

NEIVA IZABEL PIEROZZI

*Este exemplar corresponde a redação final, da tese
defendida pela aluna Neiva Izabel Pierozzi e aprovada
pela comissão julgadora
24/01/86
Neusa Diniz da Cruz*

ANÁLISE COMPARATIVA DOS CROMOSSOMOS MITÓ-
TICOS DE *Coffea dewevrei* De Wild. et. Th.
Dur. E *C. racemosa* Lour. ATRAVÉS DE TÉCN-
NICAS DE BANDAMENTO.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP) para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Bio-
lógicas, área de Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Neusa Diniz da Cruz

CAMPINAS - SP

1985

UNICAMP

Análise comparativa dos cromossomos mitóticos de *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. e *C. racemosa* Lour. através de técnicas de bandamento.

Neiva Izabel Pierozzi

Dissertação de Mestrado

Aos meus pais

Aos meus mestres

À Martha

Ao Fernando,

dedico.

"Não considere sô o que é seu mas também o que é
dos outros" (Fp. 2:4).

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Neusa Diniz da Cruz, chefe da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) pela sua dedicação à minha formação científica, orientação e amizade, pelo seu apoio nos momentos difíceis e incentivo.

Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) pelas facilidades concedidas e permissão para o desenvolvimento do trabalho na Seção de Citologia.

Ao Prof. Dr. George John Shepherd, Prof.^a Dr.^a Luiza Sumiko Kinoshita Gouvêa e Prof.^a Dr.^a Neusa Taroda, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelas valiosas críticas e sugestões, principalmente ao Prof. Dr. George John Shepherd pela correção da parte em inglês.

A Eng.^a Agrônoma Violeta Nagai, pesquisadora científica da Seção de Técnica Experimental e Cálculo (IAC) pelas sugestões e críticas na parte de quantificação e análise estatística dos dados.

Ao técnico Antônio Augusto de Godoy von Zuben, do Departamento de Física Aplicada da UNICAMP, pelas facilidades concedidas na obtenção do nitrogênio líquido.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Mestrado outorgadas e pelo auxílio financeiro destinado a elaboração e encadernação dos exemplares da tese.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa de Mestrado.

Ao Dr. Eli Sidney Lopes, da Seção de Microbiologia de Solo (IAC) pela permissão dada para a utilização do pHmetro durante o período do desenvolvimento da parte prática do trabalho.

Aos funcionários da Seção de Citologia (IAC) pela colaboração efetiva, principalmente ao Sr. Noé González Blanco, pelos serviços de datilografia.

Às colegas da Seção de Citologia pela amizade e convívio durante o período do desenvolvimento do trabalho.

Aos docentes e colegas do curso de pós-graduação, nas áreas de Biologia e Genética Vegetais da UNICAMP, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e convívio.

A Sr.^{ta} Márcia Regina Siqueira, pelo auxílio prestado na compilação de informações e dados bibliográficos.

CONTEÚDO

	Página
ABSTRACT.....	xiv
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Taxonomia de <i>Coffea</i> L.....	04
2.2. Citologia de <i>Coffea</i> L.....	12
2.3. Formação do endosperma em café.....	19
2.4. Heterocromatina e bandamento cromossômico.....	23
3. MATERIAL E MÉTODO.....	48
3.1. Procedência do material e coleta.....	48
3.2. Pré-tratamento e fixação do material.....	52
3.3. Preparo do material para análise estatística e pa ra o bandamento.....	53
3.3.1. Banda-C.....	54
3.3.2. Banda-G.....	57
3.3.3. Banda NOR (Impregnação pela prata).....	58
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Atividade dos endospermas.....	62
4.2. Fixação do material.....	65
4.3. Bandamento cromossômico.....	65
4.3.1. Banda-C.....	67
4.3.1.1. <i>Coffea dewevrei</i> raça <i>excelsa</i>	67
4.3.1.2. <i>Coffea racemosa</i>	79
4.3.2. Bandamento obtido com tripsina e uréia....	84

4.3.2.1. <i>Coffea dewevrei</i> raça excelsa.....	84
4.3.2.2. <i>Coffea racemosa</i>	90
4.3.3. Bandamento com impregnação pela prata (NOR)	93
4.3.3.1. <i>Coffea dewevrei</i> raça excelsa.....	93
4.3.3.2. <i>Coffea racemosa</i>	98
5. DISCUSSÃO.....	106
5.1. Atividade de divisão mitótica nos endospermas....	106
5.2. Bandamento cromossômico.....	109
5.2.1. Banda-C.....	111
5.2.2. Bandas com tripsina.....	122
5.2.3. Bandas com impregnação pela prata.....	127
6. CONCLUSÕES.....	136
7. LITERATURA CITADA.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 - Esquema dos cromossomos mitóticos de <i>C. dewevrei</i> segundo KRUG (1934), ordenados por seu tamanho, com a posição do centrômero de cada.....	72
2 - Esquema dos cromossomos do endosperma de <i>C. dewevrei</i> , na preparação de orceína 2% (FOTO A, FIGURA 8). Setas: posição de centrômero.....	72
3 - A) Esquema dos cromossomos de <i>C. dewevrei</i> (FOTO C, FIGURA 8) planta 63, bandados pela modificação T_2 de banda-C (QUADRO V). B) Ideograma.....	73
4 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de <i>C. dewevrei</i> , planta 63, bandados pela modificação T_{14a} da técnica de banda-C. B) Ideograma.....	74
5 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula de endosperma de <i>C. dewevrei</i> , planta 63, bandados pela modificação T_{15} da técnica de banda-C. B) Ideograma.....	75
6 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de <i>C. dewevrei</i> , planta 766, bandados pela modificação T_{16} da técnica de banda-C. B) Ideograma.....	76

FIGURA

Página

- 7 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. dewevrei* bandados pelas modificações na técnica de banda-C (QUADRO V)..... 77
- 8 - Cromossomos prometafásicos e metafásicos de *C. dewevrei*. FOTO A - orceína acética. FOTO B - técnica de CHINNAPPA & MORTON. FOTO C - modificação T_2 de banda-C (QUADRO V). FOTO D - modificação T_{8a} . FOTO E - modificação T_{4a} e FOTO F - modificação T_{16} 78
- 9 - A) Esquema dos cromossomos em prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{10b} da técnica de banda-C. B) Ideograma..... 81
- 10 - A) Esquema dos cromossomos em prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{17b} da técnica de banda-C. B) Ideograma..... 82
- 11 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa* bandados pelas modificações na técnica de banda-C (QUADRO V)..... 83
- 12 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1a} de banda-G com trip sina (QUADRO VI). B) Ideograma..... 86

- 13 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1b} de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma..... 87
- 14 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1c} de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma..... 88
- 15 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. dewevrei*, planta 766, mostrando as variações de bandas obtidas com o emprego das modificações na metodologia que utiliza a tripsina (QUADRO VI)..... 89
- 16 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{4a} da técnica de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma..... 91
- 17 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{4a} da técnica de banda-G com tripsina (QUADRO VI)..... 92
- 18 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{2b} da metodologia NOR (QUADRO VIII). B) Ideograma..... 96

FIGURA

Página

- 19 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{2b} da técnica NOR (impregnação pela prata) (QUADRO VIII)..... 97
- 20 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta 1193-3-2, bandados pela modificação T_{2a} da técnica NOR (QUADRO VIII). B) Ideograma..... 99
- 21 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta 1194-2-10, bandados pela modificação T_{3e} da técnica NOR (QUADRO VIII). B) Ideograma..... 100
- 22 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa* bandados pelas modificações na técnica NOR (impregnação pela prata) (QUADRO VIII)..... 101
- 23 - FOTO A - *Hippeastrum psittacinum*, célula da raiz colorida pela técnica de STACK & CLARKE. FOTO B e C - prometáfase em células de endosperma de *C. dewevrei* e *C. racemosa* bandadas pela técnica de banda-G (QUADRO VI) com as modificações T_{1a} e T_{4a} respectivamente. FOTOS D a F - prometáfase em células do endosperma de *C. racemosa*, bandados pela técnica NOR (BLOOM & GOODPASTURE, QUADRO VIII) com as modificações T_{3e} (D e E) e T_{2a} (F). FOTO G - me

FIGURA

Página

	táfase de <i>C. dewevrei</i> bandada pela T_{2b} (QUADRO VIII). Setas: assimetria de bandas impregnadas pela prata.....	102
24	- Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de <i>C. dewevrei</i> , planta de número 6, corados apenas com a solução diluída de Giemsa em tampão fosfato Sørensen (1/150), após o despregamento da lamínula.....	105

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO	Página
I - Resumo das metodologias de bandamento C, G e NOR..	35
II - Dados sobre a atividade mitótica nos três tamanhos de endospermas (pequeno, médio e grande) coletados em 2 temperaturas diferentes, com o valor real da porcentagem de células em metáfase (%) e o respectivo valor transformado em arco sen $\sqrt{\%}$	63
III - Análise da variância dos dados sobre a atividade mitótica transformados em arco sen $\sqrt{\%}$	64
IV - Média dos 3 tamanhos de endospermas nas 2 temperaturas de coletas.....	64
V - Resultados obtidos através de modificações introduzidas nas etapas de bandamento-C.....	70
VI - Resultados obtidos através de modificações nas etapas da técnica de bandamento-G que utilizou a triplicata na concentração 0,0006%.....	85
VII - Resultados obtidos com as modificações das etapas da técnica de bandamento G que utilizou a uréia em diluição de 3 partes para 1 de tampão (3:1), em diferentes modalidades.....	95

QUADRO

Página

VIII - Resultados obtidos através de modificações nas etapas da técnica de bandamento pela impregnação da prata (NOR) com o uso de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3).....	95
--	----

COMPARATIVE ANALYSIS OF MITOTIC CHROMOSOMES IN *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. AND *C. racemosa* Lour. USING BANDING TECHNIQUES

ABSTRACT

Two diploid ($2n=22$ chromosomes), self-incompatible coffee species, *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. and *C. racemosa* Lour., were subjected to C-, G- and NOR banding techniques with the aim of verifying the utility of these banding techniques for longitudinal differentiation of mitotic chromosomes of these two species and in construction of individual karyotypes for investigations of probable phylogenetic relationships.

The endosperm (triploid tissue, $3n=33$ chromosomes) of young and immature fruits was the tissue employed for analysis because it is soft, squashes easily, requires no pretreatments and gives good cytological preparations.

An analysis of the effects of endosperm size and temperature at which the material was collected, revealed that: (a) there were no significant differences between different temperatures; (b) mitotic activity was most intense in the smaller (1-4mm) endosperms and that the peripheral layers were more active at all sizes.

The results obtained with the use of different C-, G-, or NOR banding modifications revealed that the endosperma chromosomes do show banding, in spite of their small size, although some variation in patterns occurs. Treatment with diluted tryp-

sin, with adjusted concentrations, also produced banding while urea did not.

A comparative analysis of patterns of C-bands, trypsin bands and those obtained with silver impregnation showed there was similarity between some sets of homologous chromosomes in both *C. deweyrei* and *C. racemosa*. Similarities were also observed between some homologous sets when the ideograms of *C. deweyrei* and *C. racemosa* were compared with the same banding techniques. Such similarities were more accentuated with G-banding followed by C-banding and silver impregnation.

Lateral asymmetry in chromosome bands was encountered with the NOR technique modifications and was attributed to different causes.

Results obtained with Giemsa alone, suggest that differentiation of chromosomes bands can be produced without pre-treatment.

New tests of the chloridric hydrolisis and Feulgen reaction are necessary to obtain a satisfactory coloration.

ANÁLISE COMPARATIVA DOS CROMOSSOMOS MITÔTICOS DE *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. E *C. racemosa* Lour. ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE BANDAMENTO

RESUMO

Duas espécies diplóides ($2n=22$ cromossomos) e autoincompatíveis de café, *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. e *C. racemosa* Lour., foram submetidas às técnicas de bandamento cromossômico C, G e NOR. A finalidade foi verificar a adequação de tais técnicas na diferenciação longitudinal dos cromossomos mitóticos dessas duas espécies e com a elaboração posterior de um cariótipo individual que por comparação permitisse estabelecer prováveis relações filogenéticas.

O tecido empregado para esta análise foi o endosperma de frutos jovens e imaturos que, além de ser um tecido triplóide ($3n=33$), é mole, cedendo facilmente ao esmagamento, dispensando pré-tratamentos e oferecendo boas preparações citológicas.

A análise estatística, realizada para se garantir coleta de endospermas com maior atividade mitótica, revelou (a) não haver diferenças significativas entre diferentes temperaturas de coleta; (b) que a maior atividade mitótica dos endospermas era mais acentuada naqueles endospermas pequenos (1 a 4 mm) e nas camadas periféricas deste tecido, independente do tamanho.

Os resultados obtidos pelo emprego das diferentes modificações das técnicas de bandamento C, G e NOR, revelaram que

as mesmas são suficientemente sensíveis na promoção de diferenciações ao longo dos cromossomos das duas espécies de café estudadas. O emprego de solução de tripsina diluída produziu bandas nos cromossomos, acertada a concentração, o mesmo não ocorreu com a uréia.

Uma análise comparativa dos esquemas de bandas-C, de bandas reveladas pelo uso de tripsina e bandas obtidas com a impregnação pela prata, mostrou haver coincidência entre alguns conjuntos de cromossomos homólogos bandados, tanto para *C. dewevrei* como para *C. racemosa*. Algumas similaridades também foram observadas entre alguns conjuntos de homólogos quando se comparou os esquemas de ideogramas das espécies *C. dewevrei* e *C. racemosa* pela mesma técnica de bandamento. Tais similaridades foram mais acentuadas através do bandamento G, seguido pelo bandamento C e terminado com a impregnação pela prata.

Verificou-se também uma assimetria lateral nos cromossomos bandados por modificação da técnica NOR, a que foi atribuída a diferentes causas.

Os resultados sugerem que a solução de Giemsa apenas parece ser suficiente como corante para evidenciar a diferenciação nos cromossomos.

Há necessidade de se efetuar novos testes para o tempo de hidrólise clorídrica, da reação de Feulgen, para se obter uma coloração satisfatória.

I. INTRODUÇÃO

As espécies que compõem o gênero *Coffea* L. foram estudadas principalmente, do ponto de vista da morfologia dos caracteres externos associados à distribuição geográfica e à peculiaridade do hábito.

Embora a taxonomia do gênero necessite de uma revisão atualizada, estudos concernentes a tais espécies ou a populações das mesmas no local de origem são difíceis, pois o perfil da vegetação atual está alterado não correspondendo mais ao local de ocorrência de algumas espécies descritas.

Apesar disso, pesquisas vêm sendo feitas cujos resultados visam um reagrupamento melhor e mais natural entre as espécies de café.

Os dados obtidos a partir dos cruzamentos interespecíficos, da bioquímica (flavonóides, isoenzimas e outros compostos orgânicos), da palinologia, da anatomia, da citologia molecular (DNA de cloroplastos e de mitocôndria), da análise de cromossomos mitóticos e meióticos nas espécies e nos híbridos interespecíficos, estão até o momento restritos a espécies mais relacionadas a *C. arabica* ou pertencentes à mesma seção (*Eucoffea*) e, menos intensamente aos cafeeiros sem cafeína da seção *Mascarocoffea*.

Dentre as quase 80 espécies descritas, algumas têm recebido maior atenção por parte dos pesquisadores. Muita ênfase se tem dado aos estudos de afinidades entre as espécies *C. canephora*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides* e *C. liberica* com a espécie

C. arabica, de grande interesse comercial, e portanto, alvo dos programas de melhoramento genético e de estudos de filogenia.

A citologia nas espécies do gênero, a despeito das contribuições que vem recebendo desde o início do século vinte, se detém no problema da identificação e reconhecimento dos cromossomos.

O emprego de técnicas usuais de coloração de cromossomos mitóticos metafásicos não é suficientemente esclarecedor a ponto de fornecer dados para a caracterização individual dos cromossomos dentro do genoma de uma espécie ou entre genomas do gênero. Não há, até a presente data, um cariótipo elaborado para as espécies de café, a despeito dos esforços nas pesquisas citológicas.

As técnicas de bandamento cromossômico, inicialmente desenvolvidas em animais e já muito empregadas em monocotiledôneas e em algumas poucas dicotiledôneas, têm se revelado eficientes em muitos casos na identificação, caracterização e elaboração de cariótipos que levam inclusive ao reconhecimento de relações de afinidades interespecíficas.

Desta forma, neste trabalho, algumas técnicas de bandamento cromossômico foram empregadas em *C. dewevrei* raça *excelsa* e *C. racemosa* objetivando: 1) saber se essas técnicas são suficientemente sensíveis a ponto de promoverem diferenciação ao longo de cromossomos pequenos como os das espécies de café; 2) a verificação de sua validade e possibilidade na identificação dos cromossomos destas duas espécies; 3) o estabelecimento de um cariótipo, se possível, para cada espécie; 4) verificação da existência de prováveis relações de afinidades entre estas duas espê-

cies para, mais tarde, estender às demais espécies do gênero.

A escolha das espécies de *C. dewevrei* e *C. racemosa* foi baseada principalmente, na morfologia externa bastante diferenciada das mesmas e no hábito e distribuição geográfica distintos para cada uma delas. Espera-se, portanto, com mais chance, encontrar diferenças não só a nível de comprimento cromossômico como também em número e posição das bandas.

Em trabalhos de bandamento de cromossomos de vegetais, normalmente são utilizadas as pontas das raízes que são mitoticamente ativas, necessitando entretanto, de pré-tratamentos.

Neste trabalho porém, o tecido escolhido foi o endosperma jovem que é triplóide ($3n=33$). Como já demonstrado por MEDINA (1964 e 1965), este tecido não necessita de pré-tratamentos especiais para a decomposição da parede celular. Conforme o estágio do desenvolvimento, o endosperma é extremamente mole, de fácil separação celular, muito ativo mitoticamente, sendo que, mesmo na metáfase, os cromossomos se apresentam separados uns dos outros, o que facilita a sua contagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TAXONOMIA DE *Coffea* L.

A distribuição das quase 80 espécies de *Coffea* (Rubiaceae) consideradas como válidas, de acordo com dados compilados de CHEVALIER (1947), LEROY (1961; 1962a; 1962b; 1962c; 1967a e 1972) e PORTÈRES (1962), está restrita ao continente africano, ilhas de Madagascar e Mascarenhas, sul e sudoeste tropical da Ásia (SYBENGA, 1960; WELLMAN, 1961; CARVALHO, *et al.*, 1969; CHINNAPPA, 1981).

Os trabalhos taxonômicos e os primeiros estudos sobre o café datam do século XVI, com Rauwolf, e vêm prosseguindo até o presente. Durante este período, o café já foi comparado a um *Euonymus* por Alpinus, também classificado como *Zanthoxylum bu-drunga* por Clusius e como *Jasminum arabicum*, por Jussieu (LINNAEUS, 1762; CHEVALIER, 1929; TAUNAY, 1939; CARVALHO, 1946).

Coube, no entanto, a LINNAEUS (1762) a descrição do gênero *Coffea*, sendo que a primeira espécie descrita foi *Coffea arabica*, na sua obra "Species Plantarum". Após esta publicação, diversas outras se seguiram. A segunda espécie a ser descrita foi *C. mauritiana*, por Lamarck, em 1783 (apud CARVALHO, 1946). O número de espécies descritas ou citadas passou a ser muito variável. Loureiro (1790, apud CHEVALIER, 1929) descreveu as espécies *C. zanguebarie* e *C. racemosa*. DE CANDOLLE (1830) citou 35 espécies para o gênero, BENTHAM & HOOKER (1873) diminuíram este número para 20 espécies, LECOMTE (1899) considerou cerca de 28 espécies e, até o início do século vinte, segundo CHINNAPPA (1981),

aproximadamente 190 espécies de café haviam sido descritas. HOUK (1939), compilando dados publicados no Index Kewensis até 1930 anotou como válidas 120 espécies.

A classificação taxonômica básica, ora vigente, se deve a CHEVALIER (1947), que efetuou uma revisão no gênero, tendo estudado as espécies no próprio local de origem. Posteriormente, KRUG & CARVALHO (1951) em uma revisão sobre a genética e o melhoramento de *Coffea*, chamaram a atenção para o fato de não existir tanto na América, Austrália e nem tampouco na Polinésia representantes do gênero *Coffea* ou dos gêneros próximos, *Psilanthus* e *Psilanthopsis*.

Algumas modificações, no entanto, já foram propostas tanto a nível de espécies quanto de gênero.

CARVALHO & MÔNACO (1959) retornaram a espécie *Psilanthopsis kapakata* (Hirsch) Chev. para *Coffea kapakata* Hirsch., com base em dados de cruzamentos daquela planta com algumas espécies de café.

LEROY (1967a e 1967b) elevou as espécies do gênero *Coffea*, seção *Paracoffea* Miq., para o gênero *Paracoffea* (Miq.) Leroy, mudando o conceito do gênero. Para LEROY (1967c), as diferenças básicas entre os gêneros *Coffea* e *Paracoffea* estariam no tipo de meristema, de inflorescência, na condição do epicálise e das folhas. Esta proposição de um novo "status" para a seção *Paracoffea* ainda é controvertida e assunto de muitas pesquisas palinológicas e quimiotaxonômicas, não estando definitivamente aceita pela maioria dos pesquisadores de café.

SYBENGA (1960) afirma que a taxonomia do gênero é complicada, existindo inclusive idéias conflitantes.

Segundo COSTE (1968), a complexidade e a confusão existentes dentro da taxonomia do gênero *Coffea* é, em parte, devido a criação de novos híbridos, do surgimento de mutantes naturais e de novas cultivares oriundas da cafeicultura, como também das perturbações causadas no habitat das espécies.

CHARRIER (1977 e 1978) considera a capacidade de adaptação dos cafeeiros espontâneos como a causa dessa riqueza taxonômica que se manifesta na diversidade notável de tipos morfológicos e fisiológicos que são freqüentemente elevados à categoria de espécies.

O gênero *Coffea* L. "sensu strictu" compreenderia, de acordo com CHARRIER (1978), os cafês espontâneos da África, agrupados na seção *Eucoffea* K. Schum. e os cafês que ocorrem nas ilhas próximas ao continente africano, porém banhadas pelo Oceano Índico, caracterizados pela ausência de cafeína e, agrupados na seção *Mascarocoffea* Chev. As seções *Argocoffea* Pierre e *Paracoffea* Miq. "sensu" CHEVALIER (1947) foram consideradas como gêneros respectivamente por LEBRUN (1941) primeiramente, e por LEROY (1967a).

Além da morfologia dos caracteres externos e da distribuição das espécies, outros dados também têm sido utilizados com a finalidade de melhor conhecimento e classificação das espécies.

CHINNAPPA & ADAMS (1974) e CHINNAPPA (1981) vêm utilizando a morfologia do grão de pólen como um caráter taxonômico na elucidação da posição dos taxons dentro do gênero. Alguns dados obtidos confirmam, por exemplo, a distinção dos gêneros *Paracoffea* (Miq.) Leroy e *Coffea* L. Outros dados ainda sugerem a reclassificação de algumas espécies a nível de seções para o gê-

nero *Coffea*.

Associado à morfologia do grão de pólen, CHINNAPPA & WARNER (1982) desenvolveram estudos relacionando as características da epiderme da folha com a presença e a forma das domácias foliares. Observaram similaridades entre *C. arabica* L., *C. eugenioides* Moore e *C. salvatrix* Swynn et Phil.

Estudos quimiotaxonômicos dentro de algumas espécies do gênero *Coffea* também vêm sendo feitos, com uma preocupação mais filogenética e de afinidades interespecíficas. LONGO (1972) e LOPES & MÔNACO (1979) observaram através do estudo de pigmentos flavonóides grande afinidade entre as espécies *C. dewevrei* De Wild. et Th. Dur. e *C. liberica* Bull. ex Hiern.

RAM et al. (1982), aplicando outros testes bioquímicos como a presença de flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, leuco-antocianinas, concluíram que *C. eugenioides*, *C. kapakata* e *C. racemosa* estavam proximamente relacionadas.

Recentemente, LOPES et al. (1985) estudaram o padrão de algumas isoenzimas de espécies de café, por meio de eletroforese em gel de amido. Observaram alta afinidade entre *C. eugenioides* e *C. salvatrix*, entre *C. canephora* e *C. congensis*, entre *C. arabica* com estas duas últimas espécies e com *C. liberica*. De acordo com esses autores, *C. canephora*, *C. congensis* ou *C. liberica*, juntamente com *C. eugenioides*, teria entrado na formação do alotetraplóide *C. arabica*, ou então, as três primeiras espécies teriam vindo de um ancestral comum que, por cruzamento com *C. eugenioides*, originou *C. arabica*.

RAM (1983), empregando testes bioquímicos nos estudos de diversas espécies de café, observou que os dados concordavam

com a divisão das mesmas em dois principais gêneros *Coffea* e *Paracoffea*.

Além desses dados quimiotaxonômicos, BERTHOU *et al.* (1980) e BERTHOU *et al.* (1983) têm empregado a variação do DNA mitocondrial e de cloroplastos como um indicador de relação filogenética entre as espécies do gênero *Coffea*. Concluíram que *Coffea* e *Paracoffea* são gêneros bem distintos.

