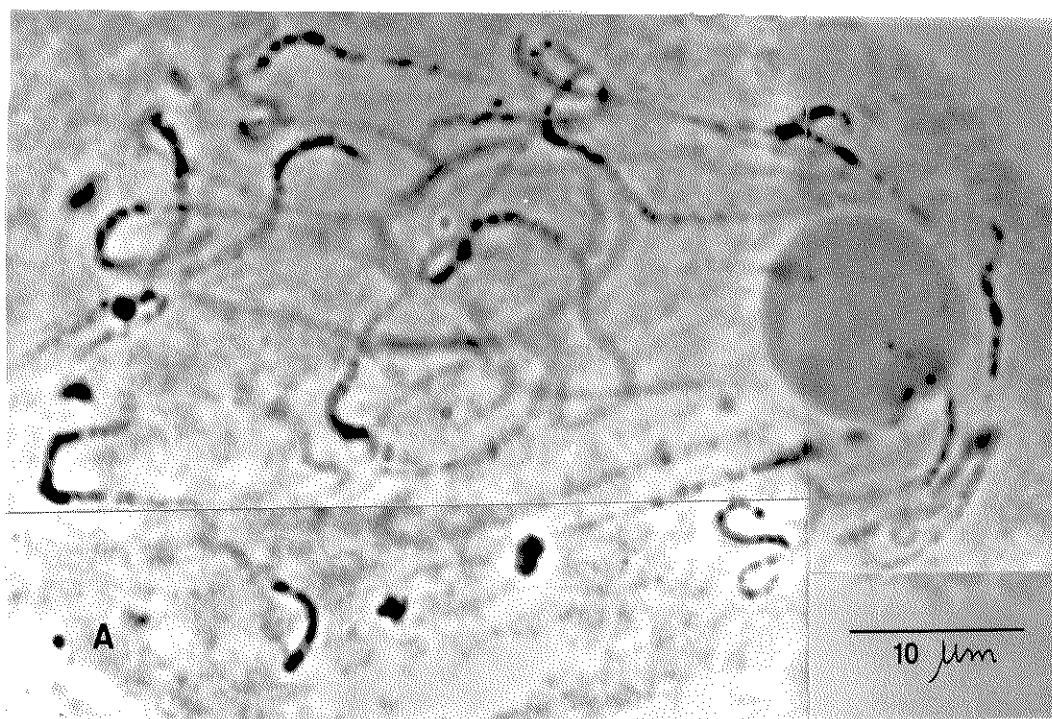


FIGURA 28 - Fotomicrografia (A) e respectiva interpretação (B), de uma célula semi-completa na fase de paquíteno, de *C. arabica* L. Destacam-se os cromossomos: 14 e 21 (nucleolares), 6, 7, 8, 11, 16, 20 e 22.

comprimento linear, pode pertencer a mais de um grupo simultaneamente. Isto dá uma idéia da dificuldade para separar os 22 bivalentes pelo comprimento. Por exemplo: o cromossomo 4 pertence aos grupos 2, 3, 4 e 5. O cromossomo 10 só não entra no grupo 1.

Foi constatada, durante as análises de morfologia de cromossomos, uma variação no número de cromossomos ligados ao nucléolo. Na grande maioria das células predominou a presença de dois cromossomos (figura 23 A, B, C, D, E, F) representados constantemente pelos cromossomos 14 e 21. No entanto em várias células foram observados três cromossomos em associação a um único nucléolo, sendo o terceiro deles representado pelo cromossomo 20 (figura 24 A, B, C, D, E, F).

Foram observadas também algumas translocações (figura 25 A, B, C, D, E; figura 26 A, B), sendo que numa delas verifica-se o envolvimento de um dos cromossomos responsáveis pela formação do nucléolo e do cromossomo 18 (figura 25 C, D, E, figura 19).

Associações de duplas de bivalentes foram registradas em algumas células (figura 27, A, B, C, D) inclusive entre dois bivalentes nucleolares (figura 27, A,C).

Concluindo, constatou-se ainda a presença de duplas de bivalentes com morfologia bastante semelhante, como é o caso das duplas de bivalentes 2 e 3, 4 e 5, 6 e 19, 12 e 16, 14 e 21 (nucleolares) e dupla 20 e 22 (figuras 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.12, 1.16, 1.19, 1.20, 1.22 respectivamente).

Estas duplas de bivalentes quando observadas dentro de uma célula dão a impressão de constituírem tipos repetitivos, sendo necessário muita atenção para se proceder a caracterização individual. No caso de algumas duplas, como por exemplo 4 e 5, 6 e 19, 12 e 16, o reconhecimento ou a certeza de serem bivalentes distintos às vezes só

é possível quando os cromossomos são observados simultaneamente dentro de uma mesma célula.

6. DISCUSSÃO

Habitualmente a maior parte dos estudos sobre a morfologia cromossômica é realizada em cromossomos somáticos na fase de metáfase, e a classificação deles é baseada principalmente no comprimento, na posição do centrômero ou relação de braços e na presença de constrições secundárias. No entanto, em estudos realizados na fase de paquíteno, além das características acima, o número e o modo de distribuição dos cromômeros ao longo do cromossomo torna-se uma das características mais importantes na identificação e classificação.

A análise de morfologia na fase de paquíteno, dos cromossomos constituintes do complemento de *C. arabica* mostrou, de um modo geral, que nestes cromossomos os cromômeros se concentram nas regiões próximas ao centrômero. Tem-se como exceção talvez, três cromossomos com função organizadora do nucléolo, (14, 20 e 21), os quais possuem cromômeros em quase toda a extensão do referido braço (fig. 1, fig. 2). Assim, de acordo com a nomenclatura de JELENKOVIC & HARRINGTON (1972), os cromossomos em paquíteno de *C. arabica* apresentam um padrão de distribuição de cromômeros do tipo proximal, confirmando observações anteriores (MAGLIO, 1983; PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987).

JELENKOVIC & HARRINGTON (1972) tentaram estabelecer uma nomenclatura para a morfologia de cromossomos em paquíteno, tendo o centrômero como referencial. Num dos tipos, denominado de padrão com distribuição proximal, a maioria dos cromômeros dispõem-se predominantemente nas regiões que flanqueiam o centrômero; as partes terminais dos braços são relativamente acromáticas, quando comparadas às regiões próximas ao centrômero. Este tipo de padrão foi observado

numa série de gêneros, sendo típico em *Brachiaria* (VALLE et al. 1981), *Ipomoea* (KRISHNAN et al. 1969; MAGOON et al. 1972), *Lycopersicon* (BROWN, 1949; BARTON, 1950), *Manihot* (MAGOON et al. 1969), *Medicago* (CLEMENT & STANFORD, 1963; BUSS & CLEVELAND, 1968; HO & KASHA, 1972), *Pennisetum* (PANTULU, 1967; VENKASTERWARLU & PANTULU, 1968; LOBANA & GILL, 1973), *Phaseolus* (KRISHNAN & DE, 1965; DE & KRISHNAN, 1966b; DANA, 1966), *Physalis* (VENKASTERWARLU & RAJA-RAO, 1977, 1979a, b), *Plantago* (HYDE, 1953), *Prunus* (JELENKOVIC & HARRINGTON, 1972), *Ricinus* (JACOB, 1956; JELENKOVIC & HARRINGTON, 1973; PARIS et al. 1978), *Rubus* (BAMMI, 1965), e *Solanum* (HAYNES, 1964; YEH & PELOQUIN 1965b; LAM & ERICKSON, 1968; MARKS, 1969; VENKASTERWARLU & BIRAVAMURTY, 1969; BIRAVAMURTY, 1975).

No segundo tipo, denominado de padrão com distribuição não proximal, os cromômeros distribuem-se ao longo de todo o comprimento; mais frequentemente, neste tipo ocorrem ainda os cromômeros diferenciais, os "Knobs", delimitando as partes terminais dos braços cromossômicos. O padrão de distribuição não proximal foi observado em gêneros como *Cynodon* (OURENCHY, 1963; BRILMAN et al. 1982), *Dichanthium* (ROY et al. 1965), *Mnesithea* (ROY & SINGH, 1958), *Saintpaulia* (ERLICH, 1958) e *Zea* (McCLINTOCK, 1933).

Existem, além desses padrões extremos, tipos de distribuição de cromômeros intermediários entre eles, observados em *Agapanthus* (LIMA DE FARIA, 1954), *Hordeum* (SARVELLA et al. 1958) e *Secale* (LIMA DE FARIA, 1952). Mais raramente, alguns gêneros exibem espécies com o padrão proximal e outras não, um exemplo é *Sorghum*, onde as espécies consideradas dentro dos denominados *Eu-sorghum* (MAGOON et al. 1967) apresentam distribuição proximal e as espécies *S. intrans* (GARBER, 1947) e *S. nitidum* (WU, 1978) apresentam características do padrão de distribuição não proximal de

heterocromatina.