As espécies *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. e *C. racemosa* Lour., utilizadas no presente trabalho, estão classificadas dentro da seção *Eucoffea* a qual congrega espécies de interesse econômico. Pertencem respectivamente às subseções *Pachycoffea* e *Mozambicoffea*, de acordo com a classificação de CHEVALIER (1947).

A sub-seção *Pachycoffea* compreende o grupo dos cafeeiros libérica e excelsa, caracterizados pelo porte arbustivo ou arbóreo de pequeno porte, dotados de folhas comumente persistentes, grandes e coriáceas. O tipo da sub-seção é *C. libérica*.

A sub-seção *Mozambicoffea* caracteriza-se por ser o grupo dos cafeeiros de Moçambique. Encerram-se nesta seção os cafés arbustivos de folhas caducas, pequenas e com células pétreas no limbo, apresentando fruto ovóide com sementes pequenas, em relação às sementes do grupo anterior. Caracterizam-se por serem praticamente destituídas de cafeína, segundo dados de CARVALHO (1946).

Em 1790, Loureiro descreveu *C. racemosa*, originária de Moçambique (CARVALHO, 1946; CHEVALIER, 1947). A mesma espécie foi posteriormente, descrita como *C. libo* Froehner e como *C. swynnertonii* Moore. CHEVALIER (1947), reexaminando os materiais, reu

niu-as numa única espécie, *C. racemosa*, embora em trabalho anterior (CHEVALIER, 1929) tivesse excluído esta espécie, por não considerá-la válida.

C. dewevrei foi inicialmente descrita por De Wildeman e Durand, em 1899 (CARVALHO, 1946). Mais tarde, em 1903, Chevalier descreveu a espécie *C. excelsa*, denominada cafeeiro Chari ou café Senoussi (BERTHAUD & GUILLAUMET, 1978). Foi o próprio CHEVALIER (1947) que posteriormente reclassificou esta espécie como uma raça de *C. dewevrei*.

Segundo dados de morfologia dessas espécies compilados dos trabalhos de CHEVALIER (1929 e 1947); THOMAS (1944); CARVALHO (1946); HAARER (1958); HALLÉ & FARIA (1973); BRIDSON (1982) e CHINNAPPA & WARNER (1982) *C. dewevrei* raça *excelsa* e *C. racemosa* podem ser consideradas basicamente pelos seguintes caracteres:

C. dewevrei De Wild. et Th. Dur. raça *excelsa* Chev.
(Iconog. Pl. 5 et 6):

Planta de porte arbóreo de 6 a 15 m de altura, com folhas pecioladas persistentes, ovado-lanceoladas, coriáceas, 18 a 28 cm de comprimento e com 9 a 12 cm de largura, glabras, com base arredondada e ápice acuminado, domácias ausentes. Flores reunidas em cimos internodais, corola tubular, branca ou rósea, com 5 a 6 lobos que são persistentes durante alguns dias mesmo depois de murchas. Estames em número igual aos lobos da corola, alternos aos lobos, exsertos. Estilete persistente após a queda

da corola por alguns dias. Fruto ovóide, de cor vermelha quando maduro, pedicelado. Endosperma de cor cera.

A raça, *excelsa*, de *C. dewevrei* foi descrita como tendo sua ocorrência nas florestas da bacia do rio Chari no Tchade, no sudoeste de Camarões, na bacia do rio Ubangui da República Centro Africana e na parte seca de algumas florestas de galeria, na região leste de Uganda (CHEVALIER, 1929 e 1947; THOMAS, 1944).

Floresce praticamente o ano todo e seus frutos têm desenvolvimento lento (CHEVALIER, 1947; HAARER, 1958).

Estudos sobre a possibilidade de aproveitamento de *C. dewevrei* raça *excelsa* (café *excelsa*) como bebida vêm sendo feitos por CARVALHO *et al.* (1982).

C. racemosa Lour. (Chev. Iconog. Pl. 61, 62, 63, 64):

Arbustos de 2 a 4 m de altura, com folhas pecioladas, caducas na época da floração, ovais-lanceoladas, coriáceas-cartáceas, com 1 a 5 cm de comprimento e com 1 a 2,5 cm de largura, glabras, com base cuneiforme e ápice obtuso ou agudo. Flores axilares isoladas ou reunidas em ráceros de 2 a 4 flores, corola hipocrateriforme, branca ou rósea, com 5 a 9 lobos. Estames exsertos e de igual número que os lobos da corola e alternos à mesma. Fruto ovado-oblongo ou subgloboso, com disco visível e de cor preta quando maduro.

Esta espécie ocorre no litoral de Moçambique, ocupando áreas de savanas semi-áridas (CHEVALIER, 1947), florestas flu-

viais e costais (BRIDSON, 1982). Recentemente, BRIDSON (1982) an tou a ocorrência de *C. racemosa* no interior sul de Moçambique, em Zimbabwe e no Norte da África do Sul, em Natal.

Seu florescimento é anual, dando-se entre os meses de setembro a outubro, com o desenvolvimento muito rápido de seus frutos (CHEVALIER, 1947 e BRIDSON, 1982).

Segundo BRIDSON (1982) esta espécie é muito polimórfica, especialmente com relação à forma, tamanho e número de lobos da corola. Suas folhas variam muito quanto à textura e tipo de domácias.

Por ser uma planta muito resistente a longos períodos de estiagem e ao ataque do bicho mineiro, vem sendo pesquisada pelos técnicos da seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas como fonte de genes no melhoramento do cafeeiro.

Essas duas espécies, *C. dewevrei* raça *excelsa* e *C. racemosa*, como observado pela descrição acima, são bastante distintas morfológicamente, inclusive quanto ao caráter xerofítico peculiar de *C. racemosa*.

Possuem uma distribuição geográfica particular dentro do continente africano, sendo, portanto, alopátricas e ocupando habitats nitidamente diferentes.

2.2. CITOLOGIA EM *Coffea* L.

Os estudos citológicos dentro do gênero *Coffea* vêm sendo realizados desde os primórdios deste século e visam atualmente o estabelecimento do cariótipo e, portanto, o reconhecimento de cada cromossomo dentro do genoma, tanto para o gênero como para as espécies individualmente, com a finalidade de se estabelecer prováveis relações de afinidades interespecíficas.

Diversos estudos foram desenvolvidos na tentativa de melhor conhecimento das afinidades entre as espécies, mormente com referência a origem de *C. arabica*, a única espécie tetraplóide do gênero e de interesse econômico.

As pesquisas foram realizadas tanto na meiose quanto na mitose de algumas espécies de café, sendo que na mitose utilizaram-se não só as pontas de raízes, como também embriões e endospermas jovens.

O primeiro trabalho citológico estabelecendo a primeira contagem de cromossomos, em café, foi conduzido por FABER (1912) que observou a megasporogênese e a microsporogênese nas espécies *C. arabica* L., *C. laurentii* De Wild. [hoje, *C. canephora* Pierre var. *laurentii* (De Wild) Chev.] e *C. liberica* Bull ex Hiern. Encontrou para a primeira e para a última espécie acima citadas um conjunto diplóide igual a 16 cromossomos, variando em alguns casos para 12 cromossomos, em *C. arabica*. Embora seja dada pouca ênfase, FABER, em 1910, em seu trabalho sobre a reprodução de *C. liberica*, realizou uma análise citológica nos óvulos, determinando a taxa de fecundação dos mesmos. Poder-se-ia dizer então, que este trabalho se constitui na primeira tentativa de

estudos citológicos dentro do gênero.

PIZA (1929), estudando a mitose em ponta de raiz nas variedades *bourbon* e *nacional* (hoje, *C. arabica* var. *arabica* L.) de *C. arabica*, concluiu apenas que os cromossomos eram muito pequenos, numerosos e de formação variável na placa equatorial metafásica.

HOMEYER (1933) estabeleceu nova contagem de cromossomos para *C. arabica* e *C. semi-exserta* Colebr., $2n=22$, discordando, portanto, dos resultados de FABER (1912). Concluiu também que o número básico de cromossomos para alguns gêneros e espécies de Rubiaceae, por ele analisados, era $x=11$.

Este número básico foi mais tarde confirmado por KRUG (1934), em café, que estudou as variedades *bourbon*, *nacional*, *laurina* e *maragogipe* e a cultivar amarelo de Botucatu da espécie de *C. arabica*; *C. robusta* Linden [hoje, *C. canephora* var. *robusta* (Linden) Chev.], *C. excelsa* Chev. (hoje, *C. dewevrei* raça *excelsa* Chev.) e *C. congensis* Froehner. Todas as variedades do café Arábica mostraram possuir $2n=44$ cromossomos e, portanto, tetraplóides, enquanto que as outras três espécies estudadas eram diplóides e com $2n=22$ cromossomos. Continuando seus estudos citológicos dentro do gênero, KRUG (1936) confirmou novamente este número básico ($x=11$) para mais quatro outras espécies diplóides, *C. abeokutae* Cramer, *C. dybowskii* Pierre ex De Wild (*C. dewevrei* raça *dybowskii* Pierre), *C. dewevrei* raça *dewevrei* De Wild e *C. ugandae* Cramer [hoje, *C. canephora* var. *ugandae* (Cramer) Chev.]. Para as variedades *angustifolia*, *mokka*, *monosperma*, *polysperma* e para as cultivares *erecta*, *murta*, *goiaba* e *purpurascens* de *C. arabica*, KRUG (1936) encontrou 44 cromossomos.

Neste mesmo ano, HEYN (1936) publicou uma lista de espécies de *Coffea* cujo número diplóide de cromossomos encontrado era igual ao proposto por KRUG (1934 e 1936) $2n=22$, excetuando-se *C. liberica*, onde o autor contou $2n=44$ cromossomos.

MENDES (1938a) encontrou $2n=22$ para *C. liberica* sugerindo que o espécimen contado por HEYN (1936) de *C. liberica* fosse talvez um tetraplóide natural. Essa determinação cromossômica de MENDES (1938a) foi confirmada pelas pesquisas de BOUHARMONT (1959) e MEDINA *et al.* (1974).

Algumas das variedades ou mesmo progênes das variedades de *C. arabica* podem mostrar variações cromossômicas numéricas que vão de $2n=22$ a $2n=88$ cromossomos, como observado por KRUG (1937 e 1945). Além dessas variações euplóides, casos de ocorrência de aneuplóides em progênes da cultivar Mundo Novo de *C. arabica* já foram observados e estudados sob o ponto de vista morfológico e citológico por CRUZ (1972), a qual constatou grande número de plantas na condição de monossomia. Devido às discrepâncias constatadas entre o agrupamento morfológico das plantas estudadas e o citológico, a autora concluiu ser difícil a associação entre a morfologia da planta com a falta ou excesso de cromossomos. A análise citológica desses aneuplóides evidenciou também a ocorrência de citomixia e fragmentação de cromossomos.

Posteriormente, CHINNAPPA (1974) constatou, em micrósporos de *C. arabica* a presença de cromossomos B, de mono-, tri- e tetravalentes e pontes cromatínicas. Esta é, provavelmente, a única referência, na literatura, sobre a ocorrência de cromossomos B em café até o momento.

Embora haja algumas outras referências para o número

cromossômico $2n=44$ para algumas espécies de café, além de *C. liberica* (FAGERLIND, 1937), como *C. abeokutae* (HEYN, 1936), *C. congensis* (FAGERLIND, 1937) e *C. stenophylla* (LEBRUN, 1941), pesquisas desenvolvidas na seção de Citologia do Instituto Agrônomo de Campinas, demonstraram dados diferentes, onde tais espécies, mantidas em coleção viva, sempre se revelaram diplóides, $2n=22$ (MENDES, 1938a; MEDINA & RIJO, 1969; MEDINA *et al.*, 1974).

A primeira tentativa de identificação individual dos cromossomos no gênero foi feita por KRUG (1934) e seguida por MENDES (1938b). Os dados obtidos por estes autores sobre a morfologia dos cromossomos de *C. excelsa* Chev. (hoje, *C. dewevrei* raça *excelsa* Chev.), além da posição do centrômero e do comprimento dos mesmos, revelou as limitações dos cortes seriados em parafina para o reconhecimento e a caracterização suficientes dos cromossomos na elaboração do cariótipo neste gênero. KRUG (1934), por exemplo, chegou a dividir os cromossomos em classes segundo o intervalo de variação do comprimento de cada cromossomo. Admitiu, entretanto, que somente os três primeiros eram facilmente distinguíveis morfológicamente e os oito restantes muito dificilmente se diferenciavam uns dos outros.

BOUHARMONT (1959), analisando os cromossomos somáticos de algumas espécies de *Coffea*, concluir que os mesmos tinham um alto grau de similaridades morfológicas quando vistos ao microscópio óptico comum. Além de terem um comprimento reduzido, que variava muito pouco de espécie para espécie, era difícil identificá-los individualmente dentro e entre genomas.

Diversos autores como KRUG (1934), MENDES (1938b), KRUG & MENDES (1943 e 1944) e posteriormente SYBENGA (1960 e 1963), LE

ROY & PLU (1966) e LOUARN (1972) já haviam chegado a conclusões semelhantes a essas.

LOUARN (1972) publicou uma lista com novas contagens para as espécies da seção *Mascarocoííea*, confirmando $2n=22$ cromossomos, porém não se preocupou com a caracterização e com a medida dos mesmos.

MEDINA *et al.* (1977) também observaram nas espécies *C. eugenioídes* Moore, *C. kapakata* Hirsch, *C. liberica* Bull ex Hiern e *C. racemosa* Lour., uma certa uniformidade morfológica nos genomas dessas espécies na microsporogênese, o mesmo acontecendo nas espécies *C. stenophylla* G. Don. e *C. salvatrix* Swynn. et Phil. (MEDINA & RIJO, 1969).

Recentemente, MAGLIO (1983), estudando a morfologia dos cromossomos meióticos em fase de paquíteno em algumas espécies de *Coffea*, concluiu que as espécies diplóides *C. racemosa* e *C. salvatrix*, ambas da sub-seção *Mozambicoííea*, possuíam 2 cromossomos nucleolares, ao contrário de um, como era de se esperar. Esta condição aliada à distribuição geográfica e outras características comuns entre essas duas espécies, segundo a autora, poderia indicar provavelmente maior proximidade filogenética entre ambas, em contraposição ao parecer de RAM *et al.* (1982), com base em dados quimiotaxonômicos. Pôde observar também através da morfologia dos cromossomos nucleolares, algumas similaridades entre *C. eugenioídes* e *C. dewevrei* com *C. arabica*, o que, no que concerne à *C. eugenioídes* e *C. arabica*, concorda com os dados de LONGO (1972); BERTHOU & TROUSLOT (1977); CHINNAPPA & WARNER (1982) e BERTHOU *et al.* (1983). Foi observado também pela autora afinidade entre *C. canephora* e *C. congensis*, *C. eugenioídes* e *C. dewevrei*.

Os cromossomos de *C. dewevrei* raça *excelsa*, contados primeiramente por KRUG (1934), tiveram uma classificação baseada na posição do centrômero e no comprimento dos cromossomos. Essa mesma linha de classificação foi posteriormente seguida por BOUHARMONT (1959) no estudo citológico de diversas espécies.

SILVA (1956), SYBENGA (1963) e MEDINA *et al.* (1977) confirmaram o número $x=11$ para *C. racemosa*.

Tanto *C. dewevrei* como *C. racemosa* pertencem ao grupo de espécies diplóides com autoincompatibilidade, algumas destas com autoincompatibilidade gametofítica, incluindo entre elas as espécies *C. canephora* var. *robusta* (Linden) Chev., *C. congensis* Froehner, *C. eugenioides* Moore, *C. kapakata* Hirsch., *C. salvatrix* Swynn. et Phil e *C. stenophylla* G. Don. (FERWERDA, 1936; MEDINA & CONAGIN, 1959; CONAGIN & MENDES, 1961 e MÔNACO & CARVALHO, 1972).

Excetuando-se *C. bengalensis* (atualmente *P. bengalensis*) e *C. brevipes* que são diplóides e supostamente autógamas e auto compatíveis (CHARRIER, 1978) a única espécie conhecida até o momento como tetraplóide ($4n=44$ cromossomos) é *C. arabica* e que é também autocompatível (CARVALHO *et al.*, 1969).

Estudos genéticos e citogenéticos de híbridos entre algumas espécies de café foram realizados com a finalidade de se obter maior conhecimento sobre cada espécie e as possíveis relações de parentesco entre espécies da mesma seção ou de seções diferentes. Desta forma, MÔNACO & CARVALHO (1967) observaram, dentro da seção *Eucoffea*, que as espécies pertencentes a uma mesma sub-seção se cruzavam, no geral, mais facilmente. Com base nos dados de cruzamentos entre espécies de sub-seções diferentes, no

taram que a subseção *Melancoffea* estava mais próxima à seção *Pachycoffea* do que a seção *Erythrocoffea*.

Complementando estes dados, MEDINA (1972) analisou o comportamento meiótico de alguns desses híbridos, encontrando um gradiente de homologia cromossômica, sendo a mais baixa verificada no híbrido entre *C. congensis* e *C. eugenioides* (10 monovalentes) e a mais alta verificada no híbrido entre *C. dewevrei* e *C. liberica*, o qual não apresentou monovalentes. O pareamento cromossômico, neste caso, porém, não se constituiu num bom parâmetro para a análise de relações de afinidades interespecíficas, devido ao alto grau de homologia dos mesmos.

Observações opostas às de MEDINA (1972), concernente a afinidade entre *C. dewevrei* e *C. liberica*, foram de fato realizadas por BERTHOU *et al.* (1982) e BERTHOU *et al.* (1983), através da análise de DNA de cloroplastos e de DNA mitocondrial e, por MAGLIO (1983), através da análise dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno.

Além dos estudos de híbridos e espécies da seção *Eucoffea*, a seção *Mascaroccoffea* também foi investigada por CHARRIER (1975, 1977 e 1978). Este autor observou que o cruzamento entre espécies de *Mascaroccoffea* se dava facilmente e seus híbridos eram férteis. Os cruzamentos entre espécies das seções *Mascaroccoffea* e *Eucoffea* produziam poucos híbridos que eram fracos e quase estéreis. As observações no comportamento meiótico destes híbridos revelaram haver uma diferenciação a nível cromossômico entre os genomas desses dois taxons.

Segundo LOUARN (1972) a quase homogeneidade do número dos cromossomos sugere que a diferenciação das espécies do gêne-

ro *Coffea* ocorreu sobretudo em base de variações qualitativas sucessivas a partir de um genoma básico.

DEMARLY (1975) e CHARRIER (1978) propuseram um esquema evolutivo do gênero *Coffea* a partir de um centro de diversificação africano com os cafês diplóides alógamos, cujas fronteiras estariam entre o Quênia, a República Centro Africana, o Sudão, a Uganda e a Ruanda. De acordo com estes autores, sub-grupos teriam se formado e colonizado diferentes regiões. Três são os principais, o sub-grupo dos cafês Líbero-excelsóides e Caneforóides, o sub-grupo de *C. eugenioídes* e *C. racemosa* e dos cafês *Mascaro-coffee* e o sub-grupo de *C. arabica*, o único tetraplóide.

A despeito da maioria das espécies diplóides do gênero *Coffea* ocorrer ao longo de uma extensa área da África intertropical, havendo inclusive sobreposição de populações das espécies (simpatria), mecanismos eficientes de isolamento de natureza ecológica, biológica e fisiológica, devem ter se desenvolvido com a finalidade de preservar as espécies como unidades distintas, uma vez que a alogamia é condição essencial na reprodução das mesmas. Esses mecanismos podem, entretanto, não serem efetivos nas espécies em estado de cultura (BERTHAUD & GUILLAUMET, 1978).

2.3. FORMAÇÃO DO ENDOSPERMA EM CAFÉ

A ocorrência, formação e crescimento do endosperma nos frutos de café foi descrita por alguns autores como FABER (1912), LELIVELD (1938), MENDES (1941), MENDES *et al.* (1954) e MEDINA (1960).

O endosperma em café, como em outras angiospermas tem sua origem dependente da formação do saco embrionário. Segundo os autores acima mencionados, três dos quatro megásporos resultantes da divisão do megasporócito degeneram-se. O megásporo remanescente, por divisões, dá origem a oito células que compõem o saco embrionário (duas sinérgides, uma célula ovo, duas polares e três antípodas). Nesta fase ocorre o fenômeno da dupla fertilização onde o núcleo reprodutivo do grão de pólen se funde ao do óvulo, formando o zigoto, enquanto que o núcleo germinativo do grão de pólen se funde aos dois núcleos polares do saco embrionário, dando origem ao endosperma que é, conseqüentemente triplóide ($3n$).

Durante as primeiras divisões o endosperma é nuclear, passando posteriormente para a condição de celular. Este período onde o endosperma é nuclear é muito variável, dependendo da planta de café e também o número de núcleos existentes é diferente conforme a espécie estudada. Segundo LELIVELD (1938), endospermas de café com 32 núcleos já são celulares. MENDES (1941) observou que endospermas de *C. arabica* com 45 dias após a abertura da flor apresentavam 8 células, enquanto que MEDINA (1960) observou até 20 núcleos livres em endospermas de *C. dewevrei* com 107 dias após a abertura da flor.

Durante algum tempo, entretanto, o endosperma nas sementes de café foi um assunto controvertido.

A ocorrência deste tecido nesta planta foi registrada por FABER (1912), que estudou botões florais das espécies *C. arabica*, *C. laurentii* (hoje, *C. canephora* var. *laurentii*) e *C. liberica* no que concerne a formação do saco embrionário e a fecundação.

HOUK (1938), entretanto, considerou o tecido observado durante o desenvolvimento da semente e que ocorria ao redor do embrião como sendo perisperma, um tecido de origem materna e que nada mais era senão o nucelo. Para este autor o endosperma era um tecido evanescente, degenerando-se na fase de quatro a oito células.

LELIVELD (1938) analisando a formação dos frutos de algumas espécies de café, demonstrou que o endosperma não desaparecia como sugerido por HOUK (1938) mas que se desenvolvia, ocupando quase todo o volume da semente madura.

A prova genética do tecido que envolve o embrião na semente madura ser o endosperma, em café, foi dada por KRUG & CARVALHO (1939). Esses autores utilizaram o mutante cera (ce) de *C. arabica*, em cruzamentos direcionados entre espécimens mutantes e normais desta espécie. Esse mutante é caracterizado pela cor amarela das sementes, sendo também recessivo. Cruzamentos realizados em plantas mutantes recessivas com pólen de indivíduos normais resultaram na formação de frutos com sementes verdes. A cor dessas sementes híbridas não se distinguia das sementes verdes puras. Polinizações de plantas cera de *C. arabica* com pólen de *C. excelsa* (hoje, *C. dewevrei* raça *excelsa*) e *C. liberica*, as quais também possuíam o caráter amarelo na cor da semente, resultaram na formação de frutos híbridos de cor amarela, demonstrando desta forma que o tecido que preenchia a semente era o endosperma.

MENDES (1941), trabalhando com as variedades *typica* e *semperflorens* de *C. arabica* constatou que o tecido perisperma observado por HOUK (1938) ia sendo reduzido à medida que o endosperma se desenvolvia, permanecendo no fruto maduro apenas na for

ma de uma película que envolvia o endosperma e denominada por película prateada.

LELIVELD (1938) observou que as células dos endospermas jovens e imaturos eram ricas em óleo e, a medida que este tecido envelhecia, este óleo desaparecia das células centrais, enquanto que as periféricas o conservavam.

Além de óleo e água, outros componentes como proteínas, cafeína, cofearina, açúcares, celulose, ácidos e minerais fazem parte da constituição química do endosperma (DEDECCA, 1957 e 1958). À medida que o endosperma aumenta de volume, há um processo de depósito de amido (MEDINA, 1960).

AYRES (1954) observou, através de cortes seriados em endospermas de frutos maduros de *C. arabica* var. *typica* (hoje, *C. arabica* var. *arabica*) que, além da rigidez peculiar deste tecido quando maduro, as células possuíam paredes celulares muito espessas, de natureza celulósica e com numerosos e visíveis campos de pontuações primárias, apresentando plasmodesmas delgados. Essa natureza celulósica e espessa das paredes celulares do endosperma de frutos maduros de café foi também observada por DEDECCA (1957).

O uso inicial de endospermas jovens de frutos imaturos de café como material para preparações citológicas foi feito por MEDINA (1964 e 1965) que mostrou a viabilidade da utilização deste tecido para estudos cromossômicos.

2.4. HETEROCROMATINA E BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Os cromossomos metafásicos, tanto na meiose quanto na mitose, não oferecem muitas características que possam ser usadas para a identificação individual dentro do complemento.

Dados como comprimento cromossômico, relação de braços, posição de centrômero, ocorrência de constrição secundária e eventualmente localização da região organizadora do nucléolo e seu satélite, são dados valiosos, porém isoladamente ou mesmo em conjunto podem se tornar insuficientes para a elaboração de um cariótipo naqueles gêneros e espécies vegetais que possuem cromossomos muito semelhantes entre si e com comprimento pequeno, como acontece com as espécies do gênero *Coffea*.

É possível encontrar umas poucas espécies vegetais com um número diplóide baixo, nas quais todos os cromossomos são morfologicamente distintos, no que concerne a comprimento, posição do centrômero, relação de braços e ocorrência de constrição secundária.

Alguns exemplos podem ser citados como as espécies do gênero *Crepis* onde se pode observar, pelas colorações normais de carmin acético, diferenças morfológicas bem nítidas em seus cromossomos, não só dentro de algumas espécies como entre espécies tais como *C. capillaris*, *C. fuliginosa*, *C. sufreniana* ou *C. sibirica* (BABCOCK & CAMERON, 1934; STEBBINS, 1971) e *Ornithogalum virens*, uma liliácea, cujo número diplóide é de 6 cromossomos, nitidamente distintos, segundo observações de LIMA-DE-FARIA *et al.* (1959).

Outras espécies ou mesmo gêneros entretanto, possuem um complemento cromossômico muito uniforme, não sendo possível a identificação e caracterização individual de cromossomos, como acontece em algumas espécies dos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium* onde se pode observar uma forte simetria cromossômica em cada genoma e também cariótipos interespecíficos razoavelmente semelhantes (FORNI-MARTINS, 1984).

Durante décadas os citologistas se empenharam imaginando meios para a diferenciação longitudinal dos cromossomos e, provavelmente, um desses primeiros meios foi a distribuição e a ocorrência da heterocromatina (HSU, 1974).

No final do século XIX, os citologistas haviam observado em núcleos intercinéticos, tanto de células animais quanto de células vegetais, algumas estruturas muito peculiares, que se ordenavam na forma de grumos ou esferas compactas e que se mostravam intensamente coradas, quando submetidas às preparações citológicas. A estas estruturas, Heitz, em 1928 (apud BROWN, 1966 e HSU, 1974), denominou de heterocromatina. A este tipo de cromatina, que se mantém compacta no núcleo intercinético, denominou-se de heterocromatina, em contraposição à eucromatina que sofre um ciclo típico de condensação e descondensação durante o período de divisão celular (BROWN, 1966).

Esta característica da heterocromatina, de se manter condensada durante a intérfase, apresentando heteropicnose positiva, e portanto, distinta da eucromatina, é no entanto obscurecida quando se analisam os cromossomos na metáfase, corados pelas técnicas usuais do carmim acético ou da orceína acética, porque ambas, eu- e heterocromatina, estão condensadas nesta fase.

Em condições especiais, DARLINGTON & LA COUR (1940) obtiveram um tipo de diferenciação longitudinal em cromossomos metafásicos nas espécies de *Trillium* que foi induzida pela exposição do material por um período a baixa temperatura, seguida pela coloração de Feulgen. Os cromossomos, quando analisados ao microscópio óptico, se apresentavam com regiões específicas onde o diâmetro da cromátide era menor e a coloração nesta área, menos intensa. Este efeito passou a ser conhecido como "Cold induced starvation" e, no caso das espécies de *Trillium*, estes segmentos diferenciais obtidos pelo resfriamento, correspondiam aos segmentos heterocromáticos.

LEVAN (1946) aplicou este método em raízes de algumas espécies do gênero *Allium* e em *Dipcadi serotinum* L. obtendo resultados semelhantes aos de DARLINGTON & LA COUR (1940). Concluiu também que, de alguma maneira, as soluções fixadoras, a base de metais como o ouro e mercúrio contribuíram na diferenciação dos segmentos que ele identificou como heterocromáticos. Este tratamento e aquele empregado por DARLINGTON & LA COUR (1940) estariam revelando o mesmo tipo de classe de cromatina, isto é, a heterocromatina, embora desconhecesse o mecanismo que conduzia a esta diferenciação. Este método, no entanto se mostrou muito limitado, pois nem todas as plantas possuem segmentos heterocromáticos sensíveis ao tratamento a baixa temperatura (VOSA, 1975).

A demonstração pioneira de coloração seletiva e diferencial de cromossomos foi feita por CASPERSSON *et al.* (1968). Esses autores observaram que o emprego de agentes fluorescentes, como a quinacrina, em cromossomos metafásicos mitóticos de vegetais como *Trillium erectum* e *Vicia faba*, produziam uma certa luminescência constante em determinados segmentos cromossômicos, e

que tais segmentos correspondiam àqueles heterocromáticos obtidos pelo tratamento a frio de DARLINGTON & LA COUR (1940).

Embora as observações iniciais sobre a heterocromatina tenham sido em plantas como as hepáticas e musgos, sua definição bem como a sua ocorrência, em linhas gerais, foi confirmada para muitos organismos (YUNIS & YASMINEH, 1971).

BROWN, em seu trabalho sobre a heterocromatina, em 1966, distinguiu dois tipos: a constitutiva e a facultativa.

A heterocromatina constitutiva é um elemento permanente do genoma, ocorrendo ao longo de segmentos homólogos dos cromossomos ou envolvendo todo o cromossomo, como é o caso dos microcromossomos de *Coturnix coturnix japonica* (COMINGS & MATTOCCIA, 1970) e dos cromossomos B de algumas plantas (JONES, 1975). É encontrada formando blocos ao redor do centrômero, como nos cromossomos humanos (ARRIGHI & HSU, 1971) e, além do centrômero, em regiões intercalares dos braços dos cromossomos e nos telômeros em *Scilla* (VOSA, 1973b), em *Anemone* e *Hepatica nobilis* (MARKS & SCHWEIZER, 1974), *Secale cereale* (WEIMARCK, 1975), em algumas espécies de *Hordeum* (VOSA, 1976a), ou ocorrendo somente nas regiões intercalares, como nos cromossomos do gênero *Brimeura* (VOSA, 1979) ou ainda em várias posições ao longo dos cromossomos, como os "knobs" de milho e teosinte.

HSU (1975) propôs para a heterocromatina, principalmente à heterocromatina constitutiva a provável função de guarda-costa ("body-guard"). Este autor analisou, ao microscópio eletrônico, núcleos intercinéticos, nos quais a heterocromatina estava situada na periferia do núcleo, à semelhança de uma camada proeminente. Este fato, juntamente com os dados obtidos com o em

prego de mutagênicos, clastogênicos (agentes capazes de induzirem mudanças cromossômicas estruturais) e de solução hipotônica, levaram HSU (1975) à hipótese de que a heterocromatina funcionaria como uma camada de proteção ou um amortecedor de danos, para a eucromatina.

A heterocromatina facultativa estaria presente em apenas um dos homólogos sendo inativa, não respondendo a estímulos de transcrição (LYON, 1974; BACK, 1976), como em um dos cromossomos X nas fêmeas ou como o conjunto de cromossomos de origem paterna nos machos de *Planococcus citri*, ocorrendo durante o desenvolvimento. Embora inativa, a mesma já foi ativa geneticamente durante um período, sendo capaz de se tornar ativa novamente (BERLOWITZ, 1974).

Foi observado que a síntese de DNA nas heterocromatinas de animais e plantas superiores ocorre em diferentes estádios, quando se compara com aquelas da eucromatina (LIMA-DE-FARIA, 1959; MORISHIMA *et al.*, 1962; LIMA-DE-FARIA *et al.*, 1965).

LIMA-DE-FARIA (1959), usando processos autoradiográficos relatou que o DNA heterocromático do cromossomo sexual X do gafanhoto *Melanoplus differentialis* replicava fora de fase em relação ao DNA dos cromossomos restantes, ou seja, relativamente mais tarde ao período S. Posteriormente, LIMA-DE-FARIA & JAWORSKA (1968) publicaram uma lista com diversas espécies de vegetais, insetos e mamíferos onde o período de replicação do DNA da heterocromatina era posterior ao da eucromatina. Em contraposição, TATUNO *et al.* (1970) verificaram que em células do gametófito feminino da briófito *Pellia neesiana* a replicação do DNA heterocromático se dava antes da replicação do DNA eucromático, o mesmo

se dando no gametófito masculino de *Plagiochila ovalifolia* (MASU BUCHI, 1974).

BACK (1976), face às contradições do período de síntese de DNA na heterocromatina, propôs um reexame dos dados sobre a replicação precoce do DNA.

Juntamente com estas informações, verificou-se que há uma certa assincronia no tempo de replicação do DNA entre as heterocromatinas constitutiva e facultativa. Em cromossomos do pulgão *Planococcus obscurum* a heterocromatina constitutiva replicava o seu DNA antes da facultativa, embora este fato não seja uma regra, pois, em hamster chinês *Cricetulus griseus*, a replicação do DNA da heterocromatina facultativa se dá antes da constitutiva (HUANG, 1971) e em ouriços dos gêneros *Erinaceus* e *Aethechinus*, ambas replicavam ao mesmo tempo (NATARAJAN & GROOP, 1971).

A composição química da heterocromatina proposta por HERSKOWITZ (1961) seria a de maior número de bases repetitivas do tipo A-T ou G-C, em relação a eucromatina. Em pulgões coccídeos, *Planococcus citri*, nenhuma diferença a nível de bases de DNA foi encontrada tanto nos cromossomos das células femininas como nas células masculinas (LOEWUS *et al.*, 1964). Em *Drosophila* spp. os resultados são semelhantes, com o acréscimo de que não foi vista nenhuma associação entre o aparecimento de bases G-C com heterocromatina (BACK, 1976).

Os estudos iniciais conduzidos por CASPERSSON *et al.* (1968) demonstraram a afinidade da substância química quinacrina mostarda (QM) por determinadas regiões da cromatina as quais se tornavam luminescentes. O fato do composto apresentar propriedades alquilantes levou estes pesquisadores à suposição de ligação

preferencial entre o "corante" a sítios de guanina, e, portanto, evidenciar as regiões luminescentes com alto conteúdo de C-G. Esta opinião foi estendida a outros derivados próximos da quinacrina, como se depreende do trabalho efetuado por CASPERSSON *et al.* (1969a e b), sendo que as regiões fluorescentes coincidiam com aquelas heterocromáticas, principalmente nos cromossomos de *Trillium*, *Vicia faba* e *Scilla sibirica*.

Outros compostos no entanto, como o di-hidrocloreto de quinacrina e o hidrocloreto de quinacrina, mostraram ter esta mesma capacidade de produzir estruturas luminescentes em determinados segmentos dos cromossomos, embora os mesmos não possuíssem grupos alquilantes com especificidade para sítios de guanina (SCHNEDL, 1974).

ELLISON & BARR (1972), estudando os cromossomos de um drosofilídeo, *Samoaia leonensis*, tratados pela quinacrina, observaram que os segmentos luminescentes eram caracterizados por uma riqueza de conteúdo de bases do tipo A-T. Usando timidina tritiada, notaram uma grande incorporação deste nucleotídeo e consequente marcação dos cromossomos nestas regiões. O mesmo não acontecendo com a desoxicitidina, que se liga preferencialmente a regiões ricas em bases G-C. Demonstraram também que as regiões de intensa fluorescência correspondiam àquelas de replicação tardia do DNA e, portanto, heterocromáticas.

MODEST & SENGUPTA (1973) observaram também que certas aminoacridinas (quinacrinas e proflavinas) possuíam a capacidade de se ligar preferencialmente às bases A-T, produzindo luminescência nas regiões cromossômicas ricas em tais bases. O mesmo se deu com a acridina orange (RIEGLER, 1973), com o composto quími-

co Hoechst 33258 (COMINGS, 1978) e com o brometo de etídio (VOSA, 1970).

Muitos são os dados obtidos onde foi observado uma correlação entre presença e ocorrência de DNA satélite contendo seqüências nucleotídicas repetitivas com a heterocromatina.

PARDUE & GALL (1970), utilizando o método de hibridização in situ DNA/DNA e DNA/RNA, seguido de coloração diferencial por Giemsa, demonstraram a ocorrência, na heterocromatina ao redor do centrômero dos cromossomos do camundongo, de DNA satélite com múltiplas seqüências de nucleotídeos repetitivos. Outros pesquisadores confirmaram essa correlação na heterocromatina dos cromossomos do arganaz, *Microtus agrestis*, (ARRIGHI et al., 1970) em *Drosophila* spp. (HENNING, et al., 1970; BRUTLAG, 1980), na salamandra, *Plethodon cinereus cinereus* (MACGREGOR & KEZER, 1971), em *Rhynchosciara hollaenderi* (ECKHARDT & GALL, 1971).

STEFOS & ARRIGHI (1974), estudando os cromossomos da ave doméstica *Gallus domesticus*, notaram que as frações de DNA repetitivo estavam associadas à heterocromatina dos microcromossomos e com o cromossomo sexual W, no qual havia um conteúdo desproporcional de DNA repetitivo. A heterocromatina centromérica dos macrocromossomos era depauperada em DNA repetitivo.

Deve-se, no entanto, ressaltar que nem todo o DNA da heterocromatina constitutiva é satélite ou altamente repetitivo (COMINGS, 1972). Portanto, pode se tornar inadequado a inclusão de seqüências altamente repetitivas de DNA como sendo uma propriedade característica da heterocromatina, como sugerido por HSU (1975).

Nenhuma correlação foi vista (COMINGS & MATTOCCIA, 1970) entre a heterocromatina dos cromossomos da codorniz *Coturnix coturnix japonica*, com o DNA satélite, o qual se apresenta rico em bases G-C.

No hamster chinês, *Cricetulus griseus*, somente 3% da heterocromatina era altamente repetitiva, com DNA satélite rico em A-T. A porção restante da heterocromatina possuía aproximadamente a mesma quantidade de DNA repetitivo que a eucromatina não indicando discrepâncias de DNA rico em A-T ou G-C (OUD & SCHOLTEN, 1982).

Desta forma, tem-se que, embora uma grande parte dos estudos desenvolvidos em cromossomos de organismos eucarióticos revele associação entre a heterocromatina com a presença de DNA satélite ou com a riqueza de seqüências nucleotídicas repetitivas, não se pode ter como regra geral que a ocorrência de DNA satélite esteja intrinsecamente relacionada somente às regiões heterocromáticas dos cromossomos.

Um dos conceitos iniciais sobre a heterocromatina era a sua inatividade gênica.

O cromossomo Y de *Drosophila melanogaster*, que é heterocromático, foi primeiramente considerado como inerte geneticamente (HANNAH, 1951). Esse cromossomo, segundo o que pensavam os pesquisadores na época, seria apenas necessário para a fertilidade dos machos (BROWN, 1966). Posteriormente, foram reconhecidos os fatores de fertilidade ou conjuntos de fatores, bem como alguns genes e "poligenes" comuns tanto ao cromossomo Y quanto ao cromossomo X (COOPER, 1959) contrariando, portanto, a idéia da inatividade gênica de segmentos heterocromáticos.

Diversos outros estudos têm demonstrado a atividade gênica em áreas heterocromáticas.

KUSH *et al.* (1964), estudando alguns genes marcadores do cromossomo 9 em tomate através da análise fenotípica, verificaram a presença de um gene (nv) em segmentos heterocromáticos, o que reforça a idéia de atividade gênica.

SIMÕES *et al.* (1975) observaram a formação de "puffs" de RNA em regiões heterocromáticas dos cromossomos de *Rhynchosciara angelae*, inclusive no cromossomo X, o qual é conhecido por conter genes de RNA ribossômico.

As proteínas nucleares histônicas têm sido mencionadas e estudadas quanto a sua influência na capacidade de inativação genética da cromatina e também na síntese de RNA mensageiro.

LITTAU *et al.* (1965) em seus estudos em núcleos de células de timo de vitela observaram que as histonas ricas em lisina estariam envolvidas na estrutura da cromatina condensada, que provavelmente corresponderia à heterocromatina.

Este envolvimento das histonas na estrutura da cromatina foi também observado por BERLOWITZ *et al.* (1969) em células reprodutoras de *Planococcus citri*. Concluíram que o emprego de ácido acético extrairia as proteínas histônicas da heterocromatina, as quais estariam envolvidas na sua estrutura de condensação e desta forma estariam diminuindo os sítios ativos disponíveis de síntese.

BERLOWITZ (1974) sugeriu que as histonas ricas em arginina estariam relacionadas com a atividade de transcrição enquanto que as histonas ricas em lisina estariam envolvidas na condeno

sação da heterocromatina.

Parte dos estudos relacionados com as proteínas histônicas está voltado para a compreensão de seu papel no bandamento cromossômico, isto é, no seu envolvimento ou não na produção de bandas ao longo dos cromossomos, quando estes são submetidos a determinados agentes químicos.

Com base nas propriedades características e diferenciais da heterocromatina, novas técnicas citológicas surgiram, com o intuito da diferenciação longitudinal dos cromossomos. Essas são as técnicas que promovem a formação de bandas nos cromossomos.

O termo banda, de acordo com a CONFERÊNCIA DE PARIS (PARIS CONFERENCE, 1971), é definido como sendo um segmento cromossômico que é claramente distinto de outros adjacentes por sua coloração mais densa (bandas-C, -G e -R) ou brilhantes (bandas-Q), de acordo com o método de diferenciação cromossômica empregado.

O aparecimento das técnicas de bandamento cromossômico aumentou consideravelmente o poder e a sensibilidade de análise dos cromossomos (COMINGS, 1973 e 1977).

Os estudos iniciais desenvolvidos por CASPERSSON *et al.* (1968) com agentes fluorescentes demonstraram a ocorrência de bandas ao longo dos cromossomos, as bandas-Q. Além da quinacrina e seus derivados, da acridina, da proflavina, da droga química Hoechst 33258 e do brometo de etídio (COMINGS, 1972; VOSA, 1975), extratos alcoólicos de raízes de algumas espécies de Fumariaceae e Papaveraceae também foram estudados por VOSA *et al.* (1972). Estes autores demonstraram que os mesmos produziam estruturas luminescentes ao longo dos cromossomos de algumas plantas testadas e

que estas bandas eram semelhantes àsquelas produzidas pelo emprego da quinacrina.

As bandas-Q mostraram-se eficientes na caracterização dos cromossomos, segundo ZECH (1973), principalmente daqueles que são morfológicamente similares.

Alguns vegetais como *Trillium erectum* e *Vicia faba* mostraram que as bandas-Q obtidas coincidiam com os segmentos heterocromáticos (CASPERSSON *et al.*, 1968). O mesmo ocorreu com algumas espécies de *Tulbaghia* e *Allium* (VOSA, 1970) e *Allium flavum* (VOSA, 1973a).

Outros vegetais, como *Scilla sibirica* (Liliaceae), também foram analisados citologicamente, por VOSA (1973b), no que concerne à caracterização e reconhecimento de cromossomos, por meio de bandamento Q. Este autor pôde, através do padrão de bandas-Q obtido, verificar a ocorrência de variações intrapopulacional em *S. sibirica*.

As técnicas de fluorescência de áreas heterocromáticas, resultando em bandas-Q, são amplamente utilizadas na citogenética médica porque permitem a visualização de modificações estruturais cromossômicas que originam algumas das conhecidas síndromes. Entretanto, necessitam de uma aparelhagem sofisticada para a observação, análise e documentação fotográfica das bandas luminescentes.

O uso de corantes, como o Giemsa, abriu uma nova perspectiva para melhor identificação cromossômica. Técnicas de bandamento com o Giemsa diferenciando a heterocromatina da eucromatina, em cromossomos metafásicos, passaram a ser muito utiliza-

das em citogenética (COMINGS, 1972 e SHANKLAND & GRANT, 1976).

Os métodos que utilizam o Giemsa em associação com outras substâncias produzem uma visualização de bandas que são do tipo C, G e R. Estas diferem entre si pelo mecanismo distinto que opera na formação das mesmas e da metodologia utilizada como pode ser visto no QUADRO I que se segue:

QUADRO I - Resumo das metodologias de bandamento C, G e R:

Bandamento	Soluções utilizadas
C:	Ba(OH) ₂ . 8H ₂ ou NaOH; salina de SSC; Giemsa/tampão fosfato Sörensen.
G:	Enzima diluída em solução tampão ou uréia ou solução de sais em pH alcalinos; Giemsa/tampão fosfato.
R:	Meio Earle ou tampão de fosfato de potássio a temperatura de 87°C; Giemsa/tampão fosfato Sörensen.

As denominadas bandas-C (C de heterocromatina constitutiva) foram descobertas como um biproducto do procedimento de hibridação in situ de DNA/RNA (HSU, 1973 e 1974). Foram inicialmente observadas em cromossomos de camundongo (PARDUE & GALL, 1970),

de *Microtus agrestis* (ARRIGHI *et al.*, 1970) e posteriormente, em cromossomos humanos (ARRIGHI & HSU, 1971), onde as áreas heterocromáticas pericentroméricas marcadas radioativamente também se coravam intensamente e de forma seletiva em relação à eucromatina pelo Giemsa.

Comumente, as bandas-C ocorrem ao redor das regiões centroméricas, das constrições nucleolares e, em alguns casos, em regiões intercalares, bem como terminais (KONGSUWAN & SMYTH, 1978). Nos cromossomos humanos, por exemplo, segundo SCHNEDL (1974) as regiões pericentroméricas coram-se muito mais que qualquer outra região.

A técnica de banda-C, para a identificação dos cromossomos, revolucionou os estudos de citogenética (VOSA, 1977), tendo a vantagem sobre as técnicas que utilizam a fluorescência por não requerer aparelhos sofisticados para a visualização dos segmentos diferenciados.

Esta técnica na forma original, como proposta por PAR-DUE & GALL (1970), geralmente não é aplicada em cromossomos vegetais (SCHWEIZER, 1974). Nestes, normalmente se usa a variação BSG (hidróxido de bário/solução salina/Giemsa) no lugar da variação ASG (ácido acético/solução salina/Giemsa). A primeira utiliza o hidróxido de bário e a segunda o ácido acético.

VOSA & MARCHI (1972) adaptaram o método de Giemsa aplicando-o em diversas espécies de plantas e compararam os resultados desse método com os padrões de bandas obtidos com a quinacrina fluorescente, observando forte correlação entre os segmentos corados pelo Giemsa com aqueles diferenciados pela quinacrina.

Semelhantemente, SCHWEIZER (1973) aplicou uma modifica

ção no método de banda-C em cinco espécies de monocotiledôneas e duas espécies de dicotiledôneas. Observou que o padrão de banda-C obtido para cada espécie coincidia com as regiões heterocromáticas (segmentos-H). Em *Trillium grandiflorum* houve coincidência entre a localização das bandas-C com os segmentos heterocromáticos revelados pelo tratamento a frio. Nas sete espécies investigadas, SCHWEIZER (1973) observou similaridades entre o padrão de bandas luminescentes, bandas-Q, com as bandas-C, densamente coradas pelo Giemsa.

Diversos estudos comparativos, entre espécies relacionadas ou apenas entre espécies do mesmo gênero, foram desenvolvidos através de técnicas de bandamento cromossômico, preferencialmente, com aquelas usando o Giemsa como corante.

MARKS & SCHWEIZER (1974), trabalhando com algumas espécies de *Anemone* L. (Ranunculaceae) verificaram uma variação interespecífica no padrão de bandas-C. Constataram também que as espécies do velho mundo apresentavam um padrão de bandas diferente daquelas do novo mundo. Estas últimas, inclusive, eram caracterizadas por apresentar maior quantidade de heterocromatina e maior número de bandas por conjunto cromossômico.

Com o emprego de técnicas de bandamento-C em espécies cultivadas e selvagens de *Hordeum* (cevada), VOSA (1976a) confirmou a situação de alotetraplóide de *Hordeum murinum* e de *H. secalinum*.

Nas espécies do gênero *Allium*, VOSA (1976b), com o emprego de bandas-Q e -C pôde observar estreitas relações de afinidades entre as espécies do grupo "paniculatum". Concluiu, pelo padrão de bandas-C dos cariótipos montados, que a espécie *A. ca-*

rinatum, um triplóide natural, teria se originado de *A. pulchellum* e que a espécie *A. oleraceum* seria um tetraplóide surgido a partir de *A. paniculatum*, mais precisamente, do cruzamento de duas formas desta espécie.

As técnicas de banda-C também vêm sendo utilizadas naqueles vegetais cultivados, com o interesse de melhor caracterização dos cromossomos para posteriores programas de melhoramento.

MERKER (1973) utilizou técnica de banda-C, com sucesso, na demonstração dos cromossomos envolvidos no híbrido *Triticale* (*Triticum* sp. X *Secale* sp.), podendo inclusive identificar os cromossomos de *Triticum durum* cv. Nugget por seu padrão peculiar de bandas centroméricas e de *Secale* sp. por suas bandas exclusivamente teloméricas.

Segundo WEIMARK (1974) as técnicas de bandas-C permitem uma informação mais precisa sobre quais os cromossomos que são eliminados na formação do *Triticale* e também observar melhor as aneuploidias neste gênero sintético.

Com relação às bandas-C e -Q, parece haver coincidência entre o padrão e ocorrência de ambas. Porções cromossômicas que exibem intensa fluorescência no cromossomo humano Y quando tratado com quinacrina, também apresentam uma notável coloração, mais escura, com o Giemsa (LEJEUNE, 1973).