Os dados obtidos sobre o tipo de padrão de cromômeros em *C. arabica* podem vir a ser de interesse quando da aplicação de técnicas de bandamento C nesta espécie, com a finalidade de se averiguar o grau de equivalência entre o padrão de bandas C e o padrão de cromômeros. Embora dados sobre padrões de bandas C pericentroméricas venham sendo obtidas, por enquanto, apenas para espécies diplóides de *Coffea* como: *C. deweurei*, *C. racemosa* e *C. canephora* (PIEROZZI, comunicação pessoal), de certa forma não deixam de ser um indício de que possa haver alguma correspondência com o padrão cromomérico do tipo proximal observado também nos cromossomos nucleolares dessas mesmas espécies acima por PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987.

Prevvia-se desde o início deste trabalho que o número relativamente alto de cromossomos na meiose ($n=22$), pudesse dificultar a identificação, já que se trata de um poliplóide. No entanto, surgiram outros fatores que aumentaram a dificuldade de identificação. As primeiras análises revelaram a presença, no complemento, de duplas de bivalentes com padrão de cromômeros bastante semelhantes. Como exemplo tem-se o padrão das duplas formadas pelos cromossomos 2 e 3, 4 e 5, 6 e 19, 12 e 16, 14 e 21 (nucleolares), 20 e 22. Estes davam, à primeira vista, a impressão de serem tipos repetitivos. Para superar a dificuldade de discriminação tentou-se a obtenção de células o mais completas possível pois, somente com a presença simultânea de todos os cromossomos dentro de uma célula, conseguir-se-ia ter a certeza de não serem cromossomos iguais.

A obtenção de células completas torna-se quase impossível devido à técnica de esmagamento utilizada. É inevitável a necessidade de se empregar uma certa pressão sobre a lamínula no

momento de preparar as lâminas, e isto provoca o rompimento da maioria das células. Procurou-se então discriminar os cromossomos das referidas duplas, através da comparação do comprimento cromossômico e/ou relação de braços. O comprimento linear dos cromossomos é um dos critérios mais usados para identificar e numerar os cromossomos dentro de um complemento. Mas o comprimento linear dos cromossomos de *C. arabica* mostrou-se uma característica muito variável, como pode ser comprovado através do desvio padrão da média (s_x), na tabela 1. De acordo com a referida tabela, verifica-se que embora haja diferenças nas medidas do comprimento total absoluto dos 22 bivalentes, ao levar-se em conta o desvio padrão da média constata-se que os grupos não têm uma delimitação nítida. Isto porque há a possibilidade de inclusão, de um mesmo cromossomo, em vários grupos simultaneamente.

Segundo HO & KASHA (1974), quando ideogramas de cromossomos em paquíteno de uma espécie de *Medicago*, elaborados por diferentes autores foram comparados, os cromossomos geralmente diferiam uns dos outros quando a comparação baseava-se apenas no comprimento. Porém, vários foram distinguidos quando foi utilizada a combinação do comprimento cromossômico com a proporção de braços e o padrão de cromômeros.

A variação do comprimento dos cromossomos, na fase de paquíteno em *C. arabica*, pode ser explicada pela impossibilidade de se aplicar uma pressão padronizada durante o esmagamento das lâminas. Também pela ausência de um final distinto nos braços dos cromossomos, nessa fase da meiose, que dificulta a sua delimitação. A associação destes dois fatores fez com que, dependendo do grau de espalhamento das células, as partes terminais dos braços fossem visualizadas com maior ou menor nitidez, interferindo assim na medida real dos cromossomos e aumentando assim o desvio.

A variação no comprimento dos cromossomos em paquíteno tem sido atribuída a várias causas. BROWN (1949) atribuiu às várias regiões dos cromossomos, diferentes taxas de contração, sendo que as regiões heterocromáticas se contrairiam numa proporção mais lenta que as regiões eucromáticas; já MAGUIRE (1962) verificou que os braços mais longos e cromossomos com maiores proporções de braços tenderiam a apresentar maiores variações. HO & KASHA (1974) chegaram à conclusão que fatores genéticos, ambientais, estágio celular, a contração diferencial e mesmo a escolha das células para análise, influenciariam no comprimento dos cromossomos.

O padrão de cromômeros dos cromossomos do complemento de *C. arabica* mostrou ser muito pouco influenciado pela variação do grau de espalhamento celular. Foi também pouco afetado pela diferença de contração cromossômica, devido à progressão natural da meiose, exibindo uma constância relativamente boa (figuras 3 a 22). Notou-se apenas, por exemplo, que quando o material foi coletado num estágio de paquíteno ligeiramente mais inicial, os cromômeros menores quase não aparecem e os maiores, às vezes, dão a impressão de serem formados de unidades menores. Obviamente, num estágio de maior contração (paquíteno terminal) os cromômeros menores, as vezes aparecem em maior número, e cromômeros maiores tornam-se mais evidentes. Porém, tudo isto pôde ser claramente interpretado durante o desenvolvimento das observações (fig. 3 a 22).

Assim o padrão de cromômeros destacou-se como a melhor característica para a identificação dos cromossomos de *C. arabica* e principalmente na discriminação das duplas de bivalentes com morfologia semelhante. Por exemplo, numa análise dos bivalentes 2 e 3, verifica-se que ambos têm, além do comprimento total absoluto próximo (tabela 1), também a disposição de cromômeros em ordem decrescente de

tamanho. No entanto, quando observados simultaneamente dentro de uma célula, nota-se que os cromômeros do cromossomo 3 são maiores e com uma distribuição até quase o final do braço menor (fig. 1, 2, 4, 5).

Os bivalentes 4 e 5 são extremamente semelhantes, pois ambos além de possuírem o comprimento total absoluto praticamente iguais (tabela 1) possuem também o braço menor terminando abruptamente num pequeno cromômero. A única diferença entre eles, é que no bivalente 4 os cromômeros que ladeiam o centrômero são ligeiramente maiores e mais alongados; e no bivalente 5 os cromômeros terminais do braço menor são ligeiramente maiores (fig. 1, 2, 6, 7).

A dupla de bivalentes 6 e 19, chama a atenção pela presença comum de um grande cromômero de forma trapezoidal, delimitando o centrômero do lado do braço maior. A diferença entre eles está praticamente no número maior de cromômeros e no comprimento total que é maior no bivalente 6 (fig. 1, 2, 8, 20).

Na dupla 12 e 16 a semelhança está na localização de um cromômero isolado, localizado subterminalmente no braço menor antes de um pequeno segmento terminal acromático e na presença de dois únicos cromômeros no braço maior. A única diferença fica por conta do número, tamanho e disposição de cromômeros do braço menor.

A dupla 14 e 21, dois bivalentes nucleolares, apresentam-se, à primeira vista muito semelhantes quanto à presença da região organizadora do nucléolo no braço menor, posição do centrômero, tamanho e distribuição de cromômeros. Diferem apenas no número total de cromômeros que no bivalente 14 aparecem num total de seis, três em cada braço e no bivalente 21, quatro cromômeros, dois em cada braço (fig. 1, 2, 23).

A dupla de bivalentes 20 e 22 apresentam o aspecto geral semelhante, ou seja, o braço menor que termina abruptamente num

pequeno cromômero, e o centrômero subterminal ladeado por cromômeros conspícuos. No entanto, o cromossomo 20 possui os cromômeros mais separados um dos outros, enquanto que no cromossomo 22 os cromômeros dispõem-se unidos formando sempre um pequeno segmento (fig. 1, 2, 21, 22). Além disso, o cromossomo 20 eventualmente acha-se em associação com o nucléolo.

Portanto, a análise do padrão de cromômeros revelou que ocorrem semelhanças morfológicas entre 54% dos bivalentes (12 pares de bivalentes, dois a dois), evidenciando uma certa homeologia cromossômica entre os cromossomos de *C. arabica*.

Entretanto, segundo STEBBINS (1971), em poliplóides nem sempre a semelhança estrutural entre cromossomos implica numa semelhança genética. Porém no caso de *C. arabica* estes dados de semelhança estrutural, quando avaliados conjuntamente com dados existentes, principalmente sobre pareamento em di-haplóides, presença de associações secundárias e de multivalentes na meiose dessa espécie levam a supor que talvez haja uma correlação positiva nesse sentido. Por exemplo, KRUG & MENDES (1940) constataram, num híbrido triplóide ($2n = 33$) entre *C. arabica* ($2n = 44$) e *C. canephora* ($2n = 22$), a ocorrência de trivalentes e o pareamento completo entre cromossomos na fase de prófase inicial e na metáfase, numa média de 61,5% e 56,5%, respectivamente. Isto evidencia a ocorrência de pareamento entre cromossomos de *C. arabica*. MENDES & BACCHI (1940) observaram a formação de um a seis bivalentes em 71% das células de uma variedade di-haplóide de *C. arabica*. Da mesma maneira, BERTHAUD (1976) verificou a ocorrência de dois a oito bivalentes em 63 células de di-haplóides de *C. arabica*, sendo as células com quatro bivalentes as mais numerosas. KAMMACHER (1980) registrou, também em di-haplóides de *C. arabica*, uma frequência média de 2,29 bivalentes e a ocorrência de

3,19 quiasmas por célula, indicando que cerca de três cromossomos em cada genoma se correspondiam. Já as associações secundárias e formação de polivalentes não haviam sido registradas na meiose de *C. arabica* por autores como MEDINA (1950) e MENDES (1950a). Foram observadas no entanto, por CHINNAPPA (1968) e GRASSIAS & KAMMACHER (1975), que registraram, na fase de metáfase, associações secundárias, quadrivalentes e univalentes em variedades de *C. arabica*.