SCHWEIZER (1973), VOSA (1976b) e MEHRA & FOGLE (1982) encontraram similaridades entre a ocorrência das bandas-C e -Q nos materiais estudados, respectivamente *Trillium grandiflorum*, *Scilla sibirica* e *Phlox drummondii*.

Contrariamente a estas observações, KONGSUWAN & SMITH (1977), demonstraram não haver correspondência de bandas-C e -Q nos cromossomos de *Lilium grandiflorum*.

Muitas das técnicas de bandas-C empregadas em vegetais são, na verdade, modificações que cada autor introduziu nos procedimentos de SUMNER (1972), que utiliza o método BSG, no sentido de melhor adaptação do método ao material utilizado.

Entre os vegetais utilizados para o bandamento-C estão os cereais (STACK & CLARKE, 1973a; GODIN & STACK, 1975 e YEN & FILION, 1977), algumas plantas bulbosas (STACK & CLARKE, 1973 b; VOSA, 1970, 1973a, 1973b e 1979; CHINNAPPA & MORTON, 1978), algumas Ranunculaceae (= Helleboraceae) (MOUTSCHEN & GILOT-DELHALLE, 1973; MARKS & SCHWEIZER, 1974) e outros. Em todos os casos o intuito foi para a caracterização de seus cromossomos para estudos comparativos ou para o estabelecimento de relações interespecíficas (FILION, 1974; MARKS & SCHWEIZER, 1974; GILOT-DELHALLE *et al.*, 1976 e VOSA, 1976a e 1976b).

A maioria destes trabalhos está restrita a plantas que apresentam cromossomos grandes (comprimento maior que 10 micrômetros). Todavia, os resultados obtidos por STACK & CLARKE (1973a) em *Plantago insularis* L., MOK & MOK (1976) em *Phaseolus vulgaris* L., GOSTEV & ASKER (1979) em diversas espécies de *Salvia*, em *Rosa damascena* e em algumas espécies de alguns gêneros de Apiaceae e SOLTIS (1982) com alguns gêneros de Saxifragaceae provaram a validade das técnicas de bandamento-C para vegetais com cromossomos pequenos.

Por sua vez, as denominadas técnicas de bandamento-G incluem-se também entre aquelas que usam o Giemsa como corante.

Originalmente descritas por DUTRILLAUX *et al.* em 1971, o procedimento para a obtenção de bandas-G utiliza enzimas como a pronase, a protease, a α quimiotripsina e a tripsina. SHIRAI-SHI & YOSIDA (1972) demonstraram que sais como a uréia também induziam a formação de bandas-G nos cromossomos metafásicos. KATO & MORIWAKI (1972) observaram também que soluções de sais com pH alcalinos, desnaturantes proteicos ou detergentes são capazes de produzir nos cromossomos estruturas semelhantes às bandas-G, o mesmo se dando com a utilização de permanganato de potássio (UTAKOJI, 1972) e bissulfatos oxidados (UTAKOJI, 1973).

Os experimentos positivos que se tem com bandamento-G estão restritos na sua maioria, a cromossomos animais.

De acordo com GREILHUBER (1977), os cromossomos vegetais não apresentam padrões de bandas-G, mesmo quando submetidos a procedimentos para tal, devido ao grau maior de condensação dos mesmos em metáfase.

FILION & BLASKEY (1979) também apoiam tal idéia, porém tais autores obtiveram prenúncios de bandas-G em algumas plantas por eles estudadas.

KONGSUWAN & SMITH (1980) admitem a equivalência de bandas-G e -Q mitóticas com a posição dos cromossomos em paquíteno, em vegetais, embora a contração cromossômica verificada na mitose dos mesmos chegue a ser até dez vezes maior do que a verificada nos cromossomos mitóticos de animais.

Em *Pinus resinosa*, um dos poucos exemplos de bandamento com enzimas em cromossomos de vegetais, DREWRY (1982), utilizou a tripsina e obteve estruturas coradas que identificou como banda-G. Sua ocorrência estaria relacionada ao tamanho dos cro-

mossomos de *P. resinosa* e também a um grau de contração cromossômica provavelmente menor do que aquela que ocorre em cromossomos de outros vegetais.

Há outra técnica que também utiliza o Giemsa como corante, apesar dos resultados serem opostos àqueles obtidos pelas técnicas de bandamento-G. De acordo com a CONFERÊNCIA DE PARIS (PARIS CONFERENCE, 1971), este método é denominado de Coloração Reversa de Giemsa e as bandas resultantes por R. São assim denominadas por estarem localizadas precisamente nas regiões cromossômicas que não se coram pelos procedimentos de bandas-G e que, portanto, permanecem claras (SCHNEDL, 1974). São distintas das bandas-G por se originarem de um método que envolve a denaturação controlada à quente em meio Earle e ainda a temperaturas elevadas.

Segundo DUTRILLAUX (1973a), este tipo de bandamento produz resultados mais regulares que aqueles oriundos de técnicas-G, sendo igualmente o reverso das bandas fluorescentes.

Outro método para o estudo da diferenciação longitudinal dos cromossomos é aquele que promove a formação das bandas-R. Elas foram obtidas por SCHWEIZER (1976) em cromossomos metafásicos humanos, de *Vicia faba*, de *Scilla siberica* (= *S. sibirica*) e de *Ornithogalum caudatum* com o emprego dos antibióticos cromomicina A_3 (CMA), actinomicina D e 4-6-diamino-2fenilindol (DAPI); estes dois últimos em associação (AMD/DAPI). Resultados similares em cromossomos metafásicos mitóticos de *S. siberica* e *O. caudatum*, foram alcançados por este autor posteriormente (SCHWEIZER, 1977) com o uso de cromomicina A_3 em combinação com a enzima DNase I.

Por modificações da técnica inicial de banda-R, quer acidificando o meio ou adicionando o Giemsa como reagente, DUTRILLAUX (1973b) obteve um padrão de bandas que denominou por bandas-T, pelo fato delas se localizarem especificamente nos telômeros dos cromossomos, isto é, nas regiões terminais dos braços dos cromossomos. A vantagem do uso de tal técnica em citogenética humana estaria na possibilidade de localização de prováveis rearranjos cromossômicos como, por exemplo, translocações que envolvem segmentos cromossômicos terminais.

Outra técnica, a de bandamento-N, foi originalmente usada numa tentativa de se distinguir as regiões organizadoras do nucléolo (NOR).

O princípio da técnica para a obtenção de bandas-N é a utilização de soluções ácidas, como o ácido tricloroacético (TCA) e o ácido clorídrico (HCL), ou de soluções tampão de fosfato de sódio acidificadas (pH ao redor de 4,0) a temperaturas elevadas, ao redor de 85°C.

MATSUI & SASAKI (1973) e FUNAKI *et al.* (1975) empregaram esta técnica em cromossomos metafásicos de alguns mamíferos e de alguns vegetais, observando forte correlação entre os sítios corados positivamente pelas bandas-N com os organizadores do nucléolo.

GERLACH (1977) semelhantemente, aplicou o método de bandas-N em algumas espécies de trigo e obteve um padrão de bandamento no qual não havia coincidência com as regiões organizadoras (NOR). Os resultados obtidos, no entanto, foram interessantes e por meio dessa técnica, o autor pôde, comparando os cariótipos das espécies analisadas, observar estreita correlação en-

tre o genoma B do trigo hexaplóide 'Chinese Spring' (*Triticum aestivum*) com o trigo tetraplóide *T. dicoccoides*.

Por fim, GOODPASTURE & BLOOM (1975) descreveram uma metodologia para coloração seletiva das regiões organizadoras do nucléolo (NOR), utilizando cromossomos humanos em metáfase. O princípio desta técnica é a impregnação pelo nitrato de prata (Ag NO_3) seletivamente, seguida pela oxidação do mesmo. De acordo com BLOOM & GOODPASTURE (1976), um aumento de tempo na exposição do material à solução de nitrato de prata permitiria a impregnação de outras áreas cromatínicas, tais como as centroméricas, podendo acontecer equivalência com o padrão de bandas-C e bandas-G.

Pesquisas foram realizadas utilizando-se antibióticos na indução de diferenciação morfológica em cromossomos. Cromossomos metafásicos humanos tratados com daunomicina e nogalomicina mostraram padrões de bandas luminescentes, principalmente, quando submetidos à droga daunomicina, as quais receberam a denominação de bandas-D (LIN & SANDE, 1975).

O padrão de bandas produzidas pelo emprego de antibióticos pode ser coincidente com aqueles obtidos pelo uso de quina crina, como em cromossomos humanos (SCHWEIZER, 1976), ou com as bandas-R como em alguns vegetais ou em cromossomos humanos (SANDE *et al.*, 1977; SCHWEIZER, 1977).

O mecanismo de bandamento cromossômico é discutível. No caso das bandas-Q, o mecanismo que opera na produção desses segmentos luminescentes parece estar relacionado com a ocorrência de DNA satélite rico em A-T (ELLISON & BARR, 1972; SCHNEDL, 1974; COMINGS *et al.*, 1975 e COMINGS, 1978).

De acordo com COMINGS *et al.* (1975), a interação do DNA com proteínas não histônicas e o grau moderado de condensação da cromatina estariam implicados no bandamento. A quinacrina e a droga química Hoechst 33258 ligam-se por intercalação às bases do DNA sendo que a quinacrina é duas vezes mais sensível à composição de bases do DNA, no bandamento, que o Hoechst 33258 (COMINGS *et al.*, 1975; COMINGS & DRETS, 1976).

Quanto ao bandamento-C há idéias de que: (1) o mecanismo essencial seja dado pela denaturação e renaturação diferencial das hélices de DNA, induzidas por soluções alcalinas e temperaturas controladas (YUNIS & YASMINEH, 1973); (2) ocorra retenção de DNA nas regiões bandadas e perda de DNA nas regiões não bandadas, sendo, portanto, uma extração preferencial de DNA (LUBS *et al.*, 1973; COMINGS, 1978); e (3) que este mecanismo esteja associado a perdas de proteínas histônicas conforme demonstrado por COMINGS (1977) e BURKHOLDER & DUCZEK (1980b).

Para HOLMQUIST (1979) o mecanismo de banda-C envolveria: (1) a depurinação; (2) a denaturação; (3) quebra da ligação açúcar-fosfato (β -eliminação); (4) eliminação dos fragmentos soltos de DNA e (5) coloração do DNA remanescente retido em maior quantidade nas regiões heterocromáticas.

Segundo DUTRILLAUX (1973a), o mecanismo de bandas-G seria, também semelhante ao bandamento-C, baseado na denaturação e renaturação preferencial da dupla hélice de DNA.

Estudos de microscopia eletrônica em cromossomos não tratados com tripsina e em cromossomos tratados com esta enzima, mostraram que a cromatina dos primeiros era densamente uniforme e nos últimos não, aparecendo estruturas de bandas (COMINGS, 1977).

Segundo o autor, uma vez que nenhum corante foi usado, a tripsina, provavelmente agiu modificando a estrutura da cromatina daquelas regiões originando estruturas de bandas-G.

COMINGS (1978) propôs uma associação entre regiões de bandas-G com regiões ricas em bases repetitivas do tipo A-T, as quais seriam mais resistentes à capacidade de digestão da tripsina.

BURKHOLDER & DUCZEK (1980a), examinando o efeito de agentes empregados no bandamento-G, observaram que a fixação do material em solução 3:1 de álcool e ácido acético extraíam grande quantidade das proteínas histônicas. Os tratamentos com sais (NaCl e SSC) e especialmente uréia extraíam uma quantidade não muito grande de proteínas não histônicas e que finalmente, a tripsina digeriria, porém sem retirar, proteínas associadas ao DNA. Os autores observaram apenas resíduos digeridos de proteínas na cromatina, não especificando qual o tipo proteico.

BUYS & OSINGA (1982) sugeriram uma associação entre extração preferencial de DNA com a ocorrência de bandas-G.

As bandas-R estão localizadas em regiões cromossômicas onde há riqueza de conteúdo de G-C. Experiências com anticorpos anti-C (anticitidina) demonstraram a similaridade do padrão de bandas obtidas por este processo com aqueles padrões de -R (MILLER *et al.*, 1973). De acordo com SCHNEDL (1974) as regiões ricas em G-C seriam mais resistentes à denaturação.

COMINGS & AVELINO (1975) sugeriram que o bandamento-R resultaria de denaturação seletiva de proteínas não histônicas das regiões de interbanda-R. As proteínas denaturadas recobririam os grupos fosfatos do DNA mais eficientemente do que aque-

las não desnaturadas, interferindo desta forma no modo de ligação do corante aos grupos fosfatos.

Alguns antibióticos como a olivomicina, a cromomicina A₃ e a mitramicina mostraram ligação específica com regiões ricas em G-C (SANDE *et al.*, 1977). Estas regiões estariam sendo protegidas pelo antibiótico quando expostas a enzimas digestivas tipo DNase I (SCHWEIZER, 1977).

Uma outra explicação para o mecanismo de bandas-R, complementando a idéia anterior, seria de que o DNA denaturado, rico em A-T que ocorre nas bandas-G, seria parcialmente extraído pela temperatura enquanto que o DNA nas bandas-R (interbandas-G) não sofreria esta extração (COMINGS, 1978).

FUNAKI *et al.* (1975) sugeriram que as proteínas não histônicas estariam envolvidas no mecanismo do bandamento-N.

GERLACH & PEACOCK (1980) notaram a correspondência de bandas-N com a localização do DNA satélite, sendo que as seqüências repetitivas supostamente seriam GAA e GAG.

JEWELL (1981) observou em cromossomos de *Triticum aestivum* cv Chinese Spring e de *Secale cereale* que a variação no pH da solução e a temperatura alteravam o padrão de bandas-N dos cromossomos.

BLACK & ANSLEY (1964) estudando o mecanismo de impregnação da prata em solução amoniacal nos cromossomos das glândulas salivares de dípteros, concluíram que as proteínas histônicas estavam diretamente envolvidas, principalmente aquelas ricas em lisina.

A técnica de impregnação pela prata, utilizada por

GOODPASTURE & BLOOM (1975) , . agiria seletivamente nas regiões organizadoras do nucléolo (NOR) estando relacionada com a localização de cistrons ribossômicos 18 s e 28 s. De acordo ainda com estes autores, o uso de DNase não afetaria o padrão de impregnação pela prata, mas o uso de enzimas como a tripsina eliminaria toda a impregnação, sugerindo que a composição de bases do DNA não seria um pré-requisito para a obtenção de bandas NOR.

Mais recentemente, MEDINA *et al.* (1983) observaram que a cromatina descondensada da região organizadora do nucléolo estava impregnada de grão de prata. Notaram também que o emprego de agentes inibidores da síntese do RNA ribossômico, não afetava a estrutura impregnada pela prata.

O mecanismo que opera na produção de bandas, utilizando-se os antibióticos, é variável. Alguns operam por inibição de síntese de DNA, complexando-se com este (WARD *et al.*, 1965), contendo especificidade para as regiões A-T, como acontece com o DAPI e a AMD/DAPI (SCHWEIZER, 1976) ou com regiões G-C, como é o caso da mitramicina e olivomicina (SANDE *et al.*, 1977).

Estudos comparativos entre os padrões de bandas-G, -Q e -R revelam que as bandas vivamente coradas após denaturação controlada e a quente (-R) correspondem às bandas fluorescentes pela técnica da quinacrina (-Q), bem como aos segmentos não corados, mais intumescidos revelados pela digestão proteolítica (DUTRILLAUX, 1973a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL E COLETA

As espécies aqui estudadas são diplóides, $2n=22$ cromossomos e autoincompatíveis. Estão representadas na coleção de plantas da Seção de Genética, no Centro Experimental do Instituto Agronômico, Campinas (IAC), possuindo cada uma um número próprio de introdução que as identifica.

Foram utilizados na pesquisa endospermas de frutos em desenvolvimento de alguns exemplares das espécies *Coffea dewevrei* raça *excelsa* Chev. e de *C. racemosa* Lour. como segue:

C. dewevrei raça *excelsa* Chev. (o café *excelsa*) planta número 63 é oriunda de Java, de onde veio como estaca. As demais plantas, 766, 6 e 4 têm a mesma procedência da anterior, porém nascidas aqui no Brasil de sementes tendo, portanto, genótipos diferentes. Todas essas plantas vieram da coleção do Horto de Rio Claro onde passaram o período de quarentena e crescimento.

C. racemosa Lour. plantas de números 1193-3-2 e 1194-2-10 são originárias de Moçambique de onde vieram como sementes. Além desses dois espécimes, foram utilizadas outras plantas e que são consequência de cruzamentos orientados entre diferentes introduções de *C. racemosa*, como H6391, H6590, H6593, H6595, H6608, H6609, H6611, H6612 e H6613.

C. dewevrei raça *excelsa* Chev. está representada no herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas) como exsicata número 29.662 e *C. racemosa* Lour., como exsicata de número 29.665.

Inicialmente, houve necessidade de se realizar alguns testes para se determinar: (1) qual o tamanho ou qual a região do endosperma que apresentava maior atividade mitótica e, mais precisamente, maior quantidade de células em metáfase; e (2) se a queda da temperatura, em condições de campo, interferiria consideravelmente na quantidade de células em divisão do endosperma. Para tal, utilizaram-se endospermas coletados e fixados da planta nº 63 de *C. dewevrei* raça *excelsa* e que foram separados na análise, pelo tamanho, região e temperatura de coletas. Esta planta foi escolhida pela facilidade de obtenção de frutos imaturos, o que ocorre praticamente o ano todo.

Os endospermas foram medidos e, de acordo com o seu tamanho, agrupados em três conjuntos que foram determinados arbitrariamente:

A₁ - PEQUENO - endospermas entre 1 a 4 mm;

A₂ - MÉDIO - endospermas entre 5 a 6 mm;

A₃ - GRANDE - endospermas entre 7 a 10 mm.

As medidas foram tomadas a partir da base, onde se encontra o embrião, indo até a extremidade oposta a este. Foi adotado esse padrão de medida porque o endosperma, segundo sua forma, é uma estrutura que pode ser arredondada ou ovado-oblonga e achatada dorso-ventralmente.

Os endospermas com o comprimento igual ou superior a 10 mm já apresentavam um endurecimento tecidual, consequência do depósito de celulose e hemi-celulose na parede celular, além do aumento da ocorrência de esclerídeos na película prateada que recobre o endosperma.

Para a análise da região do endosperma com maior atividade mitótica os endospermas com um diâmetro superior a 3 mm tiveram suas camadas mais externas separadas, por meio de um escalpelo, daquelas mais centrais. Foram então subdivididas em regiões:

B_1 - PERIFÉRICA - compreendendo as camadas teciduais mais externas do endosperma;

B_2 - CENTRAL - compreendendo a parte restante, isto é, as camadas mais centrais.

Essas análises da atividade mitótica dos endospermas tanto por tamanho como por região foram efetuadas em duas temperaturas médias diferentes de coletas. A primeira temperatura, denominada coletas em dias quentes, foi ao redor de 27°C e a segunda, denominada coleta em dias frios, foi ao redor de 11°C. Para uniformizar as condições, procurou-se efetuar as coletas no mesmo período quanto a hora do dia, o que ocorreu entre 8 e 9 horas da manhã. As temperaturas foram fornecidas pela seção de Climatologia (IAC).

As lâminas preparadas dos endospermas com as variáveis de tamanho e região foram analisadas ao microscópio óptico onde campos aleatórios foram tomados. Nesses, contou-se o número de células em metáfase, o número de células em processo mitótico e o número total de células no campo. Foram preparadas 32 lâminas para cada tamanho, região de endosperma e nas duas temperaturas de coletas, sendo que uma média de 108 células por lâminas foram contadas.

Os valores reais em porcentagem obtidos de células em metáfase nessas amostras foram transformados em arco seno $\sqrt{\frac{x}{100}}$

de acordo com STEEL & TORRIE (1980) onde $\bar{x}$ é o número de células na metáfase.

Nos casos em que o número de células em metáfase foi igual a zero (0%), este foi substituído por $\frac{1}{4n}$, onde n corresponde ao número total de células analisadas em cada lâmina de endosperma.

Essa transformação foi utilizada porque, de acordo com STEEL & TORRIE (1980) e GOMEZ & GOMEZ (1984) é a mais apropriada para os dados expressos em porcentagem.

Na análise de variância dos dados transformados foi feita a decomposição dos tratamentos e dos estudos de efeitos de temperatura, tamanho e da interação tamanho x temperatura.

Para a comparação entre as médias dos três tamanhos de endospermas, utilizou-se o teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. O efeito da temperatura foi verificado pelo teste F.

No caso dos endospermas divididos em camadas (regiões) aplicou-se o teste-t (Student's t test) para verificar a significância das diferenças encontradas entre as médias quanto ao número de células em metáfase.

Após os resultados obtidos dessa análise inicial, foram coletados ramos com frutos imaturos de *C. dewevrei* raça *excelsa* das plantas de números 4, 6, 63 e 766 e de *C. racemosa* das plantas de números 1193-3-2, 1194-2-10. H6391, H6590, H6593, H6595, H6608, H6609, H6611, H6612 e H6613. A seguir, os endospermas foram extraídos e selecionados para a fixação e posterior utilização nas diferentes técnicas experimentadas de bandamento.

Além dos endospermas de café, pontas de raízes de *Hip-*

peastrum psittacinum Herb. (Amaryllidaceae) foram também coletadas para servirem de controle em algumas técnicas de bandamento, juntamente com os endospermas, porque esta planta bulbosa tem cromossomos bem maiores, cujas raízes dão preparações citológicas excelentes. *H. psittacinum* pertence a coleção de plantas da Seção de Floricultura e plantas Ornamentais do IAC.

3.2. PRÉ-TRATAMENTO E FIXAÇÃO DO MATERIAL

Todos os endospermas coletados foram submetidos a uma solução hipotônica de KCl (cloreto de potássio) na concentração de 0,075 M por 1 a 2 horas a 0°C aproximadamente, a fim de se promover maior turgor celular o que possibilita um melhor espalhamento cromossômico.

As pontas de raízes de *H. psittacinum*, logo após a coleta, foram colocadas em uma solução aquosa saturada de PDB (para dicloro benzeno) por 6 horas, a uma temperatura média de 17°C para obtenção de contração cromossômica, o que facilita estudos de morfologia.

Seis tipos de solução fixadora foram utilizadas para esses materiais:

- 1) Carnoy₁ 3:1 (3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial);
- 2) Carnoy₂ 3:1 (3 partes de álcool metílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial);
- 3) Carnoy 1:1 (1 parte de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial);

- 4) Álcool etílico absoluto;
- 5) Álcool etílico 90%;
- 6) Ácido acético 50%.

Após a fixação, os endospermas foram estocados em freezer, a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ negativos nas respectivas soluções fixadoras, para a melhor conservação do material e as raízes de *H. psittacinum* a 4°C aproximadamente.

3.3. PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA E PARA O BANDAMENTO

Os endospermas de *C. deweyrei* raça excelsa planta 63 foram submetidos a uma técnica de coloração com esmagamento emorceína acética a 2%, segundo o procedimento rotineiro da Seção de Citologia do IAC.

As lâminas foram então analisadas e os dados amostrados para a análise estatística.

As pontas de raízes de *H. psittacinum*, pré-tratadas com PDB e fixadas, foram hidrolisadas em solução de HCl (ácido clorídrico) 5N por 15 minutos à temperatura ambiente lavadas em água destilada. A hidrólise é necessária para o amolecimento da parede celular e conseqüentemente do tecido. Após este procedimento, as raízes, juntamente com os endospermas, foram submetidos a uma solução de ácido acético a 45% durante 30 minutos a 50°C . Esta fase consiste no preparo do material para o bandamento.

As lâminas foram preparadas por esmagamento do mate-

rial, tanto dos endospermas de café como das raízes de *H. psittacinum*, na mesma solução de ácido acético 45%, pressionando-se a lamínula contra a lâmina.

Eventualmente, alguns embriões de *C. dewevrei* e de *C. racemosa* também foram submetidos ao mesmo tratamento.

As lamínulas, previamente siliconizadas para assegurar a maior parte do material na lâmina, foram despregadas das lâminas através de um rápido banho em nitrogênio líquido (-183°C). Estas lâminas, contendo agora o material, passaram então por outro banho em álcool etílico a 90% e foram secas naturalmente ao ar. Foram estocadas por um período de alguns dias, a denominada maturação, em cubas de vidro especiais para lâminas, fechadas e mantidas a 4°C para se evitar contaminação por bactérias, as quais quando em grande quantidade dificultam o reconhecimento e a análise dos cromossomos após o bandamento.

Foram empregadas neste trabalho as técnicas que produzem bandas-C, -G e NOR, de acordo com as diferentes metodologias propostas por seus respectivos autores. Em algumas destas metodologias foi necessário introduzir modificações com o intuito de melhor adaptar a técnica ao material utilizado:

3.3.1. BANDA-C:

STACK & CLARKE (1973b):

- Imersão das lâminas em solução tampão de fosfato de potássio 0,12M a pH 6,8 por 10 minutos à temperatura de 94°C ;
- Transferência das lâminas para uma nova solução do mesmo tampão por 22 horas a 60°C ;

- Coloração das lâminas em solução Giemsa diluída em tampão fosfato de potássio na proporção de 1/9 por 10 a 30 minutos à temperatura ambiente;
- Secagem e montagem das lâminas em Euparal.