No presente trabalho, apesar da semelhança estrutural ter sido observada entre seis duplas de bivalentes, foram registradas apenas duas associações secundárias parciais (fig 27a, b), sendo uma delas entre dois pares de bivalentes nucleolares (fig 27b). Esperar-se-ia que se tais duplas fossem consideradas realmente semelhantes também geneticamente, associações secundárias parciais ou integrais, ocorressem em maior número.

O fenômeno de associação secundária foi observado pela primeira vez por DARLINGTON (1937) que atribuiu tal processo a uma manifestação secundária da poliploidia. Porém segundo THOMAS & REVELL (1946) estas associações também poderiam ser devido a fusões de regiões heterocromáticas da fase de paquíteno e ocorreriam entre cromossomos com homologia suficiente para terem a potencialidade de formar quadrivalentes. Já RILEY (1960a) sugeriu que tais associações seriam a manifestação de resquícios de atração entre cromossomos homólogos, no início da prófase. Assim, as associações observadas podem ser um indício a mais da homeologia entre alguns cromossomos do complemento de *C. arabica*.

O fato de terem sido observadas duas translocações (fig 25, 26), (uma delas envolvendo inclusive também um bivalente nucleolar), não impede de existir a possibilidade de que as duas associações parciais observadas, coincidentemente também entre dois

cromossomos nucleolares, sejam uma consequência dessas translocações. Segundo vários autores, elas seriam responsáveis por alterações no pareamento de poliplóides.

Os cromossomos envolvidos nas associações e nas translocações não puderam ser reconhecidos pois, foram observados num estágio mais inicial da fase de paquíteno, quando os cromossomos ainda não atingiram um padrão de cromômeros típico, ou seja, os cromômeros são ainda pouco evidentes e os menores não são ainda observáveis. Assim torna-se difícil discutir a ocorrência desses eventos ou mesmo tentar correlacionar os dois, já que em ambos ocorre a presença de um cromossomo nucleolar. Como *C. arabica* é uma planta que há muito vem sendo cultivada experimentalmente, estas translocações poderiam ser explicadas como um fato que poderia ser proveniente de alguma forma de seleção; já em termos evolutivos, as translocações poderiam sugerir que o complemento de *C. arabica* estaria ainda em processo de diferenciação.

A presença ou a ausência de pareamento cromossômico, tem sido usada como parâmetro na determinação de semelhança genética entre cromossomos. No entanto, este parece ser também um assunto bem mais complexo. Para DE WET & HARLAN (1972), o pareamento nem sempre indicaria afinidades filogenéticas. Vários exemplos citados por eles contradizem as expectativas, ou seja, autopoliplóides que não mostram na meiose a formação de multivalentes (processo de diploidização) e alopólíplóides que nem sempre apresentam a formação de bivalentes (pareamento preferencial). Segundo esses autores, cromossomos homólogos ou homeólogos poderiam deixar de parear, como cromossomos heterólogos poderiam parear dependendo do sistema genético. Também, a formação preferencial de bivalentes controlada geneticamente, poderia resultar num comportamento citológico dissômico mesmo em genomas

autoplóides.

Sabe-se atualmente que o pareamento dos homólogos envolve uma série de eventos pré-meióticos, como uma disposição espacial determinada dos cromossomos e a ligação de telômeros ou centrômeros a sítios especializados da membrana nuclear de modo ordenado para que a sinapse ocorra (MAGUIRE, 1977; GILLIES, 1984). Assim, segundo JACKSON (1982), os termos autopoliploidia, alopolidiploidia e alopolidiploidia de segmento, criados por STEBBINS (1947) para classificar os poliplóides com base no comportamento de híbridos F₁, representariam na verdade, condições que estariam ligadas a genes atuando no pareamento. O autor acredita ainda que a maior causa do comportamento do tipo alopolidiploide em poliplóides é devido à mudança de posicionamento dos genomas com relação à membrana nuclear.

Em *C. arabica*, existem os seguintes fatos a favor da origem alotetraplóide proposta por CARVALHO (1952): a) as análises genéticas não provam a existência de herança tetrassômica, somente dissômica; b) a distribuição geográfica marginal da espécie em relação às espécies diplóides; c) a obtenção de híbridos entre algumas espécies diplóides assemelhando-se morfológicamente com *C. arabica*; d) o alto índice de pareamento entre os genomas de *C. arabica* e *C. canephora*, indicando a possibilidade de uma justaposição desses genomas.

Assim, da mesma forma os dados citológicos de morfologia em paquíteno aqui apresentados, mostrando a existência de uma grande semelhança estrutural entre vários cromossomos do genoma de *C. arabica*, quando adicionados aos obtidos por outros (KRUG & MENDES, 1940; MENDES & BACCHI, 1940; VISHESHWARA, 1960; CHINNAPPA, 1968; GRASSIAS & KAMMACHER, 1975; BERTHAUD, 1976; KAMMACHER, 1980), vêm confirmar mais uma vez a sua condição de alopolidiploide de segmento, ou

seja, que o complemento de *C. arabica* foi formado, provavelmente, a partir de dois conjuntos cromossômicos bastante semelhantes, os quais poderiam inclusive ser provenientes de ecótipos que já teriam tido algum grau de diferenciação. A esse respeito um aspecto que deve ser considerado é que, segundo SYLVAIN (1958), a espécie *C. arabica* é bastante polimórfica no seu local de origem, constituindo-se em vários ecótipos. Isto poderia implicar no fato em questão pois, de acordo com as idéias de DE WET & HARLAN (1972), a evolução divergente de um genoma, no caso de vários ecótipos, poderia conduzir esse mesmo genoma, quando de uma auto hibridação posterior e a longo prazo, a um comportamento citológico aloplóide. Também os dados citológicos aqui obtidos fazem com que dificilmente seja descartada a possibilidade desta espécie, considerada um alopoliplóide de segmento, possuir um sistema genético onde o pareamento, entre cromossomos homeólogos, seja impedido por ação de genes como o Ph (pairing homeologous) encontrado no cromossomo 5B¹, em *Triticum* (RILEY & CHAPMAN, 1958; RILEY *et al.* 1960) *Avena*, *Festuca*, *Gossypium*, *Nicotiana* e *Lolium* (EVANS 1987).

A atuação desse tipo de mecanismo é comum em muitos alopoliplóides de segmento, onde há restrição de pareamento entre cromossomos homeólogos, e inclusive em autopoliplóides onde a restrição ocorre entre cromossomos homólogos (TIMMIS & REES, 1971; VERMA, 1978). Além disso, mesmo em autopoliplóides há uma tendência à formação de bivalentes como forma de estabilização (GILLES & RANDOLPH, 1951; SYBENGA, 1969, JENKINS, 1987).

O fato de ter sido registrado, por FORNI-MARTINS & CRUZ (1989) numa planta monossômica de *C. arabica*, originada do cruzamento de um cafeeiro *angustifolia* normal com outro cruzamento, a ocorrência de anormalidades na meiose (formação de vários tetravalentes, na fase de paquíteno, diacinese e metáfase I, falta de pareamento em alguns

segmentos dos bivalentes em paquíteno) nos levam a pensar que, ao menos na planta de café analisada, a irradiação ou teria interferido num suposto sistema genético, que presumivelmente controle o pareamento, ou então, que o cromossomo ausente na planta monossômica talvez possa ser o portador de um gene ou genes responsáveis pela organização desse sistema que talvez favoreça o comportamento dissômico verificado em *C. arabica*.

Finalmente, parece que os dados aqui obtidos também corroboram a opinião de CHARRIER (1978) que ao analisar as relações entre muitas espécies das seções *Eucoffea* e *Mascarocoffea*, e estas com relação à *C. arabica*, afirmou que, se mantida a hipótese da alopoliploidia de *C. arabica*, seriam necessários: a) ou dois conjuntos cromossômicos bem mais diferenciados dos que os encontrados nas espécies de ambas as seções acima, pois estas espécies mostraram-se mais próximas entre si do que com *C. arabica*; b) ou a intervenção de um sistema que favorecesse o comportamento dissômico verificado em *C. arabica*, caso duas espécies das seções acima tivessem participado do processo de formação desse poliplóide.

Durante as análises de morfologia dos cromossomos de *C. arabica*, foi constatado uma variação no número de cromossomos responsáveis pela formação do nucléolo. A maioria das células apresentou um mínimo de dois cromossomos associados ao nucléolo, os cromossomos 14 e 21 (fig 23) e outras células apresentaram três cromossomos nucleolares, os dois anteriores, 14 e 21, mais o cromossomo 20 (fig 24).

Um número variável de um a quatro cromossomos nucleolares foi também observado na microsporogênese de *C. arabica* por MEDINA (1950). Já PINTO-MAGLIO & CRUZ (1987) observaram um número constante de apenas dois cromossomos nucleolares nessa espécie.

A ligação dos cromossomos 14, 20 e 21 ao nucléolo, dá a impressão de ser preferencial, pois na grande maioria das células sempre os cromossomos 14 e 21 (fig 23) aparecem ligados ao nucléolo, já o cromossomo 20 apresenta-se menos frequentemente em associações com o nucléolo.

Outro fato que chama a atenção é a morfologia dos cromossomos nucleolares tanto de *C. arabica* aqui observados, como das outras espécies do gênero *Coffea* (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987). Esses cromossomos têm uma morfologia bastante característica no que diz respeito ao braço onde se localiza a região organizada do nucléolo, a qual localiza-se, em todos eles, terminalmente num cromômero terminal, o satélite.

Numa análise do complemento de *C. arabica* nota-se que, embora não tenham sido observados em associação com o nucléolo, alguns cromossomos apresentam uma morfologia característica de cromossomos nucleolares, como é o caso dos cromossomos 4, 5, 22. Seria necessário o uso de técnicas apropriadas que revelassem se tais cromossomos possuem regiões potencialmente capazes dessa função, como a técnica de hibridação de DNA "in situ". No entanto, baseado apenas na morfologia, os cromossomos 4, 5 e 22 dão a impressão de serem cromossomos nucleolares que estariam com suas funções suprimidas, de acordo com relações de dominância, pelos cromossomos que mais comumente se ligam ao nucléolo, os cromossomos 14 e 21.

Outro fato que nos leva a pensar na possibilidade desta hipótese, é o cromossomo, não identificado, que está envolvido numa das translocações descritas, que possui também tal morfologia e que ora apresenta-se associado ao nucléolo (fig 25), ora isolado sem ligação com o nucléolo.

Adicionalmente, relações de dominância entre cromossomos

nucleolares e supressão da capacidade organizadora do nucléolo têm sido largamente registradas geralmente em genomas híbridos vegetais e animais, híbridos de caráter interespecífico e intergenérico. Exemplos de relações de dominância e expressão de supressão da função organizadora do nucléolo foram descritas em híbridos vegetais de *Aegilops* (ORELLANA et al 1984, GERMENÓ et al 1984, GERMENÓ & LACADENA, 1985); *Aegilops* X *Triticum* (MARTINI et al 1982) *Crepis* (NAVASHIN, 1934; DOERSCHUG et al 1977); *Hordeum* (KASHA & SADASIVAIAH, 1971; NICOLOFF et al 1979); *Hordeum* X *Secale* (RAMSAY & DYER, 1983; LINDE-LURSEN & BOTHMER, 1989); *Phaseolus* (KRISHNAN & DE, 1968); *Ribes* (KEEP, 1971); *Salix* (WILKINSON, 1944); *Solanum* (YEH & PELOQUIN, 1965a) *Triticum* X *Aegilops* (FLAVELL & O'DELL, 1979; LACADENA & GERMENÓ, 1985); *Triticum* X *Secale* (LACADENA et al 1984); e em híbridos animais como *Drosophila* (DURICA & KRIDER, 1978; BIGUDO, 1982) e *Xenopus* (HONJO & HEEDER, 1973). Assim se considerarmos *C. arabica* como sendo realmente uma espécie alopoliplóide seria possível a ocorrência desses processos. No entanto, somente o uso de técnicas específicas e apropriadas possibilitaria a certeza da ocorrência tanto dessas relações de dominância como de supressão de função organizadora do nucléolo nos cromossomos de *C. arabica*.

7. CONCLUSÕES

Da análise da morfologia de cromossomos, na fase meiótica do paquíteno, da espécie *C. arabica*, verificou-se que os cromômeros têm uma distribuição predominantemente pericentromérica, formando um padrão de cromômeros denominado, tipo proximal.

A análise de morfologia de cromossomos na fase de paquíteno se mostrou efetiva pois, através do padrão de cromômeros, os 22 bivalentes do complemento de *C. arabica* foram identificados.

Foi verificado que as medidas do comprimento linear dos cromossomos não servem como característica para discriminar os cromossomos, pois mostraram uma grande variação, verificada através do desvio padrão.

Foi concluído ainda, através da comparação dos padrões cromoméricos, que ocorrem semelhanças morfológicas entre 54% dos bivalentes do complemento de *C. arabica*, ou seja, 12 pares de bivalentes, dois a dois, possuem o padrão cromomérico semelhante.

A observação de duas associações secundárias parciais, uma delas entre dois bivalentes nucleolares, evidencia uma possível homeologia entre alguns cromossomos do complemento de *C. arabica*.

Concluiu-se que essa ocorrência de padrões similares e de associações secundárias, entre alguns bivalentes de *C. arabica*, vêm de certa forma, confirmar a condição de alopoliplóide de segmento dessa espécie, bem como evidenciar que o seu complemento foi formado, provavelmente, pela união de dois conjuntos cromossômicos bastante semelhantes. No entanto, a ausência de um maior número de associações secundárias, frente às semelhanças morfológicas observadas, sugere a existência, em *C. arabica*, de um sistema que impede o pareamento entre cromossomos homeólogos.

Concluiu-se também que a variação no número de cromossomos nucleolares associados ao nucléolo pode ser um indício de que relações de dominância ocorram entre os cromossomos nucleolares desta espécie. Também a presença de outros cromossomos, no complemento, com uma morfologia característica de cromossomos nucleolares de *Coffea*, embora nunca observados em ligação com o nucléolo, adicionado ao fato de *C. arabica* ter uma origem híbrida, sugere também que nesta espécie poderia estar ocorrendo a supressão da função organizadora do nucléolo em outros cromossomos do complemento que teriam potencialmente essa função.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de, 1985. C-banding in maize. I. Band patterns. *Caryologia* 38(1):23-30.
- ANTUNES F^o H., 1957. Genetics of *Coffea* XVI. The variety *typica* as a standard for genetical studies of *Coffea arabica*. *J. Hered.* 48:110.
- BAMMI, R.K., 1965. Cytogenetics of *Rubus* IV. Pachytene morphology of *Rubus parvifolius* L. chromosome complement. *Can. J. Gen. and Cytol.* 7:254-58.
- BAHL, J.R. & TYAGI, B.R., 1988. Pachytene chromosomes of *Coleus forskohlii*. *Curr. Sci.* 57(6):326-29.
- BARTON, D.W., 1950. Pachytene morphology in the tomato chromosome complement. *Amer. J. Bot.* 37:639-43.
- BASAK, S.L., 1966. Pachytene analysis in interspecific hybrid between *Corchorus olitorius* L. and *C. trilobularis* L. *The Nucleus* 9(1):71-6.
- BERTHAUD, J., 1976. Étude cytogenétique d'un haploïde de *C. arabica* L. *Café, Cacao, Thé* XX(2):91-6.

- BERTHOU, F. & TROUSLOT, P., 1977. L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série. 9^{ème} Colloque Scientifique International Sur le Café, (Abidjan) ASIC, Paris pp 373-83.
- BERTHOU, F.; MATHIEU, C.; VEDEL, F., 1982. Variation dans l'ADN des organites cellulaires dans les principales espèces de *Coffea*: Analyse des ADN chloroplastiques et mitochondriaux à l'aide des enzymes de restriction. 10^{ème} Colloque Scientifique International Sur le Café, (Salvador), ASIC, Paris, pp. 421-31.
- BERTHOU, F.; MATHIEU, C.; VEDEL, F., 1983. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 65(1):77-84.
- BERTHOU, F.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F.; QUETIER, F., 1980. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans 18 populations sauvages: variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. Café, Cacao, Thé XXIV(4):313-26.
- BHARATHI, M; MURTY, U.R.; KIRTI, P.B.; RAO, N.G.P., 1983. Chromosome pairing in the interspecific hybrids: *Arachis hypogaea* x *Arachis chacoense* nom. nud. Krap. et Greg. and *A. hypogaea* x *A. villosa* Benth. Cytologia 48:527-38.

- BHIRAVAMURTY, P.V., 1975. Pachytene chromosome morphology of *Solanum nodiflorum* Jacq. *Caryologia* 28(3):287-94.
- BIGUDO, H.E.M. de, 1982. Silver staining and the nucleolar organizing activity in *Drosophila* species of the Muller complex and their hybrids. *Rev. Bras. Genet.* 5(1):31-50.
- BOAVENTURA, Y.M.S. & CRUZ, N.D. da, 1987. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner var. robusta (Linden) Chev. que originou o café "Icatu". *Turrialba* 37(2):171-78.
- BOUHARMONT, J., 1959. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. Bruxelles, Institut Nationale pour l'étude agronomique du Congo Belge, 94p. (série scientifique n° 77).
- BOUHARMONT, J., 1963. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. *Euphytica* 12:254-57.
- BRIDSON, D., 1982. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae sub. fam. Cichonoideae) for part 2 of the flora of tropical east Africa: Rubiaceae. *Kew Bull* 36:817-59.
- BRILMAN, L.A.; KEEBONE, W.R.; ENDRIZZI, J.E., 1982. Pachytene morphology of diploid *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *Cytologia* 47(1):171-81.