MARKS & SCHWEIZER (1974):

- Imersão das lâminas em solução de hidróxido de bário, $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, a 5% por 30 minutos a 50°C;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Imersão em solução 2 X SSC (solução de cloreto de sódio 0,3M misturado com solução de citrato de trissódio 0,03M) a pH 7,8 por 1 a 2 horas a 65°C;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Coloração das lâminas, por imersão, em solução Giemsa diluída em solução tampão fosfato Sørensen M/15, a pH 6,9 na proporção 1/50 por 3 a 24 horas à temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Secagem e montagem em DePex.

MOK & MOK (1976):

- Imersão das lâminas em solução de 2 X SSC a pH 7,8 por 30 minutos a 65°C;
- Lavagem das lâminas em solução tampão de fosfato Sørensen a pH 6,8;
- Coloração, por imersão das lâminas, em solução Giemsa diluída em tampão Sørensen a 2% por 7 a 10 minutos;

- Lavagem das lâminas em solução tampão Sørensen;
- Secagem e montagem em Bálsamo do Canadá.

YEN & FILION (1977):

- Imersão das lâminas em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 0,07 M à temperatura ambiente por 20 a 60 minutos;
- Lavagem das lâminas em água destilada por 5 minutos;
- Imersão em solução 2 X SSC pH 7,8 a 60°C por 10 minutos a 2 horas;
- Lavagem em água destilada por 5 minutos e secagem natural ao ar;
- ~~Imersão das lâminas para coloração em solução 2% com o Giemsa diluído em tampão fosfato Sørensen pH 6,8 por 5 a 10 minutos;~~
- Montagem das lâminas em Permount.

CHINNAPPA & MORTON (1978):

- Imersão das lâminas em solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente por 5 minutos;
- Lavagem das lâminas em água destilada por 10 minutos;
- Incubação em 2 X SSC a 55°C por 10 horas;
- Lavagem em água destilada;
- Imersão das lâminas em solução de Giemsa diluído em tampão fosfato Sørensen (M/15 com pH 6,9) na proporção de 1/50 respectivamente, por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente;

- Montagem das lâminas em Permount.

3.3.2. BANDA-G:

SHIRAISHI & YOSIDA (1972):

- Solução de uréia (NH_2CONH_2) 8 M diluída em tampão fosfato Sørensen na proporção 3:1 (3 partes de uréia 8 M e 1 parte de tampão), colocada sobre a lâmina e recoberta com a lamínula, formando um filme sobre o material, por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Coloração das lâminas com solução de Giemsa diluído a 50 a 70 vezes em tampão fosfato Sørensen por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Secagem e montagem em Permount.

DUTRILLAUX (1973b):

- Solução de tripsina diluída em tampão fosfato de sódio pH 6,8 na concentração 0,05 mg/ml, colocada como uma película sobre as lâminas e recoberta com a lamínula, permanecendo a temperatura ambiente por alguns minutos;
- Coloração do material com solução Giemsa diluída em tampão fosfato de sódio na proporção 1/50 respectivamente, permanecendo alguns minutos a temperatura ambiente.

3.3.3. BANDA-NOR (IMPREGNAÇÃO PELA PRATA):

BLOOM & GOODPASTURE (1976):

- Imersão das lâminas em solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de 50%, a uma temperatura de 50°C por 2 a 5 horas. O pH da água destilada utilizada nesta solução foi de 4,5 a 5,0;
- Lavagem das lâminas em água destilada;
- Secagem e montagem em Permount.

As soluções utilizadas nos bandamentos cromossômico, -C e -G, foram preparadas como se segue:

2 X SSC:

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

Tampão Fosfato Sørensen pH 6,9 (M/15):

- Solução de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) a 9,078 g/l;
- Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico decaidratado) a 26,795 g/l.

Tampão Fosfato de Potássio pH 6,8 (0,12 M):

- Solução de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) a 6,804 g/l;
- Solução de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico) a 8,709 g/l.

Tampão Fosfato de Sódio pH 6,8 (0,2 M):

- Solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio monobásico decaidratado) a 13,800 g/l;
- Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico heptaidratado) a 26,795 g/l.

As soluções componentes dos respectivos tampões e do 2 X SSC foram preparadas separadamente, diluídas em água destilada, e misturadas em proporções iguais para posterior uso. O pH foi medido em pHmetro Mettler. Eventualmente foi utilizado o papel de pH Merck, art. 9556 e art. 9557 com escala entre 5,4 a 7,0 e 6,4 a 8,0 respectivamente.

As soluções preparadas foram utilizadas no mesmo dia, preferencialmente ou no dia seguinte, sendo então conservadas a 4°C, e vedadas para evitar prováveis contaminações. O pH de cada solução foi medido novamente antes do uso a temperatura ambiente.

Após o bandamento, as lâminas permaneceram de 1 a 3 dias secando naturalmente sendo submetidas após esse tempo e por um minuto a um jato frio de ar, para retirar a possível umidade ainda persistente e o máximo de partículas de poeira que houvessem se acumulado nas lâminas, sobre o material, dificultando sua visualização ao microscópio óptico.

A montagem permanente das lâminas foi feita com Permount Fisher.

Cerca de 2.000 lâminas de endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* foram selecionadas para análise após os diversos procedimentos de bandamento, além de 80 outras de *H. psittacinum* que foram usadas, juntamente com os endospermas, em algumas técnicas e variações de bandamento.

As melhores células, com cromossomos bandados, foram documentadas por Fotomicroscópio ZEISS, em contraste de fase. Os cromossomos destas células fotomicrografadas foram também desenhados em câmara clara e esquematizados para posterior execução dos ideogramas.

Para efeito de melhor visualização e comparação dos resultados obtidos com o emprego das técnicas de bandas-C, de tripsina e da impregnação pela prata, foram elaborados esquemas médios dos cromossomos para cada espécie e para cada técnica de bandamento, mostrando as variações encontradas. Os esquemas foram obtidos aumentando-se em 2,5 vezes o valor médio do comprimento total de cada cromossomo, dos ideogramas, bem como das respectivas bandas.

Além das técnicas de bandamento cromossômico C, G e NOR, 40 lâminas foram preparadas com os endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* e submetidas ao procedimento de coloração pelo método de Feulgen.

A metodologia foi a seguinte:

- endospermas retirados das soluções fixadoras e colocados em solução de HCl (ácido clorídrico) 5N por 15 a 30 minutos à

temperatura ambiente;

- Lavagem diversas vezes do material em água destilada;
- Coloração no reativo de Schiff por 1 a 2 horas;
- Preparo das lâminas em orceína 1%.

Utilizou-se também uma modificação para melhor adaptação do método ao material. As lâminas, com os endospermas já esmagados, foram submetidas a um filme de HCl 5N pelo mesmo tempo anteriormente descrito. Os passos seguintes da técnica foram também seguidos. Esta modificação tem a vantagem sobre a original porque a camada de tecido que é exposta à técnica de coloração é muito mais fina, reduzindo-se a algumas poucas ou somente a uma camada de células e que permite melhor a ação das drogas no tecido.

Algumas lâminas contendo endospermas em divisão, foram submetidas à coloração Giemsa somente. Esta coloração foi feita com o Giemsa diluído em tampão fosfato Sørensen 1/150, por 8 horas.

4. RESULTADOS

4.1. ATIVIDADE DOS ENDOSPERMAS

A análise da variância dos dados transformados (QUADROS II e III) mostrou não haver diferença significativa, pelo teste-F, entre os tamanhos ou entre as temperaturas de coletas, quando se observa a atividade mitótica dos endospermas. Isto indica que a queda da temperatura, em condições de campo, ao redor de 11°C, não afetou significativamente essa atividade dos endospermas de *C. dewevrei*, planta 63 mais precisamente, a quantidade de células na metáfase.

Pôde-se observar também, que não houve interação significativa entre temperaturas de coletas e tamanhos de endospermas (QUADRO IV). Isto indica que o comportamento dos tamanhos dos endospermas de *C. dewevrei*, planta 63, foi semelhante nas duas temperaturas (QUADRO IV). Aplicou-se o teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade para comparar a média de tamanhos. Verificou-se, por este teste, que os endospermas pequenos diferiam dos endospermas grandes e os endospermas médios se situavam em uma posição intermediária, não diferindo dos dois tamanhos de endospermas mencionados.

O valor da média de células em metáfase encontrado nas camadas periféricas foi igual a 1,65 e nas camadas centrais, 0,51. Pelo teste-t, a diferença entre as duas médias foi significativa ao nível de 5% de probabilidade. A maior atividade de divisão celular nos endospermas de *C. dewevrei*, planta 63, está nas camadas periféricas, em relação às centrais.

QUADRO II - Dados sobre a atividade mitótica nos 3 tamanhos de endospermas (pequeno, médio e grande) coletados em 2 temperaturas diferentes, com o valor real da porcentagem de células em metáfase (%) e o respectivo valor transformado em arco seno $\sqrt{\%}$:

DIAS QUENTES						DIAS FRIOS					
PEQUENO		MÉDIO		GRANDE		PEQUENO		MÉDIO		GRANDE	
%	arc sen $\sqrt{\%}$	%	arc sen $\sqrt{\%}$	%	arc sen $\sqrt{\%}$	%	arc sen $\sqrt{\%}$	%	arc sen $\sqrt{\%}$	%	arc sen $\sqrt{\%}$
3	9,98	1	5,74	0	2,87	1	5,74	0	2,81	0	2,87
2	8,13	1	5,74	0	2,81	1	5,74	3	9,98	1	5,74
1	5,74	2	8,13	0	2,81	3	9,98	0	2,87	0	2,63
1	5,74	1	5,74	0	2,87	1	5,74	0	2,81	0	2,87
3	9,98	0	2,69	0	2,87	1	5,74	1	5,74	0	2,75
2	8,13	1	5,74	0	2,75	2	8,13	0	2,87	1	5,74
0	2,69	0	2,69	1	5,74	0	2,63	0	2,81	1	5,74
0	2,69	2	8,13	0	2,87	0	2,81	2	8,13	1	5,74
0	2,75	1	5,74	0	2,81	1	5,74	1	5,74	1	5,74
1	5,74	1	5,74	0	2,87	0	2,87	1	5,74	0	2,81
1	5,74	4	11,54	0	2,81	2	8,13	1	5,74	0	2,87
0	2,75	2	8,13	1	5,74	0	2,87	1	5,74	0	2,81
2	8,13	0	2,81	4	11,54	1	5,74	2	8,13	0	2,87
0	2,69	0	2,75	1	5,74	2	8,13	2	8,13	0	2,75
0	2,81	1	5,74	0	2,81	1	5,74	2	8,13	0	2,81
3	9,98	0	2,81	0	2,81	1	5,74	0	2,81	0	2,87
0	2,81	0	2,87	0	2,81	0	2,75	0	2,75	1	5,74
0	2,75	0	2,69	0	2,75	0	2,81	0	2,69	1	5,74
0	2,75	0	2,87	0	2,87	1	5,74	4	11,54	0	2,81
1	5,74	1	5,74	0	2,69	0	2,87	1	5,74	4	11,54
1	5,74	1	5,74	0	2,75	1	5,74	0	2,69	0	2,69
2	8,13	0	2,87	0	2,75	4	11,54	0	2,87	1	5,74
3	9,98	0	2,75	0	2,63	2	8,13	0	2,69	0	2,81
0	2,75	2	8,13	0	2,69	2	8,13	0	2,81	1	5,74
4	11,54	0	2,87	0	2,75	1	5,74	1	5,74	0	2,87
0	2,87	2	8,13	1	5,74	0	2,81	0	2,87	0	2,87
0	2,69	1	5,74	1	5,74	0	2,87	0	2,81	1	5,74
0	2,69	0	2,75	1	5,74	0	2,87	0	2,81	1	5,74
1	5,74	0	2,87	1	5,74	4	11,54	2	8,13	2	8,13
1	5,74	1	5,74	0	2,87	1	5,74	0	2,81	0	2,81
0	2,69	0	2,69	1	5,74	3	9,98	1	5,74	0	2,81
3	9,98	0	2,81	0	2,81	2	8,13	0	2,87	0	2,87

QUADRO III - Análise da variância dos dados sobre a atividade mitótica transformados em arco seno $\sqrt{\%}$:

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Temperatura	1	2,22	2,22	0,37 ^{ns}
Tamanho	2	98,24	19,12	8,21 [*]
Temperatura X Tamanho	2	1,40	0,70	0,11 ^{ns}
Erro	186	1112,68	5,98	
Total	191	1214,54		

ns = não significativo, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

* = significativo, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

média geral $\bar{m} = 4,87$

coeficiente de variação $\underline{CV} = 50\%$.

QUADRO IV - Média das células metafásicas nos três tamanhos de endospermas nas duas temperaturas de coletas:

Tamanhos:	Temperaturas:		Média dos tamanhos nas 2 temperaturas:
	Quente (27°C)	Fria (11°C)	
Pequeno	5,57	5,90	5,74 a
Médio	4,91	4,86	4,89 ab
Grande	3,80	4,16	4,98 b
Média de temperatura nos 3 tamanhos:	4,76	4,97	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

d.m.s. (Tukey, $\alpha = 0,05$) = 1,02.

4.2. FIXAÇÃO DO MATERIAL

O emprego de soluções fixadoras somente em álcool etílico absoluto ou mesmo a 90% revelaram-se inadequadas para a estocagem do material. Os endospermas fixados nestas soluções, após um período de tempo que variou de 6 a 12 meses, apresentaram endurecimento tecidual além do escurecimento do mesmo em lâmina.

As soluções fixadoras tipo Carnoy, isto é, mistura de álcool etílico e ácido acético, ou ácido acético a 50% foram as melhores, para a estocagem do material e preservação dos mesmos para uso posterior.

4.3. BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Como pode ser observado pelas FIGURAS 2 e 8 (FOTO A) a coloração usual de orceína a 2%, não fornece muitos dados para a caracterização morfológica dos cromossomos. Neste caso, a célula fotomicrografada foi do endosperma de *C. dewevrei* raça *excelsa*, usada como ilustração.

Os resultados obtidos com as modificações nas metodologias do bandamento-C, -G e NOR (impregnação pela prata) estão sumarizadas nos QUADROS V, VI, VII e VIII. O resultado de cada modificação foi simbolicamente representado pelos sinais positivo(+) e negativo(-), significando formação ou não de bandas. Foi considerado com o sinal negativo: 1) as bandas eram claras demais e quase imperceptíveis, não sendo possível distinguí-las com nitidez; 2) os casos onde a coloração dos cromossomos além de

homogêneas foi muito intensa.

A caracterização e a classificação dos cromossomos em grupos foi de acordo com o padrão de bandas apresentado, isto é, de acordo com o número e a posição das mesmas ao longo dos cromossomos. Além do padrão das bandas, foi utilizado como critério para o agrupamento dos cromossomos, o comprimento dos mesmos.

Em muitos casos, não foi possível identificar seguramente o local exato da constrição centromérica porque, pelas técnicas de bandamento, este local se apresentava com a mesma cor pálida dos segmentos cromossômicos não bandados. A sua determinação, portanto, seria de caráter subjetivo e muito imprecisa.

O número de grupos cromossômicos para cada célula do endosperma é 11, contendo até 3 cromossomos por grupo, isso porque o endosperma é triplóide com $3n=33$ cromossomos apresentando portanto, 3 homólogos por grupo.

Certas células, a despeito de estarem com o número de cromossomos incompleto (31 ou 32 cromossomos), foram incluídas e montados seus ideogramas, porque foram as únicas células obtidas através do emprego da respectiva modificação.

A numeração, colocada logo acima dos grupos de cromossomos nas células esquematizadas, foi particular para cada ideograma, obedecendo a graduação decrescente no comprimento total dos cromossomos. Ao se comparar os ideogramas, dentro da mesma metodologia (-C, -G ou NOR) não pôde ser observado qualquer correspondência morfológica rígida entre os respectivos grupos numerados de um ideograma com outro ideograma.

Para fins comparativos, quanto à posição do centrômero, da constrição secundária e satélite, foram utilizados o ideograma

ma proposto por KRUG (1934), para *C. dewevrei* raça *excelsa*, e o esquema e ideograma médios propostos por BOUHARMONT (1959 e 1963) para as espécies do gênero *Coffea*, indicados por números abaixo de cada grupo.

Os resultados de cada técnica empregada para cada espécie, estão agrupados em um esquema comparativo, onde as bandas mais comuns aos ideogramas obtidos estão evidenciadas por asteriscos.

4.3.1. BANDA-C:

4.3.1.1. *Coffea dewevrei* raça *excelsa*

O emprego das metodologias que promovem o bandamento-C, como originalmente propostas por STACK & CLARKE (1973b), MARKS & SCHWEIZER (1974), MOK & MOK (1976), YEN & FILION (1977) e CHINNA PPA & MORTON (1978) não foram adequadas para os cromossomos do endosperma de café (FOTO B, FIGURA 8).

As modificações da técnica de MARKS & SCHWEIZER (1974) introduzidas na metodologia de banda-C e aqui denominadas por T₂, T₈, T₉, T₁₄, T₁₅, T₁₆, T₁₇ e T₂₅ (QUADRO V) foram as únicas que deram resultados razoáveis e promoveram uma diferenciação longitudinal ao longo dos cromossomos (FIGURA 8).

Os esquemas dos cromossomos bandados obtidos referem-se às plantas de *C. dewevrei* de números 63 e 766. Analisando-os (FIGURAS 3, 4, 5 e 6; FIGURA 8, FOTOS C, D e F) pode-se observar que não há um padrão de bandas único para cada conjunto e que

seja ao mesmo tempo comum a todos os ideogramas. O padrão de bandas apresentado em cada cromossomo não foi suficientemente consistente, isto é, não se repetiu de maneira uniforme dentro de cada conjunto de cromossomos e entre os ideogramas, quando comparados, a ponto de servir para caracterizar precisamente cada grupo de cromossomos homólogos e estabelecer, desta forma, um cariótipo para a espécie.

Comparando-se os cromossomos bandados e agrupados com aqueles esquematizados por KRUG (1934) (FIGURA 1) com base no tamanho dos mesmos e na respectiva posição do centrômero e na ocorrência e localização da constrição secundária, observou-se que houve similaridade da ocorrência entre o segmento cromossômico não bandado com a posição da constrição primária, o centrômero, previamente determinada por KRUG (1934), bem como da constrição secundária. A maior parte dos grupos aqui estabelecidos são semelhantes ao padrão deste autor, com base nos dados do tamanho e posição das constrições primária e secundária.

Alguns grupos de cromossomos apresentaram algumas peculiaridades pela técnica de banda-C. O grupo 1 é peculiar porque, além do centrômero subterminal, apresenta no braço longo do cromossomo uma constrição secundária, não associada ao satélite, que aparece nas modificações de bandamento-C, não corada. O segmento intercalar entre o centrômero e a constrição secundária, aparece de maneira variada, ou corada, formando uma só banda, ou subdividido em duas bandas menores. Essa variabilidade pôde ser vista, porém de forma distinta, no braço curto dos cromossomos deste grupo, onde o segmento corado ocupa todo o braço ou se restringe à região pericentromérica, ou então não se cora pelo Giemsa.

O grupo 2 é o segundo em tamanho e, em dois dos quatro ideogramas apresentados (FIGURAS 3 e 4), corresponde ao grupo dos cromossomos satélite (SAT). Nas FIGURAS 5 e 6, o grupo de cromossomos que mais se aproxima da descrição acima é o de número 3. A região organizadora do nucléolo, que é a constrição secundária, permaneceu pálida, não se corando pelo Giemsa. O satélite corou-se densamente, formando uma banda única, ou, no caso da FIGURA 4 formando duas bandas pequenas.

A posição do centrômero, comparativamente, é subterminal como nos cromossomos homólogos do grupo 1.

O segmento intercalar, entre o centrômero e o organizador do nucléolo, corou-se formando uma banda única.

O grupo 2 dos ideogramas das FIGURAS 5 e 6 apresentou os cromossomos, de acordo com o tamanho, como os segundos maiores, porém, pela posição do centrômero assemelhou-se mais ao grupo 3, como proposto por KRUG (1934).

Analisando-se os ideogramas aqui apresentados e que foram obtidos através de modificações na técnica de banda-C, observa-se que não há ainda um padrão de bandamento inerente a cada conjunto cromossômico, que se repita de maneira uniforme e constante, servindo para caracterizar cada grupo individualmente. Observou-se, contudo, repetições de alguns padrões de bandas entre os conjuntos, que foram esquematizados na FIGURA 7. Nota-se a ocorrência de bandas teloméricas, pericentroméricas e centroméricas.

QUADRO V - Resultados obtidos através de modificações introduzidas nas etapas do bandamento-C:

Técnica	Ba(OH) ₂ . 8H ₂ O			2 X SSC			Giemsa/Sörensen			M	R
	TOC	t	Conc.	pH	TOC	t	pH	t	Dil.		
T ₁	50	15'	sat	7,8	65	120'	6,9	17h	1/50	7	-
T ₂	"	"	"	"	"	"	"	19h	1/100	21	+
T ₃	"	"	"	"	"	"	"	"	"	7	-
T ₄ : a	"	"	5%	"	"	60'	"	14h	"	14	-
b	"	"	"	"	"	"	"	"	"	20	-
T ₅	±22	30'	0,064M	"	"	"	6,8	"	"	14	-
T ₆	"	"	"	"	"	"	"	1h	"	20	-
T ₇	50	15'	25%	"	"	90'	6,9	3h	1/50	"	-
T ₈ : a	"	"	sat	"	"	60'	"	19h	1/100	28	+
b	"	"	"	"	"	"	"	"	1/150	"	+
T ₉	"	"	5%	"	"	"	"	"	"	14	+
T ₁₀ : a	±22	30'	25%	"	"	"	"	"	1/100	"	-
b	"	"	"	"	"	"	"	"	1/150	"	+
T ₁₁	"	"	0,07M	"	60	"	"	30'	1/100	"	-
T ₁₂	"	15'	25%	"	"	"	"	90'	"	"	-
T ₁₃ : a	50	5'	sat	"	50	"	"	30'	"	"	-
b	±22	10'	"	"	"	"	"	"	"	"	-
T ₁₄ : a	50	15'	25%	"	60	90'	"	19h	1/150	8	+
b	"	"	"	7,6	"	"	"	30'	1/50	"	-
T ₁₅	"	"	sat	7,5	65	120'	"	3h	1/150	12	+
T ₁₆	"	"	"	7,8	"	"	"	4h	"	36	+
T ₁₇ : a	"	"	"	"	"	"	"	2h30'	"	8	-
b	"	"	"	"	"	"	"	4h	"	"	+
T ₁₈ : a	"	"	"	"	"	"	"	15'	1/50	26	-
b	"	"	25%	"	"	"	"	30'	"	"	-
c	"	"	sat	"	"	"	"	1h	1/150	54	-
d	"	"	25%	"	"	"	"	2h	"	"	-
T ₁₉ : a	"	"	sat	"	"	10'	"	1h	1/80	13	-
b	"	"	"	"	"	20'	"	"	"	"	-
c	"	"	"	"	"	30'	"	"	"	"	-
d	"	"	"	"	"	40'	"	"	1/100	"	-
e	"	"	"	"	"	50'	"	"	"	"	-
f	"	"	"	"	"	60'	"	"	"	"	-

Técnica	Ba (OH) ₂ . 8H ₂ O			2 X SSC			Giemsa/Sörensen			M	R
	TOC	t	Conc.	pH	TOC	t	pH	t	Dil.		
T ₂₀ : a	55	15'	sat.	7,7	65	5'	6,7	2h	1/100	29	-
b	"	"	"	"	"	"	"	1h	1/150	"	-
c	"	"	"	"	"	10'	"	"	1/100	"	-
d	"	"	"	"	"	15'	"	2h	1/150	"	-
T ₂₁	50	15'	"	7,8	"	120'	6,8	16h	1/150	8	-
T ₂₂	"	"	"	7,7	"	"	"	1h	1/100	11	-
T ₂₃ : a	"	"	"	7,6	"	"	"	16h	1/150	15	-
b	"	"	0,07M	"	"	"	"	"	"	"	-
T ₂₄	55	"	sat.	7,7	"	"	6,7	14h	1/100	2	-
T ₂₅	"	"	"	"	"	"	"	3h	1/80	"	+
T ₂₆	"	"	"	7,9	"	"	6,9	14h	1/100	1	-
T ₂₇	"	"	"	7,8	"	"	"	15'	1/50	2	-
T ₂₈	"	"	"	"	"	"	"	12'	"	"	-

Conc. = Concentração da solução de bário.

TOC = Temperatura em graus centígrados.

t = $\left\{ \begin{array}{l} ' = \text{minutos} \\ h = \text{horas} \end{array} \right.$

M = maturação - período, em dias, que as lâminas permaneceram estocadas a 4°C após o despregamento da lâminula.