- BROWN, S.W., 1949. The structure and meiotic behaviour of the differentiated chromosomes of tomato. *Genetics* 34:437-51.
- BUSS, G.R. & CLEVELAND, R.W., 1968. Pachytene chromosomes of diploid *Medicago sativa* L. *Crop. Sci.* 8:744-47.
- CARVALHO, A., 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *arabica*. Separata dos Boletins da Superintendência dos Serviços do Café, n^os 226 a 230, dos meses de dezembro de 1945 a abril de 1946.
- CARVALHO, A., 1952. Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI. Caracteres morfológicos dos haplóides. *Bragantia* 12:201-12.
- CARVALHO, A., 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: *Coffee*, vol. 4 : AGRONOMY. Eds R.J. Clarke and R. Macrae, Elsevier Applied Science, London, p. 129-160.
- CARVALHO, A. & MÔNAGO, L.C., 1967. Genetic relationships of selected species of coffee. *CienL. Cult.*, S. Paulo, 19:151-65.
- CARVALHO, A.; FERWERDA, F.P.; FRAHRN-LELIVELD, J.A.; MEDINA, D.M.; MENDES, A.J.T.; MÔNAGO, L.C., 1969. Coffee: *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. In: *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Eds. FERWERDA, F.P. & WIT, F., Wageningen, H. Veenman & Zonen N.V. 511p.

- CASPERSON, T.; ZECH, L.; MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; WAGH, U.; SIMONSSON, E., 1969. DNA - Binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exp. Cell. Res.* 58:141-52.
- GERMENÖ, M.G. & LACADENA, J.R., 1985. Nucleolar organizer competition in several *Aegilops*-rye hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 27:479.
- GERMENÖ, M.G.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R., 1984. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. *Heredity* 53(3):603.
- CHARRIER, A., 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la Région Malgache, (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africains (*Eucoffea*). Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer. Mémoires Orstom n° 87, 221pp.
- CHARRIER, A. & BERTHAUD, J., 1985. Botanical classification of *Coffee*. in *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Eds M.N. Clifford and R.C. Wilson, Groom Helm, London, p. 13-47.
- CHEVALIER, A., 1942. Les caféiers du globe. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. *Encycl. Biol.*, P. Lechevalier, Paris, 36p. 158 pl.

- CHEVALIER, A., 1947. Les caféiers du globe. III. Systematique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insectes nuisibles. Encycl. Biol., P. Lechevalier, Paris, 356pp.
- CHINNAPPA, C.C., 1968. Interspecific hybrids of *C. canephora* and *C. arabica*. Curr. Sci 37(23):676-77.
- CHINNAPPA, C.C., 1981. Palynology and systematics of the genus *Coffea*. J. Coffee Res. 11(3):55-69.
- CHINNAPPA, C.C. & ADAMS, R.J., 1974. Pollen morphology in the genus *Coffea* I. Scanning electron microscopy. J. Coffee Res. 4(2):29-39.
- CHINNAPPA, C.C. & WARNER, B.G., 1982. Pollen morphology in the genus *Coffea* (Rubiaceae). II. Pollen polymorphism. Grana 21:29-37.
- CHU, YAW-EN., 1967. Pachytene analysis and observations of chromosome association in haploid rice. Cytologia 32(1):87-95.
- CLEMENT, W.M. & STANFORD, E.H., 1963. Pachytene studies at the diploid level in *Medicago*. Crop. Sci. 3:147-50.
- CONAGIN, C.H.T.M., 1961. Microsporogênese, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congesta* Froehner. Bragança 20(27):669-77.

- CONAGIN, C.H.T.M. & MENDES, A.J.T., 1961. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 20(34):787-804.
- COSTE, R., 1955. Les caféiers et les cafés dans le monde. Tome 1: Les caféiers. Ed. Larose, Paris, 382p.
- CRAMER, P.J.S., 1957. Review of literature of coffee research in Indonésia. Turrialba (Costa Rica). Interamerican Institute of Agricultural Sciences 262p (Miscellaneous publ. n^o 15).
- CRUZ, N.D. da, 1972. Aneuplóides de café - Aspectos morfológicos e citológicos na análise de duas progêntes do café "Mundo Novo" (*Coffea arabica*). Tese de doutoramento, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DANA, S., 1966. Chromosome differentiation in tetraploid *Phaseolus* species and *P. ricciardianus*. *The Nucleus* 9(1):97-101.
- DARLINGTON, C.D., 1937. Recent advances in cytology, 2^a edition, Oliver & Boyd, Edinburgh.
- DAS, D.C. & SHASTRY, S.V.S., 1963. Pachytene analysis in *Oryza* VI. Karyomorphology of *O. perennis* Woench. *Cytologia* 28:36-43.
- DE, D.N. & KRISHNAN, R., 1966a. Cytological studies of the hybrid *Phaseolus aureus* x *P. mungo*. *Genetica* 37: 588-600.

- DE, D.N. & KRISHNAN, R., 1966b. Studies on Pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus mungo*. *Genetica* 37:581-87.
- DE WET, J.M.J. & HARLAN, J.R., 1972. Chromosome pairing and phylogenetic affinities. *Taxon* 21(1):67-70.
- DOERSCHUG, E.B.; MIKSCH, J.P.; STERN, H., 1977. DNA variation and ribosomal-DNA constancy in two *Crepis* species and the interspecific hybrid exhibiting nucleolar organizer suppression. *Heredity* 37:441.
- DURICA, D.S. & KRIDER, H.M., 1978. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific *Drosophila* hybrids II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. *Genetics* 89:37-64.
- ERLICH, H.G., 1958. Cytological studies in *Saintpaulia* Wendl. *Amer. J. Bot.* 45:177-82.
- EVANS, G.M., 1987. The control of recombination in allopolyploids. *Heredity* 59:306-20.
- FAGERLIND, F., 1937. Embryologische, zytologische, und bestäubungs-experimentelle studien in der familie Rubiaceae nebst bemerkungen über einige polyploiditäts probleme. *Acta Horti Bergiani. Band IX. n° 9*:195-470.
- FERNIE, L.M., 1966. Impression on coffee in Ethiopia. *Kenya Coffee* 31:115-21.

- FORNI-MARTINS, E.R. & CRUZ, N.D. da, 1989. Estudo da microsporogênese e formação de uma planta monossômica de café (*Coffea arabica* L.). *Turrialba* 39(3):323-27.
- FLAVELL, R.B. & O'DELL, M., 1979. The genetic control of nucleolus formation in wheat. *Chromosoma* 71(2):135.
- FUKUDA, I., 1984. Chromosome banding and biosystematics. In: GRANT, W.F., ed. *Plant biosystematics*. London and New York, Academic Press. p. 97-116.
- GARBER, E.D., 1947. The pachytene chromosomes of *Sorghum intrans*. *J. Hered.* 38:251-52.
- GHATNEKAR, M.V., 1965. Heterochromatic knobs in Italian maize populations and the evolution of maize in Italy. *Cytologia* 30:402-23.
- GILLES, A. & RANDOLPH, L.F., 1951. Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. *Amer. J. Bot.* 38:12-27.
- GILLIES, C.B., 1968. The pachytene chromosomes of a diploid *Medicago sativa*. *Can. J. Genet. Cytol.* 10:788-93.
- GILLIES, C.B., 1970a. Alfafa chromosomes I. Pachytene karyotype of diploid *Medicago falcata* L. and its relationship to *Medicago sativa* L. *Crop. Sci.* 10:169.

- GILLIES, C.B., 1970b. Alfafa chromosomes II. Pachytene karyotype of tetraploid *Medicago sativa* L. Crop. Sci. 10:172-75.
- GILLIES, C.B., 1971. Alfafa chromosomes III. *Medicago glomerata* Balb. Pachytene karyotype. Crop. Sci. 11:463-64.
- GILLIES, C.B., 1972a. Pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species I. Species closely related to *M. sativa*. Hereditas 72:277-88.
- GILLIES, C.B., 1972b. The pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species II. Distantly related species whose karyotypes resemble *M. sativa*. Hereditas 72(2):289-302.
- GILLIES, C.B., 1972c. Pachytene chromosomes of perennial *Medicago* species III. Unique karyotypes of *M. hybrida* Trautv. and *M. subfruticosa* Ramond. Hereditas 72:303-10.
- GILLIES, C.B., 1984. The synaptonemal complex in higher plants. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 2(2):81-116.
- GOTTSCHALK, W., 1951. Untersuchungen am pachytan normaler und rontgenbestrahlter pollen mutter zellen von *Solanum lycopersicum*. Chromosoma 4:298-341.
- GOTTSCHALK, W., 1954. Die chromosomenstruktur der solanaceen unter berücksichtigung phylogenetischer fragestellungen. Chromosoma 6:539-626.