R = resultado obtido com a técnica empregada: + (positivo) → houve bandamento;
 - (negativo) → não ocorreu a formação de bandas nos cromossomos.

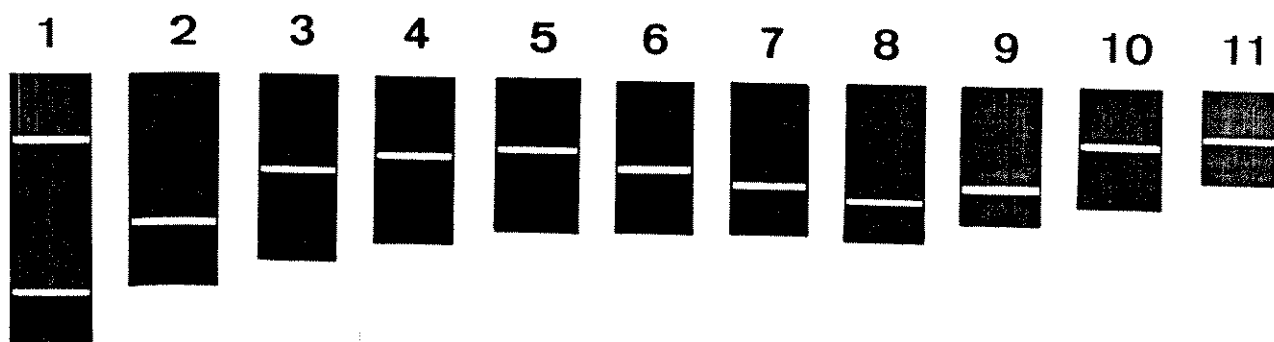


FIGURA 1 - Esquema dos cromossomos mitóticos de *C. dewevrei* segundo KRUG (1934), ordenados por seu tamanho, com a posição do centrômero de cada.

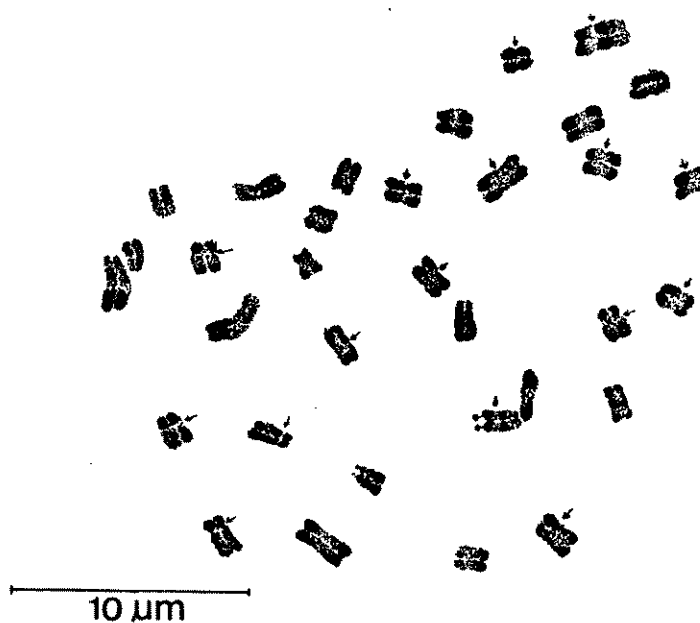


FIGURA 2 - Esquema dos cromossomos do endosperma de *C. dewevrei*, na preparação de orceína 2% (FOTO A, FIGURA 8). Setas: posição do centrômero.

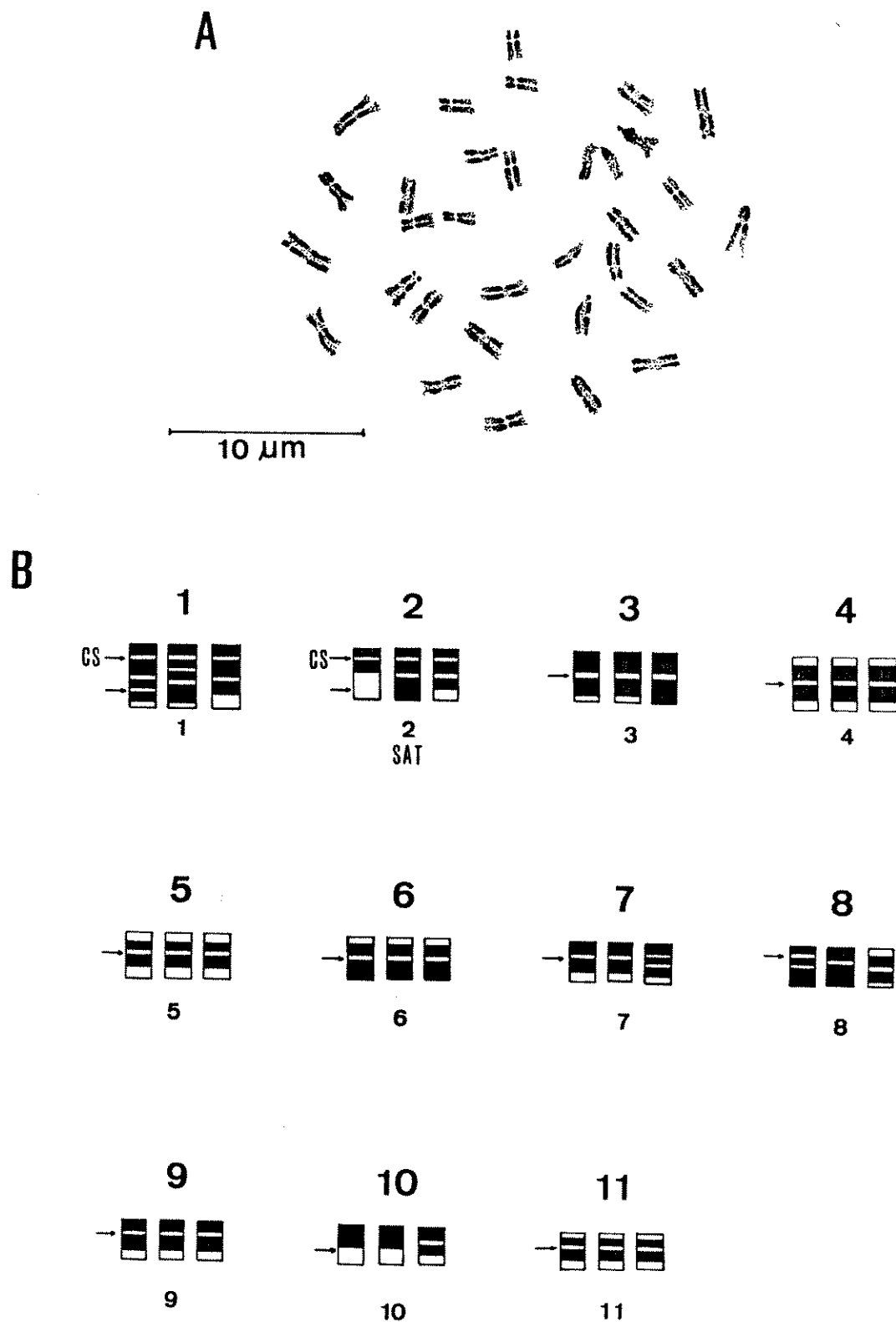


FIGURA 3 - A) Esquema dos cromossomos de *C. dewevrei*, planta 63 (FOTO C-FIGURA 8), na prometáfase, bandados pela modificação T_2 de banda-C (QUADRO V). B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

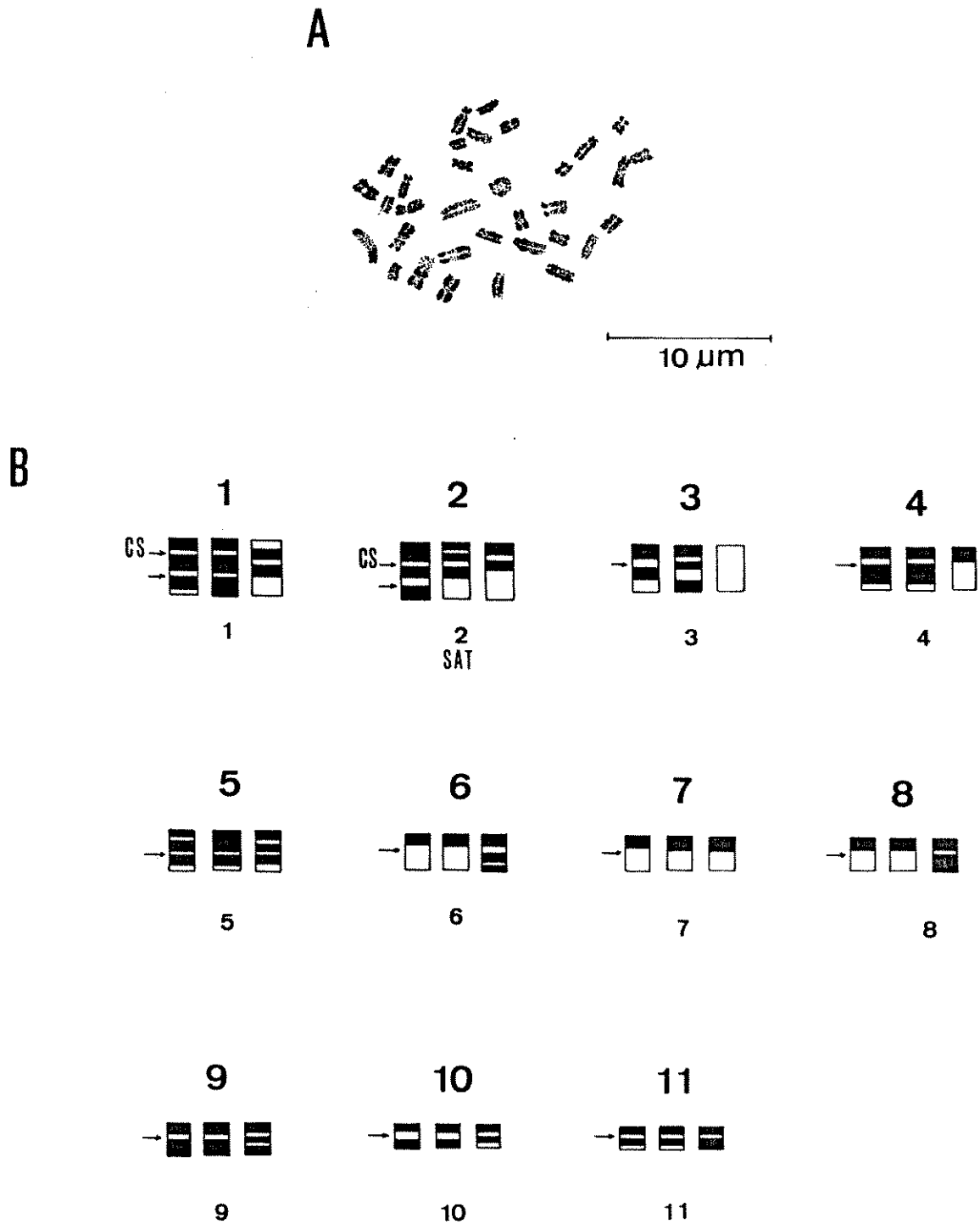


FIGURA 4 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 63, bandados pela modificação T_{14a} da técnica de banda-C. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

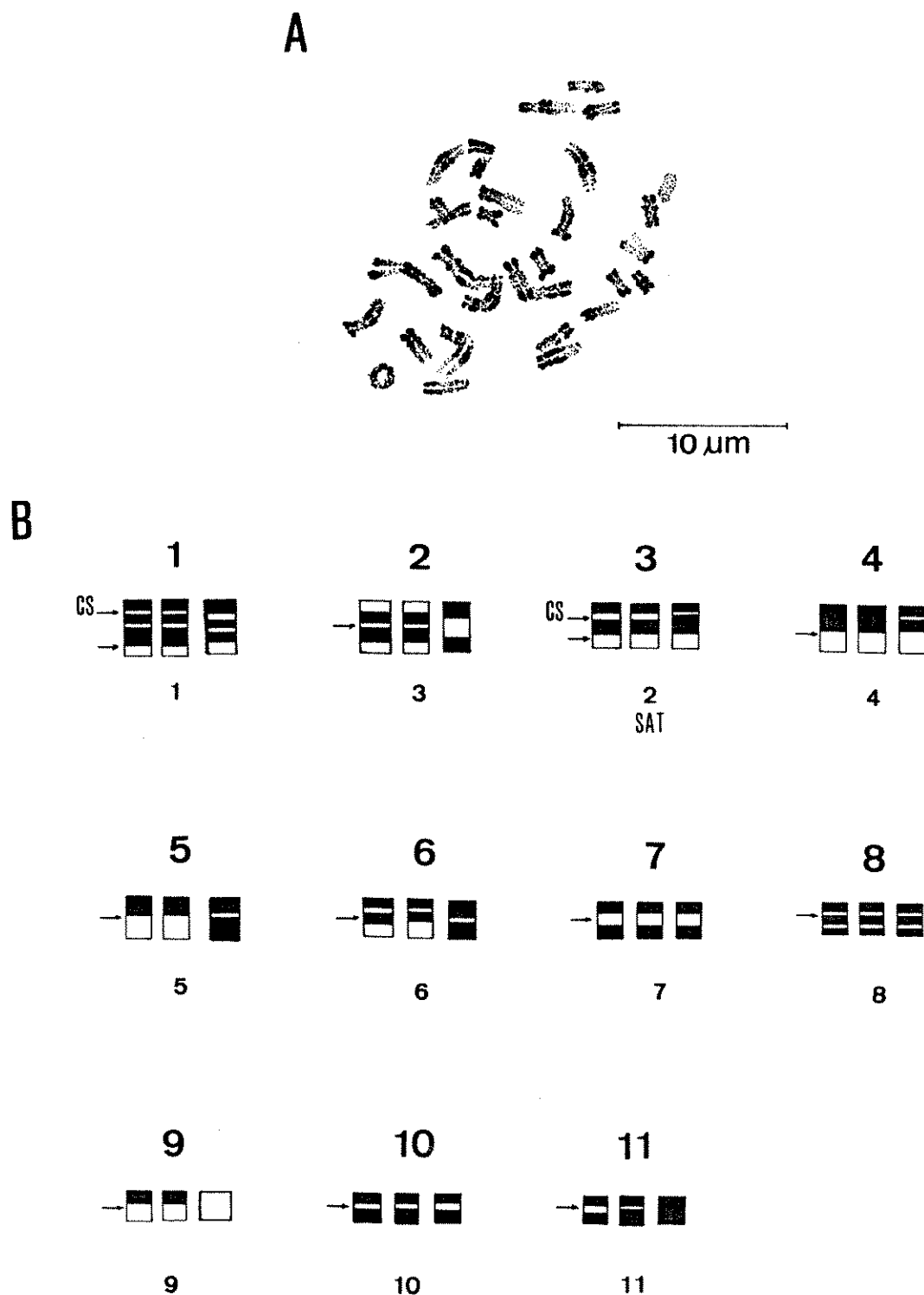


FIGURA 5 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 63, bandados pela modificação T_{15} da técnica de banda-C. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

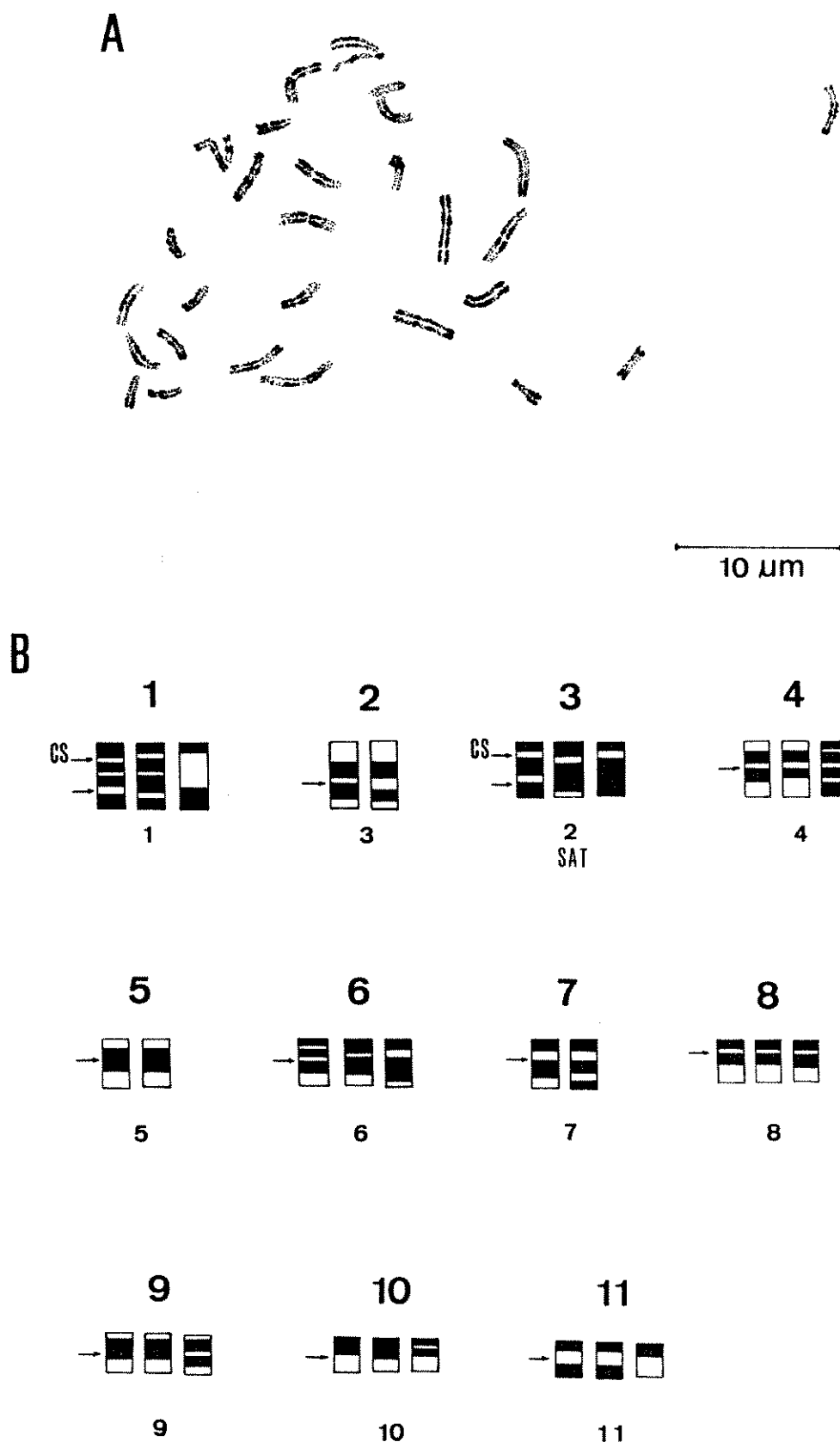


FIGURA 6 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{16} da técnica de banda-C. B) Ideogramas. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

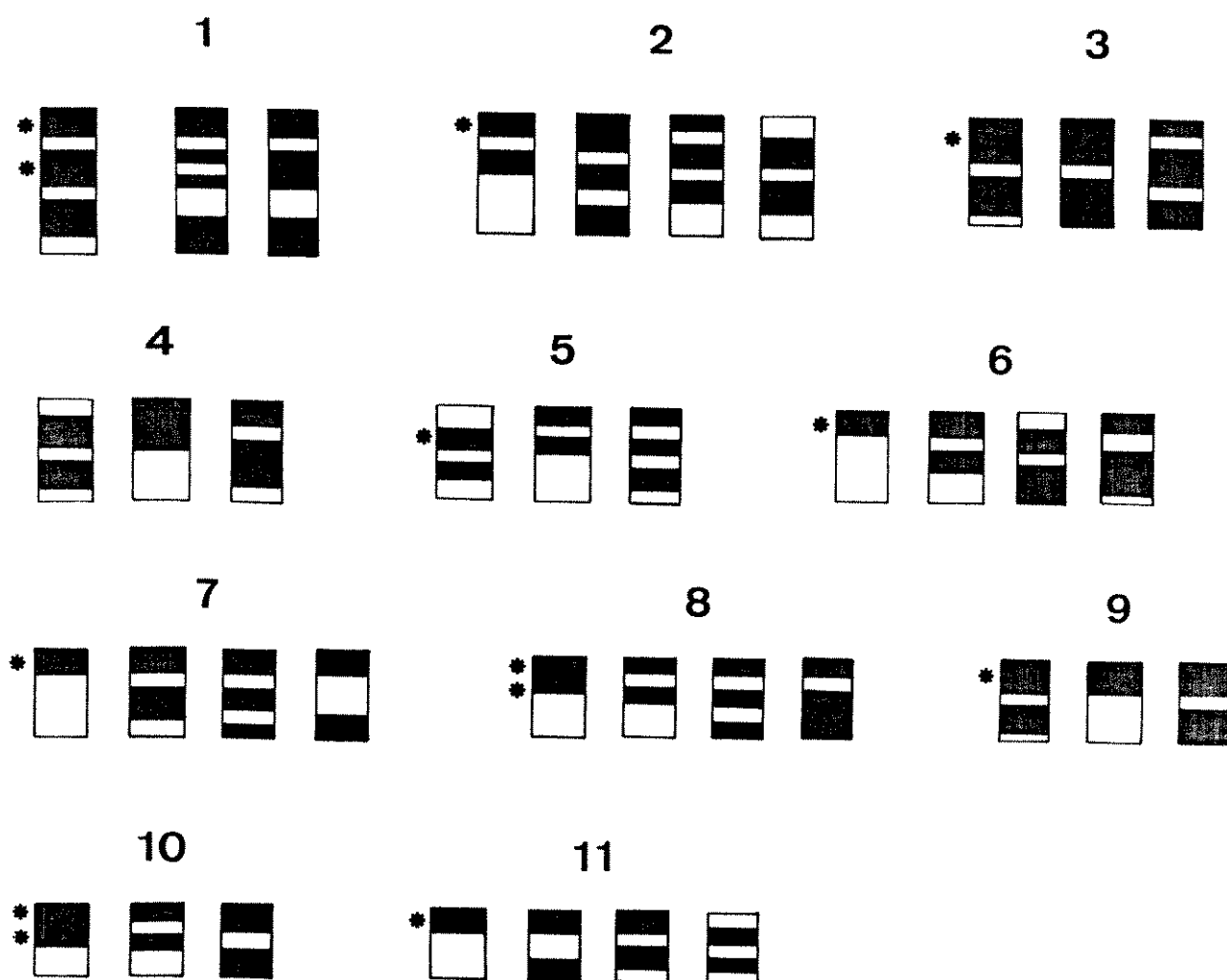


FIGURA 7 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. dewevrei* bandados pelas modificações na técnica de banda-C (QUADRO V).

O símbolo * indica as bandas que se repetiram dentro dos cromossomos de cada grupo.

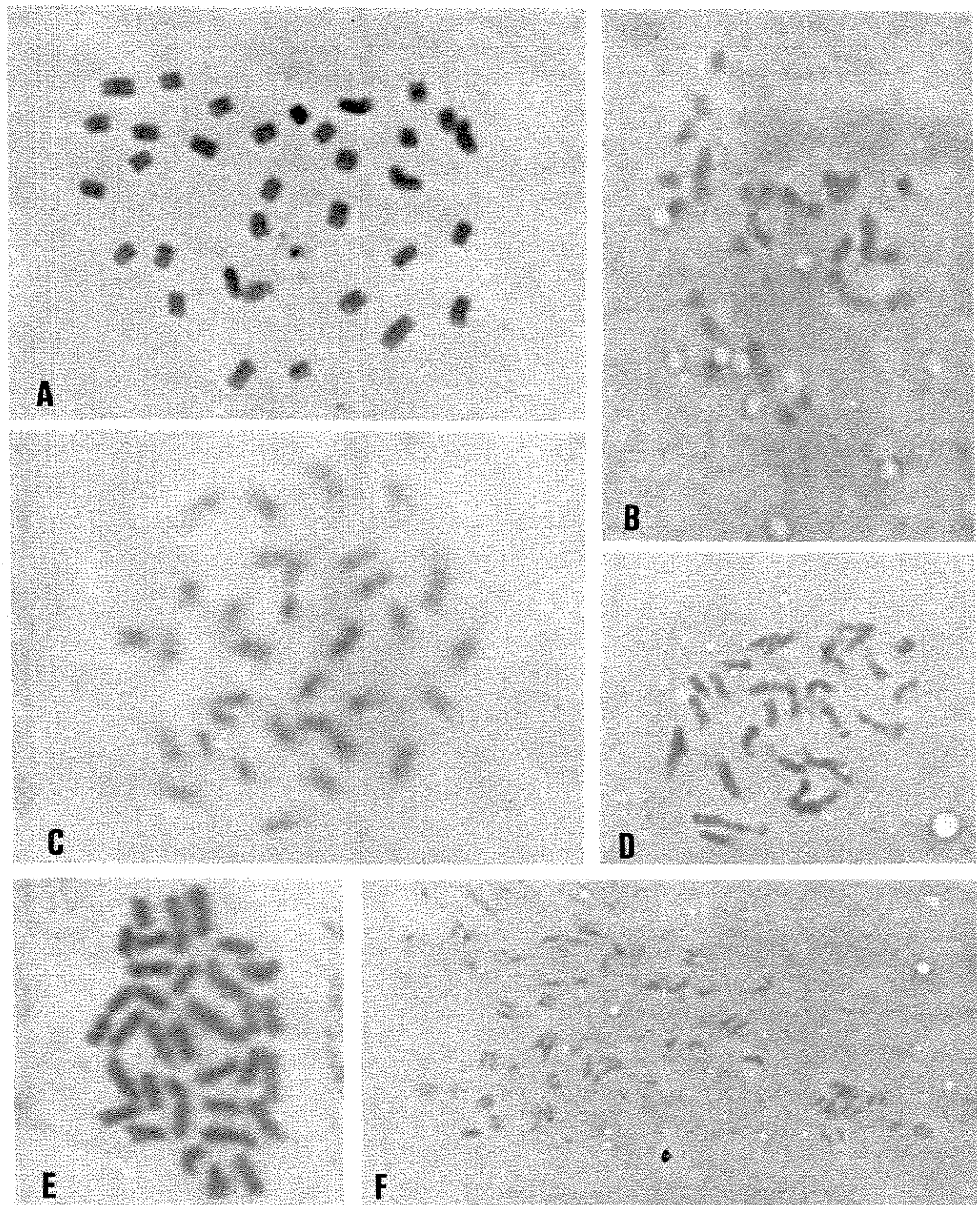


FIGURA 8 - Cromossomos prometafásicos e metafásicos de *C. dewevrei*. FOTO A - orceína acética (X 1920). FOTO B - técnica de CHINNAPPA & MORTON (1978) (X 1971). FOTO C - modificação T_2 de banda - C (QUADRO V) (X 1971). FOTO D - modificação T_{8a} (X 1577). FOTO E - modificação T_{4a} (X 1971) e FOTO F - modificação T_{16} (X 1232).