- GRANT, W.F., 1987. Genome differentiation in higher plants. In: URBANSKA, K.M., ed. Differentiation patterns in higher plants. London, Academic Press. p. 9-32.
- GRASSIAS, M. & KAMMACHER, P., 1975. Observation sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. Café, Cacao, Thé XIX(3):177-90.
- GREILHUBER, J., 1977. Why plant chromosomes do not show G-bands. Theor. Appl. Genet. 50:121-24.
- GUPTA, R. & GUPTA, P.K., 1978. Pachytene karyotypes in the genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). Cytologia 43:655-63.
- HARRINGTON, E.; ORTON, E.R.; JELENKOVIC, G., 1985. Pachytene morphology of the chromosome complement in *Cornus florida* "Sweetwater". Cytologia 50:9-19.
- HAYNES, F.L. Jr., 1964. Pachytene chromosomes of *Solanum canaense*. J. Hered. 55:168-73.
- HERMSEN, J.G.TH.; RAMANA, M.S.; VOGEL, J., 1973. The location of a recessive gene for chlorophyll deficiency in diploid *Solanum tuberosum* by means of trisomic analysis. Can. J. Genet. and Cytol. 15:807-13.
- HO, K.M. & KASHA, K.J., 1972. Chromosome homology at pachytene in diploid *Medicago sativa*, *M. falcata* and their hybrids. Can. Jour. Genet. and Cytol. 14:829-38.

- HO, K.M. & KASHA, K.J., 1974. Differential chromosome contractions at the pachytene stage of meiosis in alfafa (*Medicago sativa* L.). *Chromosoma* 45(1):163-74.
- HOFLING, J.F. & OLIVEIRA, A.R., 1981. A serological investigation of some *Coffea* species with emphasis on the origin of *C. arabica* L. *Cien. Cult.*, S. Paulo, 33(1):66-72.
- HONJO, T. & REEDER, R.H., 1973. Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribossomal RNA in interspecies hybrids between *X. laevis* and *X. mulleri*. *J. Mol. Biol.* 30:217-28.
- HSU, T.C., 1973. Longitudinal differentiation of chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* 7:153-76.
- HYDE, B.B., 1953. Differentiated chromosomes in *Plantago ovata*. *Amer. J. Bot.* 40:809-15.
- JACOB, K.M., 1956. The pachytene chromosomes of the castor oil plant. *Cytologia* 21:76-80.
- JACKSON, R.C., 1982. Polyploidy and diploidy: News perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *Amer. J. Bot.* 69:1512-23.
- JAHNAVI, M.R. & MURTY, U.R., 1985a. Chromosome morphology in species of the sections *Erectoides* and *Extranervosae* of the genus *Arachis* L. *Cytologia* 50:747-58.

- JAHNAVI, M.R. & MURTY, U.R., 1985b. A preliminary pachytene analysis of two species of *Arachis* L. Theor. Appl. Genet. 70(2):157.
- JELENKOVIC, G. & HARRINGTON, E., 1972. Morphology of the pachytene chromosomes in *Prunus persica*. Can. J. Genet. and Cytol. 14:317-24.
- JELENKOVIC, G. & HARRINGTON, E., 1973. Chromosome complement of *Ricinus communis* at pachytene and early diplotene? J. Hered. 64:137-42.
- JENKINS, G., 1987. Chromosome pairing in allopolyploids. Heredity 59:308.
- JOS, J.S. & NAIR, G., 1979. Pachytene pairing in relation to pollen fertility in five cultivars of *Cassava*. Cytologia 44(4):813-20.
- KAMMACHER, P., 1980. Sur le comportement méiotique des dihaploïdes de *Coffea arabica* L. 9^{ème} Colloque Scientifique International Sur le Café, (Londres), ASIC, Paris, pp. 717-23.
- KAMMACHER, P. & CAPOT, J. 1972. Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *C. canephora*. Café, Cacao, Thé XVI(4):289-94.

KASHA, K.J. & SADASIVAIAH, R.S., 1971. Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Chromosoma* 35:264-87.

KEEP, E., 1971. Nucleolar suppression, its inheritance and association with taxonomy and sex in genus *Ribes*. *Heredity* 26:443-52.

KHUSH, G.S., 1963. Identification key for pachytene chromosomes of *L. esculentum*. Report of the Tomato Genetics Cooperative 13:12-3.

KHUSH, G.S. & RICK, C.M., 1966. The origin identification and cytogenetic behaviour of tomato monosomics. *Chromosoma* 18:407-20.

KHUSH, G.S. & RICK, C.M., 1967a. Novel compensating trisomics of the tomato: cytogenetics, monosomic analysis and other applications. *Genetics* 56:297-307.

KHUSH, G.S. & RICK, C.M., 1967b. Tomato tertiary trisomics: origin, identification, morphology and use in determining position of centromeres and arm location of markers. *Can. J. Gen. and Cytol.* 9:610-31.

KIRTI, P.B.; MURTY, U.R.; BHARATHI, M.; RAO, N.G.P., 1982. Chromosome pairing in F₁ hybrid *Arachis hypogaea* L. x *A. monticola*. *Theor. Appl. Genet.* 62:139-44.

- KIRTI, P.B.; BHARATHI, M.; MURTY, U.R.; RAO, N.G.P., 1983. Chromosome morphology in three diploid species of *Arachis* and its bearing on the genomes of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Cytologia* 48(1):139-51.
- KRISHNAN, R. & DE, D.N., 1965. Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus aureus* Roxb. *The Nucleus* 8:7-16.
- KRISHNAN, R. & DE, D.N., 1968. Suppression of nucleolus organizer in *Phaseolus*. *The Nucleus* 11(2):155-59.
- KRISHNAN, R. & DE, D.N., 1970. Pachytene chromosomes and origin of a tetraploid species of *Phaseolus*. *Cytologia* 35:501-12.
- KRISHNAN, R. & MAGOON, M.L.; BAI, V.K., 1969. The pachytene of *Ipomea crassicaulis*. *Theor. Appl. Genet.* 39:274-79.
- KRUG, C.A., 1934. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea* L. *Bol. Inst. Agron.* n° 11.
- KRUG, C.A., 1937a. Estudos citológicos em *Coffea* II. *Bol. Inst. Agron.* n° 22.
- KRUG, C.A., 1937b. Observações citológicas em *Coffea* III. *Bol. Inst. Agron.* n° 27.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A., 1951. The genetics of *Coffea*. *Adv. Genet.* 4:127-58.

- KRUG, C.A. & MENDES, A.J.T., 1940. Cytological observations in *Coffea* IV. J. Genet. XXXIX(2):189-203.
- KRUG, C.A. & MENDES, A.J.T., 1943. Conhecimentos gerais sobre a genética e a citologia do gênero *Coffea*. Rev. Agric. (Piracicaba) 18:399-408.
- LACADENA, J.R. & CERMENÓ, M.C., 1985. Nucleolus organizer competition in *Triticum aestivum* - *Aegilops umbellulata* chromosome addition lines. Theor. Appl. Genet. 71(2):278-83.
- LACADENA, J.R.; CERMENÓ, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L., 1984. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticales by silver staining procedure. Theor. Appl. Genet. 67(2/3):207-13.
- LAM, S.L. & ERICKSON, M.T., 1968. Pachytene chromosomes of *Solanum chacoense*. J. Hered. 59:369-77.
- LAM, S.L. & ERICKSON, M.T., 1971. Location of a mutant gene causing albinism in a diploid potato. J. Hered. 62:207-8.
- LEBRUN, J., 1941. Recherches morphologiques et systematique sur les caféiers du Congo. Institut Royal Colonial Belge, Bruxelles, Memoires-collection in - 8^o, t. XI, fasc. 3:1-183.
- LEE, K.H. & ROWE, P.R., 1975. Trisomies in *Solanum chacoensis*: fertility and cytology. Amer. J. Bot. 62:593-601.

- LEROY, J.F., 1967a. Diagnose différentielle du genre *Paracoffea* Leroy. J. Agric. Trop. et Bot. Appl. XIV (6-7):276.
- 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, 265:1043-45.
- LEROY, J.F., 1967c. Recherches sur les caféiers. Esquisse d'une théorie sur l'évolution des espèces. C.R.Acad.Sci., Paris, 265:1373-76
- LEROY, J.F. 1980. évolution et taxogenèse chez les caféiers. Hypothèse sur leur origine. C. R. Acad. Sci., Paris, 291:593-6
- LESLEY, M.M. & LESLEY, J.W., 1935. Heteromorphic A chromosomes of the tomato differing in satellite size. *Genetics* 20:568-80.
- LESLEY, M.M., 1938. The relation between satellite size and nucleolus size in three races of *Solanum lycopersicum*. *Genetics* 23:485-93.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDEBERG, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-20.
- LIMA DE FARIA, A., 1952. Chromosome analysis of chromosome complement of rye. *Chromosoma* 5:1-68.
- LIMA DE FARIA, A., 1954. Chromosome gradient and chromosome field in *Agapanthus*. *Chromosoma* 6:330-70

- LINDE-LAURSEN, I & BOTHMER, R.VON, 1989. Allocycl and nucleolar dominance in *Hordeum* X *Secale* amphiploid metaphases. *Hereditas* 111(1):85-6.
- LOBANA, K.S. & GILL, B.S., 1973. Pachytene chromosomes of *Pennisetum typhoides*. *Cytologia* 38:713-17.
- LOBANA, K.S.; ROSHAN, L.; GUPTA, M.L., 1972. Morphology of pachytene chromosomes in *Linum grandiflorum* Desf. *The Nucleus* 15(2):167-70.
- LOBREAU-CALLEN, D. & LEROY, J.F., 1980. Quelques données palynologiques sur le genre *Coffea* et autres genres du cercle des caféiers. 9^{ème} Colloque Scientifique International Sur le Café, (Londres), ASIC, Paris, pp. 479-506.
- LONGLEY, A.E., 1941. Chromosome morphology in maize and its relatives. *Bot. Rev.* 7:263-89.
- LONGO, C.R.L., 1972. Estudos dos pigmentos flavonóides e sua contribuição à filogenia do gênero *Coffea*. Tese de doutoramento, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LOPES, C.R. & MÔNACO, L.C., 1977. Estudos de quimiotaxonomia em cultivares de *Coffea arabica* L. *Terribia* 27(1):55-61.
- LOPES, C.R.; MÔNACO, L.C., 1979. Chemotaxonomic studies of some of species of the genus *Coffea*. *J. Plantation Crops* 7(1):6-14.

- LOPES, C.R.; CUNHA, R.A. da ; BLOTTA, L.E., 1984. Estudio taxonômico del gênero *Coffea* empleando métodos numéricos. *Turrialba* 34(4):421-30.
- LOPES, C.R.; SHEPHERD, G.; CURI, P.R., 1985. Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de *Coffea*. In: Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, V, Botucatu, Universidade Estadual Paulista, p.165. Resumos.
- MAGLIO, C.A.F.P., 1983. Morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno no gênero *Coffea* L. Tese de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- MAGOON, M.L. & SHAMBULINGAPPA, K.G., 1961. Karyomorphology of *Sorghum propinquum* and its bearing on the origin of 40-chromosome *Sorghum*. *Chromosoma* 12:460-65.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAM, R.; VIJAYA BAI, K., 1969. Morphology of the Pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia* 34(4):612-26.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAM, R.; VIJAYA BAI, K., 1970. Cytological evidence on the origin of sweet potato. *Theor. Appl. Genet* 40:360-66.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAM, R.; VIJAYA BAI, K., 1972. Pachytene karyology of *Ipomoea biloba*. *Cytologia* 37(2):335-43.

- MAGOON, M.L.; TAYYAB, M.A.; SADASIVAIAH, R.S., 1967. The morphology of pachytene chromosome of some *Eu-sorghums*. *Japan J. Genet.* 42(2):95-107
- MAGUIRE, M.P., 1962. Variability in length and arm ratio of the pachytene chromosomes of corn. *Cytologia* 27:248-57.
- MAGUIRE, M.P., 1977. Homologous chromosome pairing. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 277:245-58.
- MARKS, G.E., 1969. The pachytene chromosomes of *Solanum elaeagnifolium*. *Caryologia* 22:161-68.
- MARTINI, G.; O'DELL, M.; FLAVELL, R.B., 1982. Partial inactivation of wheat nucleolus organisers by the nucleolus organisers chromosomes from *Aegilops umbellulata*. *Chromosoma* 91:687-700.
- McCLINTOCK, B., 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. 2. *Cell. Mikr. Anat.* 19:191-237.
- MEDINA, D.M., 1950. Observações citológicas em *Coffea* XIV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var *rugosa* K.M.C. *Bragantia* 10(2):61-6.
- MEDINA, D.M., 1952. Observações citológicas em *Coffea* XIX. Microsporogênese em *Coffea deweyrei*. *Bragantia* 12:153-62.

- MEDINA, D.M., 1972. Caracterização de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Tese de doutoramento, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M., 1959. Auto-incompatibilidade em *Coffea deweurei* (De Wild et Th. Dur.) .Bragantia 18:283-93.
- MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M., 1964. Técnica citológica. Campinas, Instituto Agronômico, publicação n^o 2610, 107p.
- MEDINA, D.M. & RIJO, L., 1969. Microsporogênese em *Coffea stenophylla* G. Don e *C. salvatrix* Swynn. et Phil. Bragantia 28(25):307-22.
- MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M., CRUZ, N.D. da, 1977. Microsporogenesis in diploid species of *Coffea* L. Caryologia 30(1):13-25.
- MENDES, A.J.T., 1938a. Os cromossomos das Rubiaceas. Bol. Inst. Agron. n^o 55.
- MENDES, A.J.T., 1938b. Morfologia dos cromossômios de *Coffea excelsa*. Bol. Inst. Agron. n^o 56.
- MENDES, A.J.T., 1950. Observações citológicas em *Coffea* XV. Microsporogênese em *Coffea arabica* L. Bragantia 10:79-87.
- MENDES, A.J.T., 1958. Advances in coffee production technology. III. Cytology. Coffee and Tea Industries 31(11):37-42.

- MENDES, A.J.T. & BACCHI, O., 1940. Observações citológicas em *Coffea* V. Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. *Jornal de Agronomia* 3(3):183-206.
- MENDES, G.H.T., 1949. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. *Brasília* 7:35-41.
- MENDES, G.H.T., 1950. Observações citológicas em *Coffea* XVI. Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Brasília* 10:97-104.
- MENZEL, M.Y., 1962. Pachytene chromosomes of the intergeneric hybrid *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides*. *Amer. J. Bot.* 49:605-15.
- MENZEL, M.Y., 1966. The pachytene chromosome complement of *Hibiscus cannabinus*. *Cytologia* 31:36-42.
- MEYER, F.G., 1965. Notes on Wild *Coffea arabica* from Southwestern Ethiopia, with some historical considerations. *Econ. Bot.* 19:136-51.
- MISRA, R.N. & SHASTRY, S.V.S., 1967. Pachytene analysis in *Oryza* VIII. Chromosome morphology and karyotypic variations in *Oryza sativa*. *Indian J. Genet.* 27:349.
- MÔNACO, L.G., 1972. Incompatibilidade em *Coffea racemosa*. *Cienc. Cult.*, S. Paulo, 24:150.

- MURTY, U.R., 1973. Morphology of pachytene chromosomes and its bearing on the nature of polyploidy in the cytological races of *Apluda mutica* L. *Genetica* 44:234-43.
- MURTY, U.R.; KIRTI, P.B.; BHARATI, M.; RAO, N.G.P., 1982. Identification of the chromosomes of groundnut *Arachis hypogaea* L. *Cytologia* 47(3-4):585-94.
- NARASIMHASWAMY, R.L. & VISHVESHWARA, S., 1961. Report on hybrids between diploid species of *Coffea* L. *Indian Coffee* 25:104-9.
- NAVASHIN, M., 1934. Chromosome alterations caused by hybridization and their bearing upon genetic problems. *Cytologia* 3:169-203.
- NICOLOFF, H.; ANASTASSOVA-KRISTEVA, M.; RIEGER, R.; KUNZEL, G., 1979. Nucleolar dominance as observed in barley translocations lines with specifically reconstructed SAT chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 53:247-51.
- ONG, S.H., 1975. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis* - A preliminary report. *Proc. Intl. Rubb. Conf., Kuala Lumpur, vol II., pp. 13-26.*
- ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LAGADENA, J.L.; CERMENO, M.C., 1984. Nucleolar competition analysis in *Aegilops ventricosa* and its amphiploids with tetraploid wheats and diploid rye by the silver-staining procedure. *Can. J. Genet and Cytol* 26:34-9.

- OURENCHY, D.K., 1963. Pachytene chromosome morphology in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *The Nucleus* 6(1):63-82.
- OWUOR, J.B.O., 1985. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex F. II. Meiosis in F₁ hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica* 34(2):355-60.
- OWUOR, J.B.O. & VAN DER VOSSEN, H.A.M., 1981. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex. F. I. Fertility in F₁ hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica* 30:861-66.
- OYEWOLE, S.O., 1984. Pachytene analysis and the karyotype of *Drimiopsis barkeri*. *Cytologia* 49(1):81-6.
- PANTULU, J.V., 1967. Pachytene pairing and meiosis in the F₁ hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. *Cytologia* 32:532-41.
- PARIS, H.S., 1981. Pachytene variations in *Ricinus*. *Genetica* 55(1):209.
- PARIS, H.S.; SHIFRISS, O.; JELENKOVIC, G., 1978. Idiograms of *Ricinus communis* L. *J. Hered.* 69:191-96.