4.3.1.2. *Coffea racemosa*

Semelhantemente a *C. dewevrei*, o emprego das metodologias de banda-C, como originalmente propostas e já descritas anteriormente, não se adequaram perfeitamente aos cromossomos dos endospermas de *C. racemosa*.

Dentre as diversas modificações aqui introduzidas e, dentre aquelas que produziram resultados positivos (QUADRO V) foram obtidas somente duas células bandadas com as modificações aqui intituladas por T_{10b} e T_{17b}. Apesar de se ter utilizado as plantas de *C. racemosa* 1193-3-2, 1194-2-10, H6391, H6590, H6593, H6595, H6608 e H6609, cromossomos das células aqui esquematizados pertencem somente à planta H6595. Isso porque ocorreu uma combinação indesejável de alguns fatores nas técnicas de bandamento às quais foram submetidos os endospermas das plantas anteriormente mencionadas, excetuando-se a H6595. As demais plantas, H6611, H6612, H6613 não puderam ser utilizadas devido ao endurecimento tecidual nos endospermas causado pelas soluções fixadoras de álcool (álcool etílico absoluto e álcool etílico 90%).

Como pode se observar nos ideogramas (FIGURA 9 e 10) há poucas similaridades entre os cromossomos do mesmo grupo. Alguns poucos grupos apresentaram um padrão de bandas parecido ou igual e comuns aos dois ideogramas.

Para efeito de localização da posição do centrômero, os cromossomos e os grupos de cromossomos foram comparados com o ideograma médio proposto por BOUHARMONT (1959) para o gênero *Coffea* e que é baseado no tamanho dos cromossomos e na posição

do centrômero. Além disso, comparou-se também com o esquema de cromossomos de *C. racemosa* efetuado por este mesmo autor (BOUHARMONT, 1963). Os números colocados abaixo de cada grupo indicam com qual cromossomo proposto por esse autor é a semelhança. Pode-se observar, pelos ideogramas das FIGURAS 9 e 10, que há similaridades entre a posição do centrômero localizado por BOUHARMONT (1959) com os segmentos não bandados e que provavelmente seria o local de ocorrência da constrição primária, isto é, do centrômero.

Algumas particularidades foram observadas entre os grupos de cromossomos homólogos dos ideogramas: o grupo 1 compreende os maiores cromossomos do genoma. O centrômero é subterminal e há uma constrição secundária nítida. As bandas se formaram acima desta constrição secundária, abaixo da mesma e/ou abaixo do centrômero. O grupo 2 tem também centrômero subterminal porém, quanto à presença da constrição secundária e do satélite, assemelha-se, não ao cromossomo de número 2 de BOUHARMONT (1959) mas ao de número 4 como proposto por esse autor (BOUHARMONT, 1959).

Os demais cromossomos que compõem o genoma desta espécie de café apresentaram bandamento, como pode ser visto nas FIGURAS 9 e 10.

Ao contrário de *C. dewevrei* raça *excelsa*, onde mais de oito células foram obtidas pela técnica de banda-C, onde apenas as quatro melhores foram apresentadas, em *C. racemosa* o número de células obtidas é ainda baixo, não sendo possível tirar conclusões. Foi elaborado um esquema comparativo (FIGURA 11) onde observam-se as variações quanto a ocorrência de bandas-C entre os grupos de cromossomos e entre cromossomos de mesmo grupo.

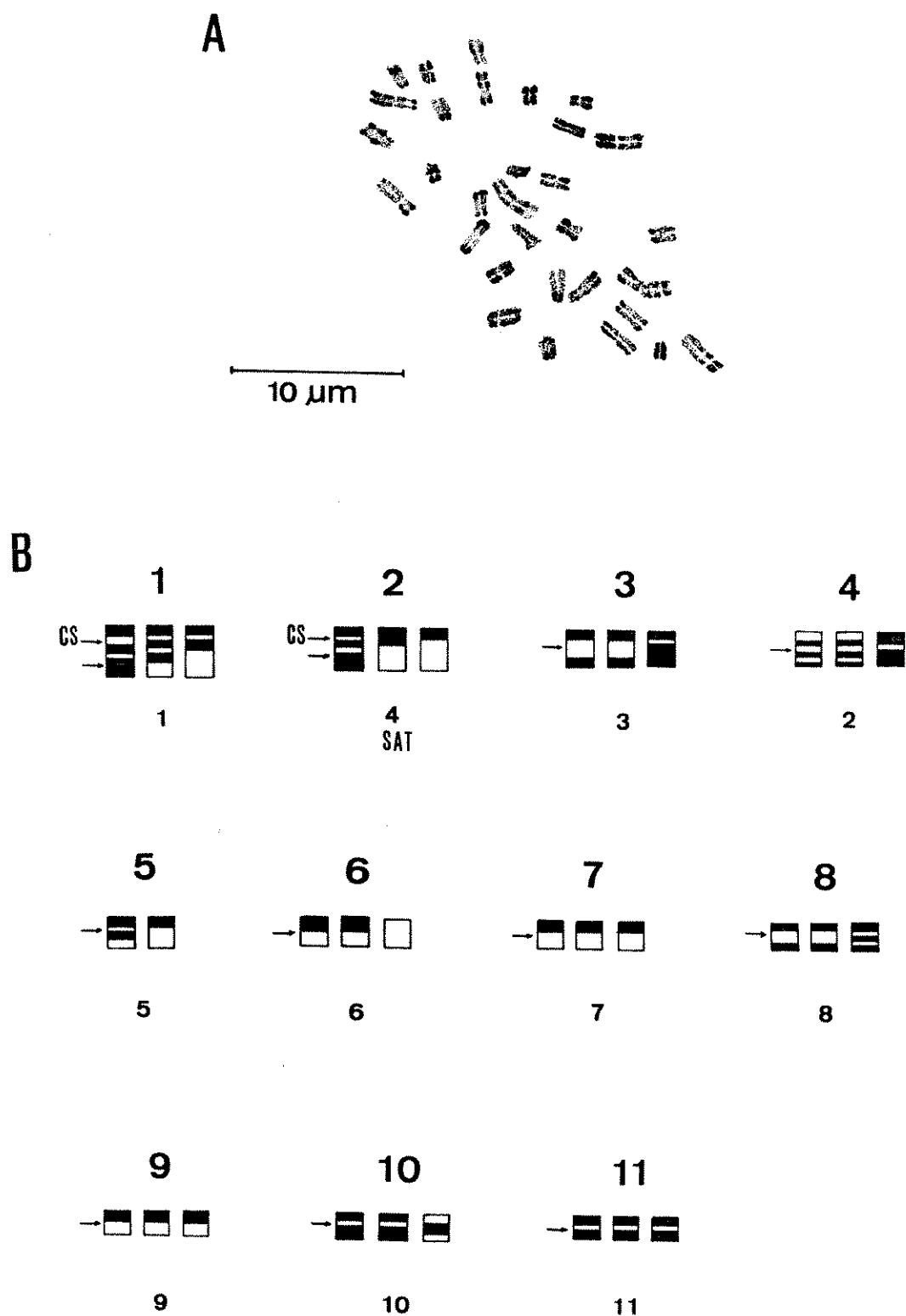


FIGURA 9 - A) Esquema dos cromossomos em prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{10b} da técnica de banda-C. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de BOUHARMONT (1959), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

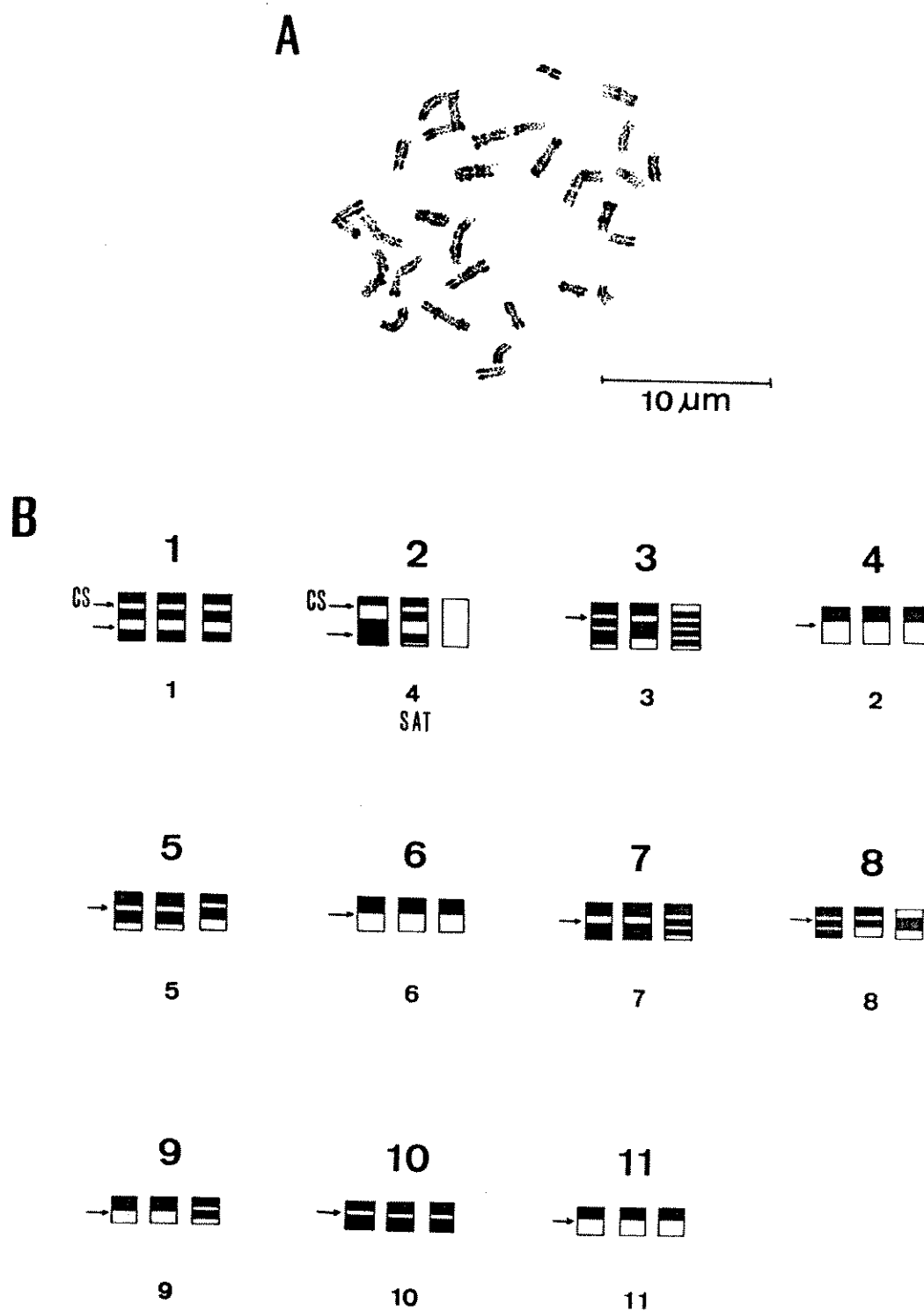


FIGURA 10 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{17b} da técnica de banda-C. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de BOUHARMONT (1959), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

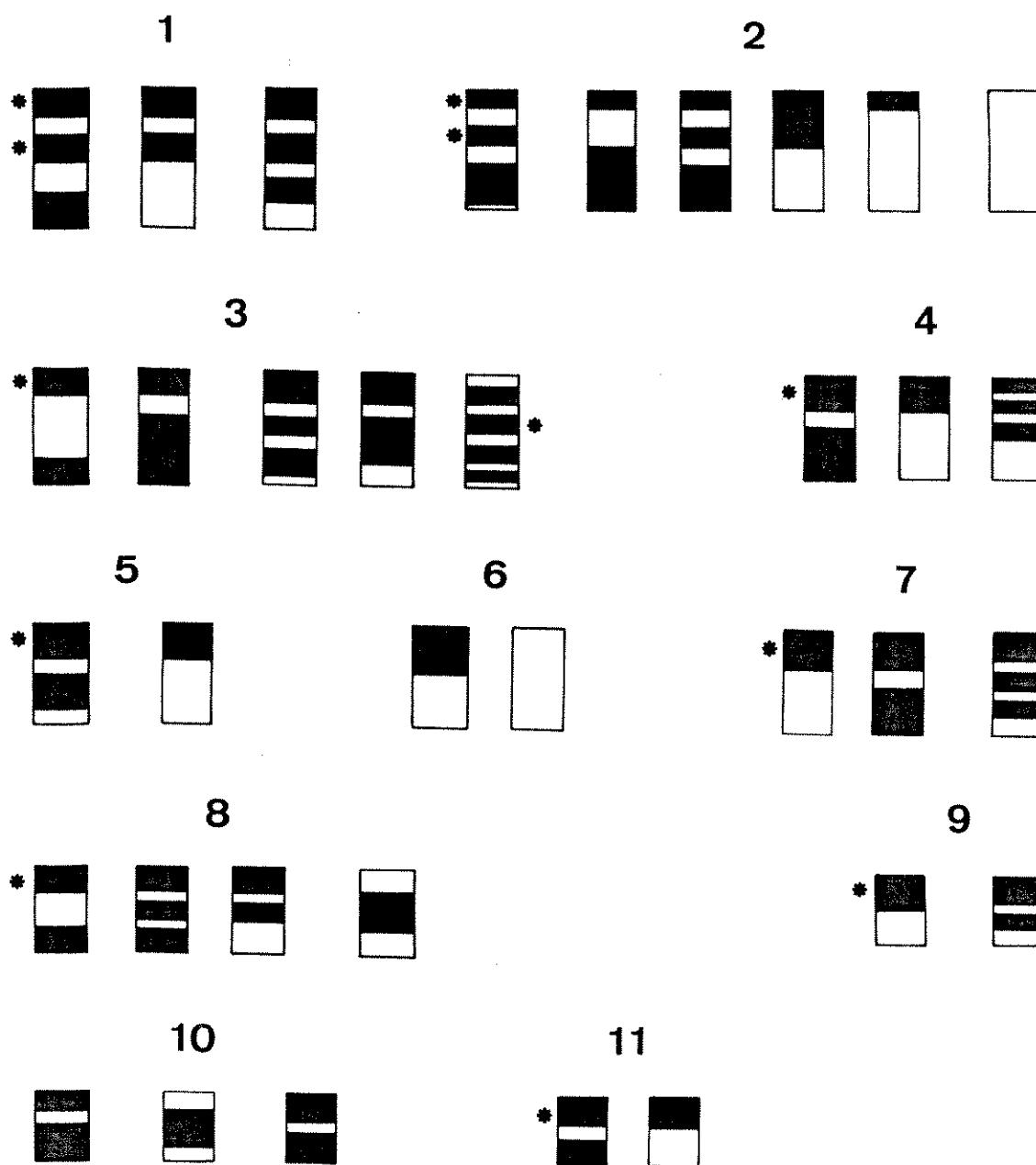


FIGURA 11 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa* bandados pelas modificações na técnica de banda-C (QUADRO V).

O símbolo * indica as bandas que se repetiram entre os cromossomos de cada grupo.

As células dos endospermas das duas espécies de café, *C. dewevrei* e *C. racemosa*, bandadas pelas técnicas empregadas por STACK & CLARKE (1973b), MOK & MOK (1976) YEN & FILION (1977) e CHINNAPPA & MORTON (1978) apresentaram os cromossomos intumescidos, homogênea e densamente corados como exemplificado na FOTO B da FIGURA 8).

4.3.2. BANDAMENTO OBTIDO COM TRIPSINA E URÉIA

4.3.2.1. *Coffea dewevrei* raça *excelsa*

Entre as duas metodologias que promovem o bandamento-G, aquela desenvolvida e aplicada por DUTRILLAUX (1973b) (QUADRO VI) e aquela utilizada por SHIRAISHI & YOSIDA (1972) (QUADRO VII), so mente a primeira foi capaz de produzir estruturas de bandas ao longo dos cromossomos desta espécie de café.

Nem todas as modificações introduzidas na metodologia de banda-G, que utiliza a tripsina, se mostraram adequadas aos cromossomos de *C. dewevrei* para a formação de bandas mas somente aquelas aqui denominadas por T_{1a}', T_{1b}', T_{1c}', T_{4a}', T_{7a}', T_{7c}', T_{8b} e T_{9a} (QUADRO VII, FOTOS B e C, FIGURA 23).

Não foram aqui apresentadas as células obtidas de cada modificação, mas somente três, as melhores e quase completas, co mo ilustração dos resultados (FIGURAS 12, 13 e 14).

Semelhantemente aos cromossomos desta mesma espécie e raça, que foram bandados pelas modificações da metodologia de ban

QUADRO VI - Resultados obtidos através de modificações nas etapas da técnica de bandamento-G que utilizou a tripsina na concentração de 0,0006%:

Técnica:	Tripsina: tempo	pH da solução tampão	Giensa/Sørensen: tempo	Giensa/Sørensen: diluição	M	R
T ₁ a:	4'	6,8	10'	1/100	18	+
b:	8'	"	7'	"	"	+
c:	"	"	5'	"	"	+
T ₂	4'	"	4'	1/80	21	-
T ₃	2'	"	7'	1/150	30	-
T ₄ a:	8'	6,6	20'	"	70	+
b:	10'	"	"	"	"	-
c:	12'	"	"	"	"	-
T ₅	4'	6,9	2h	1/100	1	-
T ₆ a:	"	6,8	15'	"	14	-
b:	"	"	"	1/150	"	-
T ₇ a:	"	"	10'	1/100	20	+
b:	"	"	"	"	19	-
c:	"	"	"	"	10	+
d:	"	"	"	"	5	-
T ₈ a:	8'	"	"	"	21	-
b:	6'	"	"	"	20	-
c:	4'	"	"	"	13	+
d:	"	"	"	"	7	-
e:	3'	"	"	"	20	-
T ₉ a:	8'	6,7	8h	1/150	14	+
b:	7'	"	"	"	17	-
c:	6'	"	"	"	22	-
d:	5'	"	"	"	17	-
e:	"	"	"	"	14	-
T ₁₀ a:	7'	6,9	20'	1/100	11	-
b:	6'	"	15'	"	"	-
c:	5'	"	20'	"	"	-

Tempo: ' = minutos
h = horas

M = maturação: tempo, em dias.
R = resultado da técnica empregada.

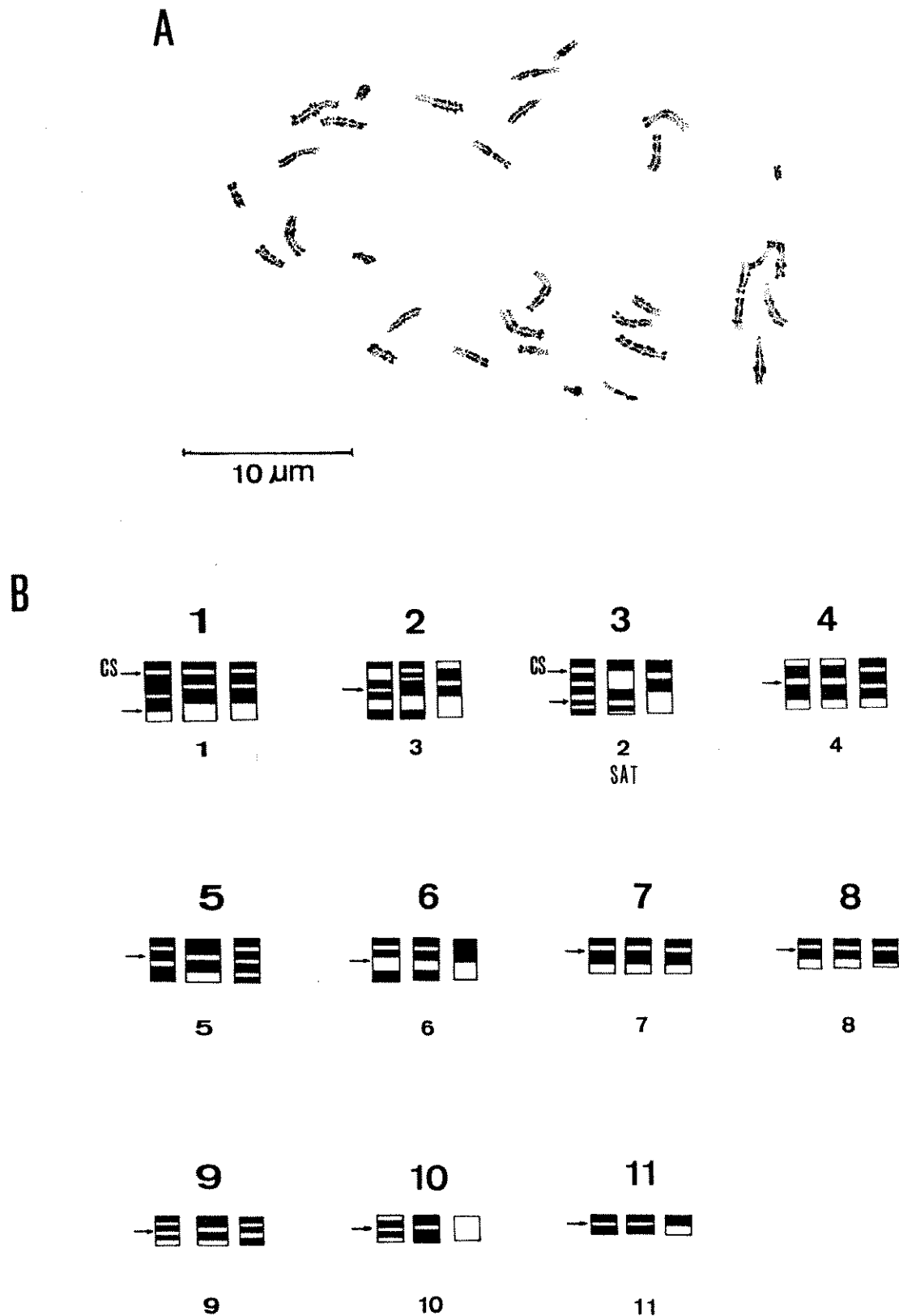


FIGURA 12 - A) Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1a} de banda-G, com tripsina (QUADRO VI) (FOTO B, FIGURA 23). B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