- PIEROZZI, N.I., 1986. Análise comparativa dos cromossomos mitóticos de *Coffea deweurei* De Wild et Th. Dur. e *C. racemosa* Lour. através de técnicas de bandamento. Tese de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- PINGLE, A.R. & DNYANSAGAR, V.R., 1976. Pachytene analysis in *Solanum viarum*. *Cytologia* 41:653-58.
- PINTO - MAGLIO, C.A.F. & CRUZ, N.D. da, 1987. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. *Caryologia* 40(1-2):7-23.
- PIZA, S. de T., 1929. Observações sobre a cariocinese na raiz do cafeeiro. *Rev. de Agric., Piracicaba*, 4:9-12.
- PORTERES, R., 1962. Sur quelques caféiers sauvages de Madagascar. *J. Agric. Trop. Bot.* IX(3-6):201-10.
- RAGHUVANSHI, S.S & MAHAJAN, S., 1985. Morphology of the pachytene chromosomes of *Impatiens balsamina* L. var. *bicolor*. *Cytologia* 50(2):223-39.
- RAJA-RAO, K.G., 1979. Morphology of the pachytene chromosomes of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Ind. J. Bot.* 2(2):209-13.
- RAJA-RAO K.G. & PRASAD, L.Y., 1984. Pachytene chromosomes of *Physalis lanceifolia* Nees. *Cytologia* 49(3):567-72.

- RAM, A.S.; SCREENIVASAN, M.S.; VISHVESHWARA, S., 1982.
Chemotaxonomy of Mozambicoffea. J. Coffee Res. 12(2):42-6.
- RAMSAY, G. & DYER, A.F., 1983. Nucleolar organiser suppression in barley x rye hybrids. In: BRANDHAM, P.E. & BENNETT, M.D., ed., Kew Chromosome Conference II, London, George Allen and Unwin. P. p.361.
- RAYBURN, A.L.; PRICE, H.J.; SMITH, J.D.; GOLD, J.R., 1985. C - band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. Amer. J. Bot. 72(10):1610-17.
- REEVES, R.G., 1944. Chromosome knobs in relation to the origin of maize. Genetic 29(2):141-47.
- REDDI, V.R., 1970. Pachytene pairing and the nature of polyploidy in *Sorghum arundinaceum*. Cytologia 23(3):295-302.
- REDDY, L.J., 1981a. Pachytene analysis in *Cajanus cajan*, *Atylosia lineata* and their hybrid. Cytologia 46(1-2):397-412.
- REDDY, L.J., 1981b. Pachytene analysis in *Atylosia sericea* and *Cajanus cajan* x *A. sericea* hybrid. Cytologia 46(3):567-77.
- REDDY, L.J., 1981c. Pachytene analysis in *Atylosia scarabaeoides* and *Cajanus cajan* x *A. scarabaeoides* hybrid. Cytologia 46(3):579-89.

- RILEY, R., 1960a. The secondary pairing of bivalentes with genetically similar chromosomes. *Nature* 185:751-52.
- RILEY, R., 1960b. The diploidisation of polyploid wheat. *Heredity* 15:407-29.
- RILEY, R. & CHAPMAN, V., 1958. Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature* 192:713-15.
- RILEY, R.; CHAPMAN, V.; KIMBER, G., 1960. Position of the gene determining the diploid-like meiotic behaviour of wheat. *Nature* 186:259-60.
- ROY, R.P. & SINGH, A.P., 1958. Pachytene studies of *Mesithea perforata* (L.). *Caryologia* 11:34-41.
- ROY, R.P.; SINGH, A.P.; KUMARI, S., 1965. Pachytene analysis in *Dichanthium* I. Chromosome morphology in *D. annulatum*. *The Nucleus* 8(2):137-48.
- SARVELLA, P.; HOLMGREN, J.B.; NILAN, R.A., 1958. Analysis of Barley pachytene chromosomes. *The Nucleus* 1:183-204.
- SEN, S.K., 1963. Analysis of rice pachytene chromosomes. *The Nucleus* 6(2):107-20.
- SHAMBULIGAPPA, K.G., 1967. Studies on pachytene chromosomes in the genus *Digitaria*. *Genetica* 38:381-87.

- SHASTRY, S.V.S. & MISRA, R.N., 1961. Pachytene analysis in *Oriza* II. Sterility in *japonica-indica* rice hybrids. *Chromosoma* 12:248-71.
- SHASTRY, S.V.S.; RANGA RAO, D.R.; MISRA, R.N., 1960. Pachytene analysis in *Oriza sativa* I. Chromosome morphology in *Oryza sativa* L. *Indian J. Genet. Plant. Breed.* 20:15-21.
- SHASTRY, S.V.S.; SHARMA, D.; RANGA, R.D.R., 1961. Pachytene analysis in *Oriza* III. Meiosis in an inter-sectional hybrid, *O. sativa* x *O. officinalis*. *The Nucleus* 4(1):67-80.
- STEBBINS, G.L., 1947. Types of polyploids: Their classification and significance. *Adv. Genet.* 1:403-29.
- STEBBINS, G.L., 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London. 216 pp.
- SWAMINATHAN, M.S.; MAGOON, M.L.; MEHRA, K.L., 1954. A simple propiono-carminc PMC smear method for plants with small chromossomes. *Indian J. Genet.* 14:87-8.
- SYBENGA, J., 1969. Allopolyploidization of autopolyploids I. Possibilities and limitations. *Euphytica* 18:355-71.
- SYLVAIN, P.G., 1958. Ethiopian coffee - Its significance to world coffee problems. *Econ. Bot.* 12(2):111-39.

- THOMAS, A.S., 1944. The wild coffees of Uganda. *The Empire Journal of Experimental Agriculture* XII(45):1-12.
- THOMAS, P.T. & REVELL, S.H., 1946. Secondary association and heterochromatic attraction in *Cicer arietinum*. *Ann. Bot.* 90:159-64.
- TIMMIS, J.N. & REES, H., 1971. A pairing restriction at pachytene upon multivalent formation in autotetraploids. *Heredity* 26:269-75.
- TYAGI, B.R. & DUBEY, R., 1990. Pachytene chromosome morphology of *Artemisia annua* L. *Cytologia* 55(1):43-50.
- VALLE, C.B. do; SINGH, R.J.; MILLER, D.A., 1987. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Plant Breeding* 90(1):75-8.
- VAN DER VOSSEN, H.A.M., 1985. Coffee selection and breeding. In: *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of beans and beverage*. Eds W.N. Clifford and R.C. Wilson, Croon Helm, London, p. 48-96.
- VENKATESWARLU, J. & BHIRAVAMURTY, P.V., 1969. Morphology of the pachytene chromosomes of the indian diploid *Solanum nigrum* L. *Genetica* 40:407-12.
- VENKATESWARLU, J. & PANTULU, J.V., 1968. Morphology of pachytene chromosomes in pearl millet. (*Pennisetum*). *J. Hered.* 59:69-79.

- VENKATESWARLU, J. & RAJA-RAO, K.G.R., 1977. Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis philadelphica* Lam. Caryologia 30(4):435-40.
- VENKATESWARLU, J. & RAJA-RAO, K.G.R., 1979a. Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis pubescens* L. Cytologia 44(1):161-66.
- VENKATESWARLU, J. & RAJA-RAO, K.G.R., 1979b. Morphology of the pachytene chromosomes of *Physalis angulata* L. Cytologia 44(3):557-60.
- VERMA, S.C., 1978. Pairing restriction and non-homologous pairing in autopoloids of *Adiantum capillus-veneris*. Cytologia 43(3-4):515-23.
- VIJAYA - BAI, K.; MAGOON, M.L.; KRISHNAN, R., 1969. Cytomorphological studies of diploid and tetraploid species of *Ipomoea biloba*. Jap. J. Genet. 44:329-38.
- VISHVESHWARA, S., 1960. Occurrence of a haploid in *Coffea arabica* L. cultivar Kents. Indian Coffee 24:123-4.
- VON FABER, F.G., 1912. Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. Annales du Jardin Bot. de Buitenzorg 25:59-160.

- VOSA, C.G., 1985. Chromosome banding in plants. In: *Advances in chromosome and cell genetics*. Eds. SHARMA, A.K. and SHARMA, A. Bombay, Calcutta, Oxford and IBH Publishing, pp.79-104.
- WAGENWOORT, M. & RAMANA, M.S., 1979. Identification of the trisomic series in diploid *Solanum tuberosum* L. group Tuberosum. II. Trivalent configurations at pachytene stages. *Euphytica* 20:633-42.
- WHELAN, E.D.P., 1969. Pachytene morphology of *Prunus avium* L. c.v. Lambert. *Can. Jour. Genet. Cytol.* 11:125-32.
- WILKINSON, J., 1944. The cytology of *Salix* in relation to its taxonomy. *Ann. Bot.* 8:269-84.
- WU, T.P., 1978. Pachytene morphology of *Sorghum nitidum* chromosome complement. *Cytologia* 43(2):433-40.
- YEH, P.B. & PELOQUIN, S.J., 1965a. The nucleolus associated chromosome of *Solanum* species and hybrids. *Amer. J. Bot.* 52(10):626.
- YEH, P.B. & PELOQUIN, S.J., 1965b. Pachytene chromosomes of potato (*Solanum tuberosum* group Andigena). *Amer. J. Bot.* 52(10):1014-20.
- YU, M.H., 1977. Preliminary study of pachytene morphology in a homozygous line of sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Crop. Sci.* 17:833-36.