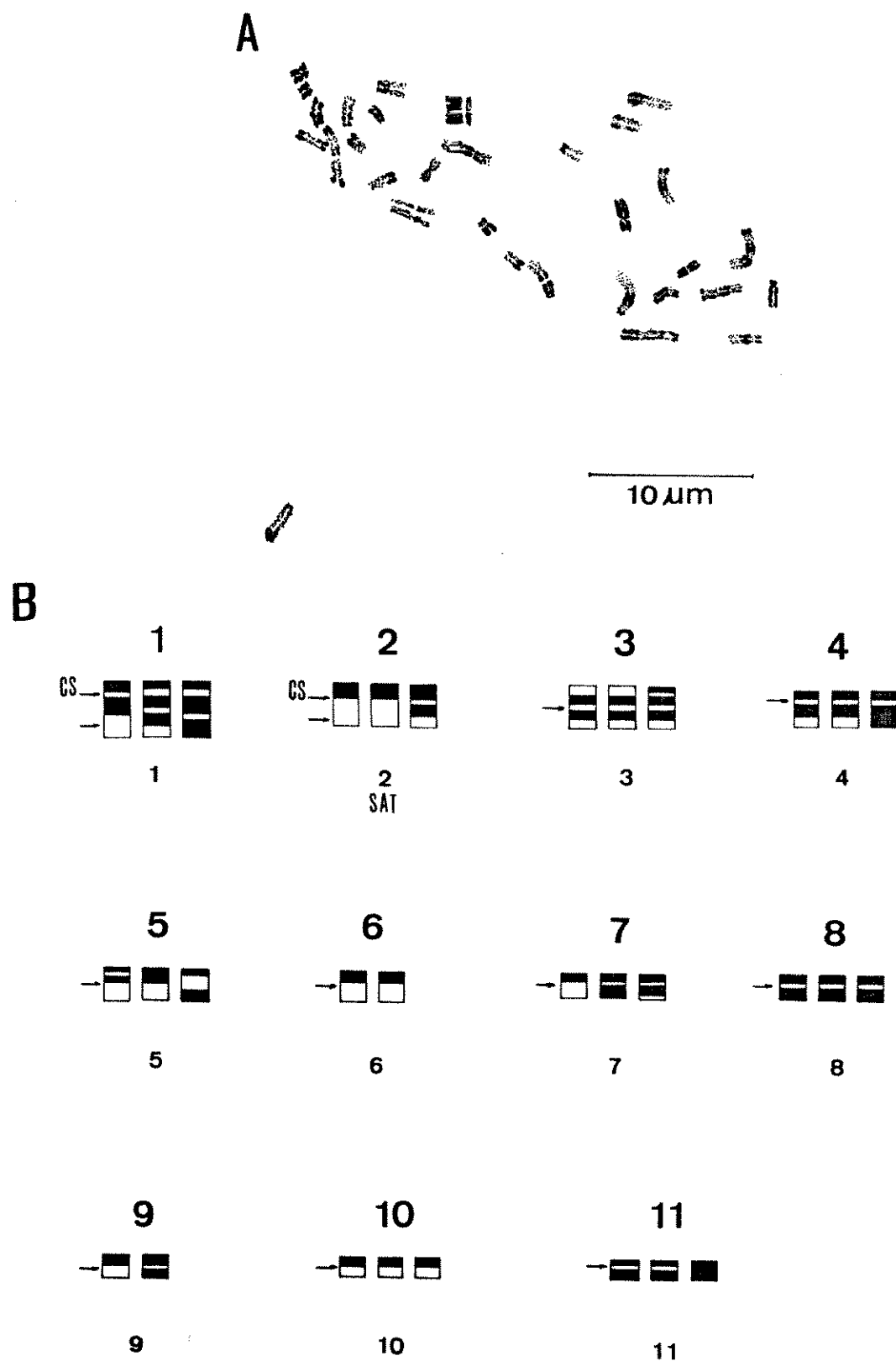


FIGURA 13 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1b} de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

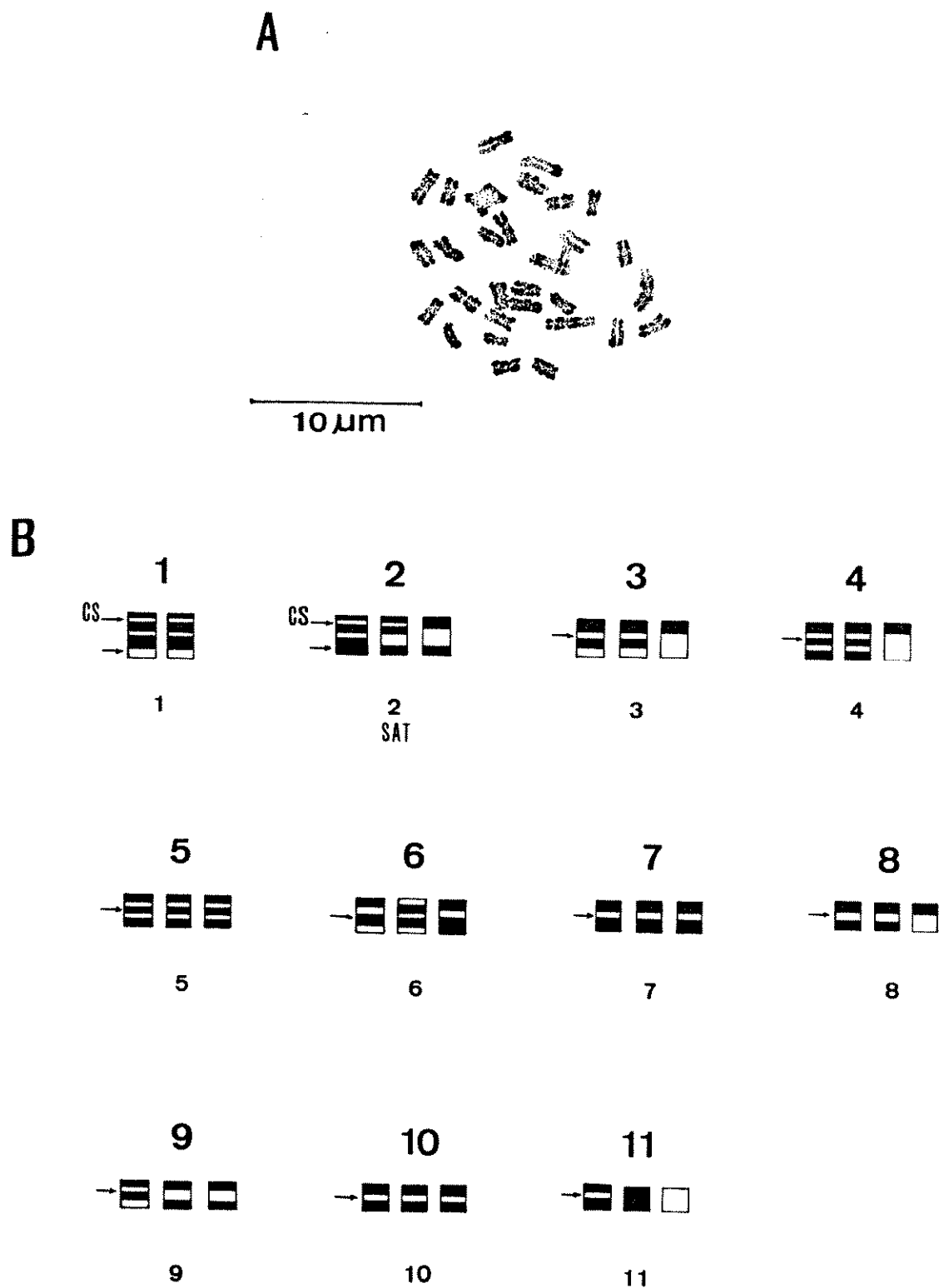


FIGURA 14 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{1C} de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

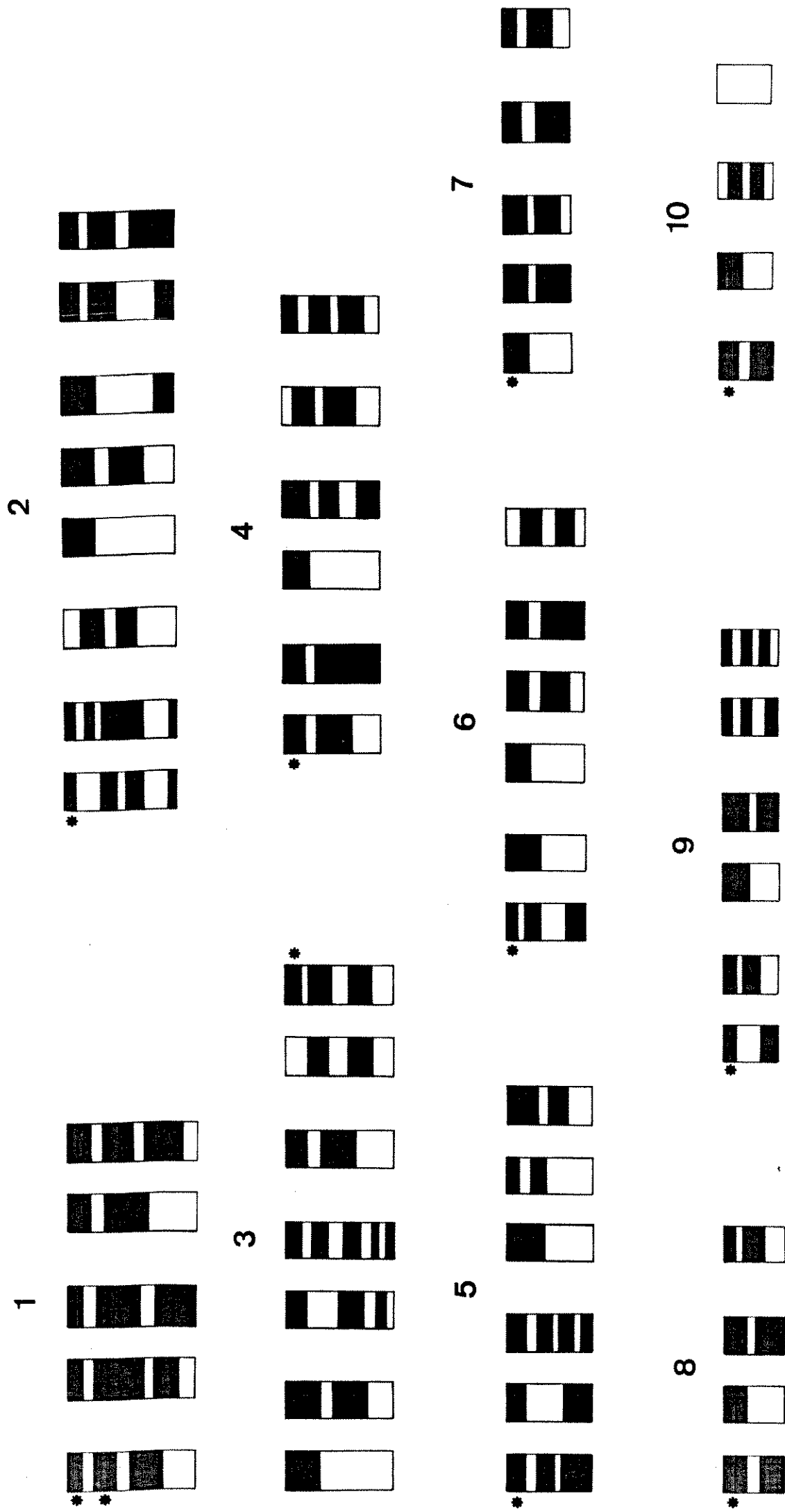


FIGURA 15 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. deweyi*, planta 766, mostrando as variações de bandas obtidas com o emprego das modificações na metodologia de banda-G que utiliza a tripsina (QUADRO VI).

O símbolo * indica as bandas que se repetiram entre os cromossomos dos grupos.

da-C, compararam-se os grupos com os cromossomos esquematizados por KRUG (1934) para esta raça, *C. dewevrei* raça *excelsa*, pelo tamanho e posição do centrômero.

Os três ideogramas obtidos foram resumidos comparativamente na FIGURA 15.

Através do esquema comparativo da FIGURA 15, observa-se que houve muitas variações, quanto a ocorrência e posição das bandas dentro de um mesmo grupo de cromossomos homólogos e entre cromossomos homólogos bandados por modificações diferentes. Houve a formação de bandas teloméricas, bandas que ocorreram em todo o braço curto de alguns cromossomos, bandas intercalares, centroméricas e pericentroméricas.

Entre os cromossomos dos onze grupos de homólogos, um cromossomo do grupo 10 e outro do grupo 11, apresentaram uma particularidade, a ausência da formação de bandas, como observado pela FIGURA 15.

4.3.2.2. *Coffea racemosa*

Os resultados obtidos com o emprego de tripsina para a formação de bandas em *C. racemosa* foram restritos a uma célula. Apesar de se ter utilizado diversos endospermas dos espécimens de *C. racemosa*, somente foi possível encontrar uma única célula com bandamento, a qual foi obtida a partir da modificação T_{4a} na metodologia de DUTRILLAUX (1973b) (QUADRO VI e FOTO C, FIGURA 23).

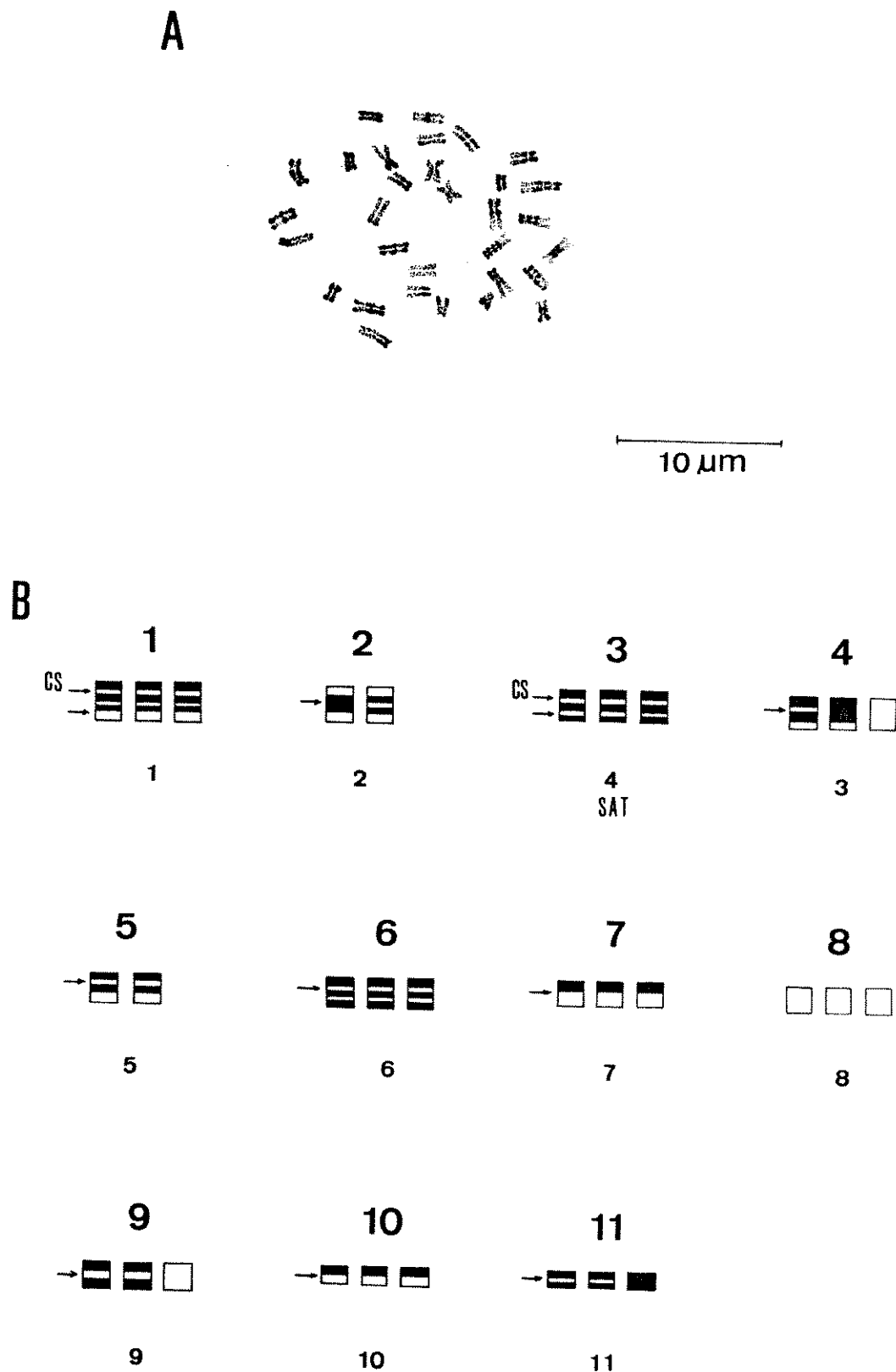


FIGURA 16 - A) Esquema dos cromossomos em metáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{4a} da técnica de banda-G, com tripsina (QUADRO VI). B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de BOUHARMONT (1959), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

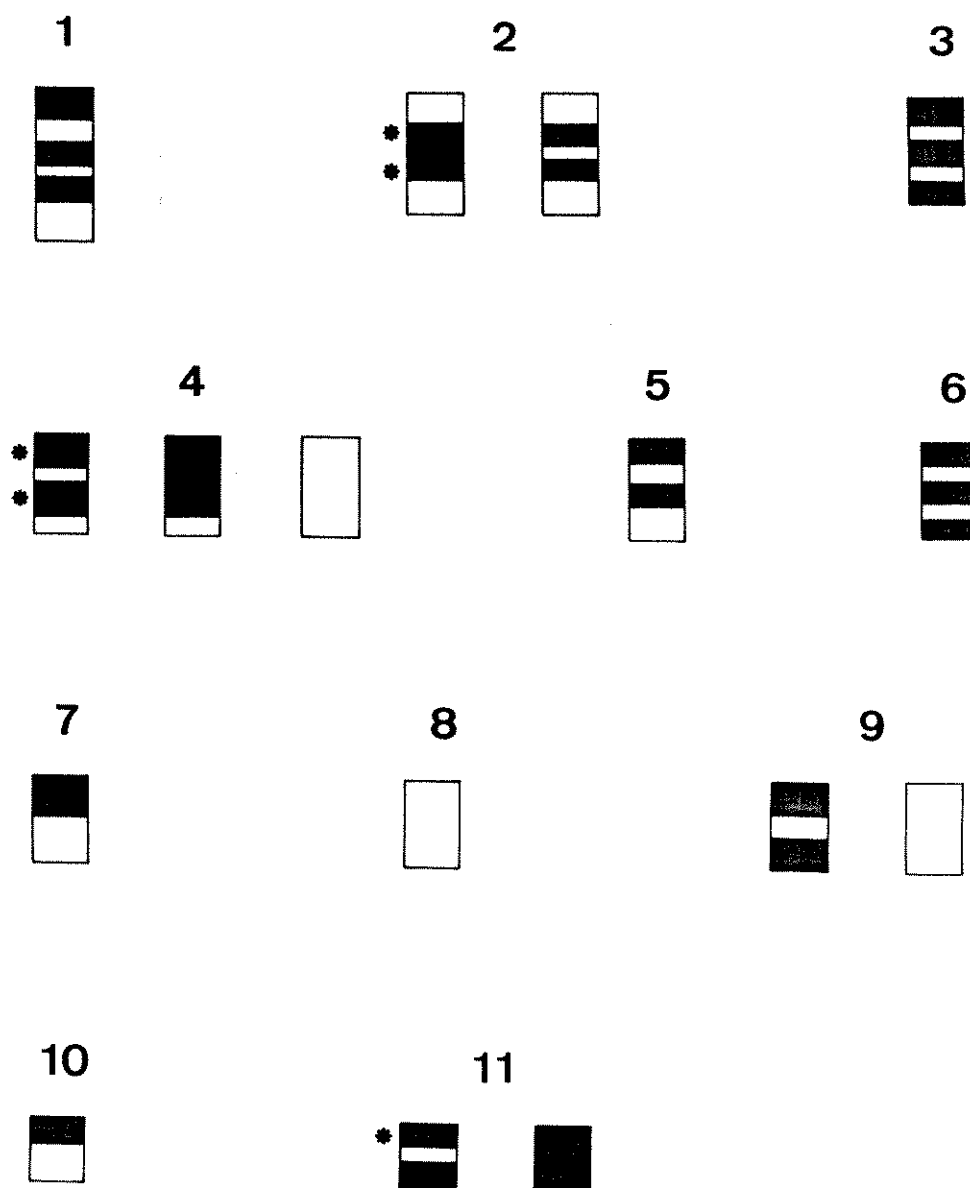


FIGURA 17 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa*, planta H6595, bandados pela modificação T_{4a} da técnica de banda-G, com tripsina (QUADRO VI).

O símbolo * indica as bandas que repetiram nos cromossomos de alguns grupos.

As demais preparações citológicas das modificações na técnica de DUTRILLAUX (1973b) que exibiram resultados positivos quanto à promoção de bandas (QUADRO VI), apresentaram células desta espécie de café em prometáfase ou metáfase, não sendo possível saber com exatidão se tais modificações também são adequadas a essa espécie assim como foram para *C. dewevrei*.

Através da FOTO C (FIGURA 23), dos esquema e ideograma das FIGURAS 16 e 17, podemos observar que há alguns grupos de cromossomos muito uniformes. Comparando-se com o ideograma médio proposto por BOUHARMONT (1959), notou-se que houve correspondência dos locais não bandados com a posição do centrômero considerada por este autor.

O emprego da modificação T_{4a} da técnica de bandamento-G com o uso de tripsina, nesta única célula obtida de *C. racemosa*, mostrou a ocorrência das bandas teloméricas, centroméricas e pericentroméricas. Além disso, pôde-se notar a não formação aparente de bandas em alguns cromossomos como naqueles dos grupos 4 e 9, além de um grupo inteiro de cromossomos, o grupo 8.

4.3.3. Bandamento com impregnação pela prata (NOR)

4.3.3.1. *C. dewevrei* raça *excelsa*

As modificações na metodologia NOR, T_{2a} , T_{2b} , T_{2c} , T_{3e} e T_{3g} foram adequadas para promoverem a formação de bandas nos cromossomos dessa espécie (FIGURA 23 - FOTO G). As modificações T_{3f} e T_{3h} produziram boa impregnação, embora as células em metáfase

fase ou em prometáfase estivessem fragmentadas, devido ao banho em nitrogênio líquido, e com poucos cromossomos. Dentre esses poucos cromossomos, alguns estavam totalmente impregnados pela prata enquanto outros, mostravam a formação de bandas.

A melhor célula obtida de *C. dewevrei* com estas modificações foi esquematizada. Pertence à planta 766. As demais células bandadas estavam incompletas e algumas não apresentaram bom espalhamento cromossômico, havendo sobreposição de alguns cromossomos o que dificultava a interpretação, bem como a caracterização dos mesmos.

A despeito de se ter usado a planta 63, não se conseguiu células em prometáfase ou em metáfase. Supõe-se que as células em divisão tenham caído durante o despregamento da lâmina e, subsequente banho em álcool 100%. Isto porque o exame do material, em contraste de fase e antes do despregamento da lâmina revelou a existência de células em divisão.

Pelo esquema e ideograma da FIGURA 18, pelo exame do esquema comparativo da FIGURA 19 e pela FOTO G (FIGURA 23), alguns cromossomos apresentaram uma impregnação em apenas um dos segmentos da cromátide, lembrando metade de uma banda. Esse evento pode ser visto nos cromossomos do grupo 1 e do grupo 8 (FIGURAS 18 e 19 e FOTO G da FIGURA 23, como indicado pela seta).

A impregnação pela prata ocorreu nas regiões ao redor do centrômero, no satélite, no segmento cromossômico acima da constrição secundária, do grupo 1, ou em todo braço curto de alguns cromossomos ou em todo o cromossomo.

QUADRO VII - Resultados obtidos com as modificações das etapas da técnica de bandamento-G que utilizou a uréia em diluição de 3 partes para uma de tampão (3:1), em diferentes modalidades:

Técnica:	Uréia (3:1) concent. (Molar)	tempo	pH da solução tampão	Giemsa/Sørensen: tempo	diluição	M	R
T ₁ a:	8	8'	6,9	10'	1/100	18	-
b:	"	"	"	5'	"	"	-
T ₂ a:	"	"	"	2'	1/50	21	-
b:	2	2'	6,8	10'	1/100	14	-
c:	"	"	"	"	"	8	-
d:	"	4'	"	"	"	14	-
e:	"	"	"	"	"	8	-
f:	"	6'	"	"	"	21	-
g:	"	"	"	"	"	14	-
h:	"	8'	"	"	"	21	-
i:	"	"	"	"	"	8	-
T ₃ a:	1	4'	6,7	15h	1/150	15	-
b:	"	6'	"	"	"	"	-
c:	"	8'	"	"	"	"	-
d:	"	10'	"	"	"	17	-

QUADRO VIII - Resultados obtidos através de modificações nas etapas da técnica de bandamento pela impregnação da prata (NOR) com o uso de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃):

Técnica:	Solução Aquosa de AgNO ₃		M	R
	Concentração (%)	tempo		
T ₁ a:	50	1h	43	-
b:	"	2h	"	-
c:	"	3h	"	-
T ₂ a:	"	10'	2	+
b:	"	20'	"	+
c:	"	30'	"	-
d:	"	1h	"	-
e:	"	2h	"	-
T ₃ a:	8	30'	4	-
b:	"	"	60	-
c:	"	40'	4	-
d:	"	"	60	-
e:	"	1h	4	+
f:	"	"	60	±
g:	"	2h	4	+
h:	"	"	60	+

Concent. = concentração da solução de uréia (QUADRO VII) em molaridade (Molar).
M = maturação, período, em dias, que as lâminas permaneceram estocadas a 4°C.
R = resultados obtidos: + (positivo) = houve bandamento; - (negativo) = não houve bandamento; e ± (mais ou menos) = bandamento em algumas células e em outras não. (QUADROS VII e VIII).

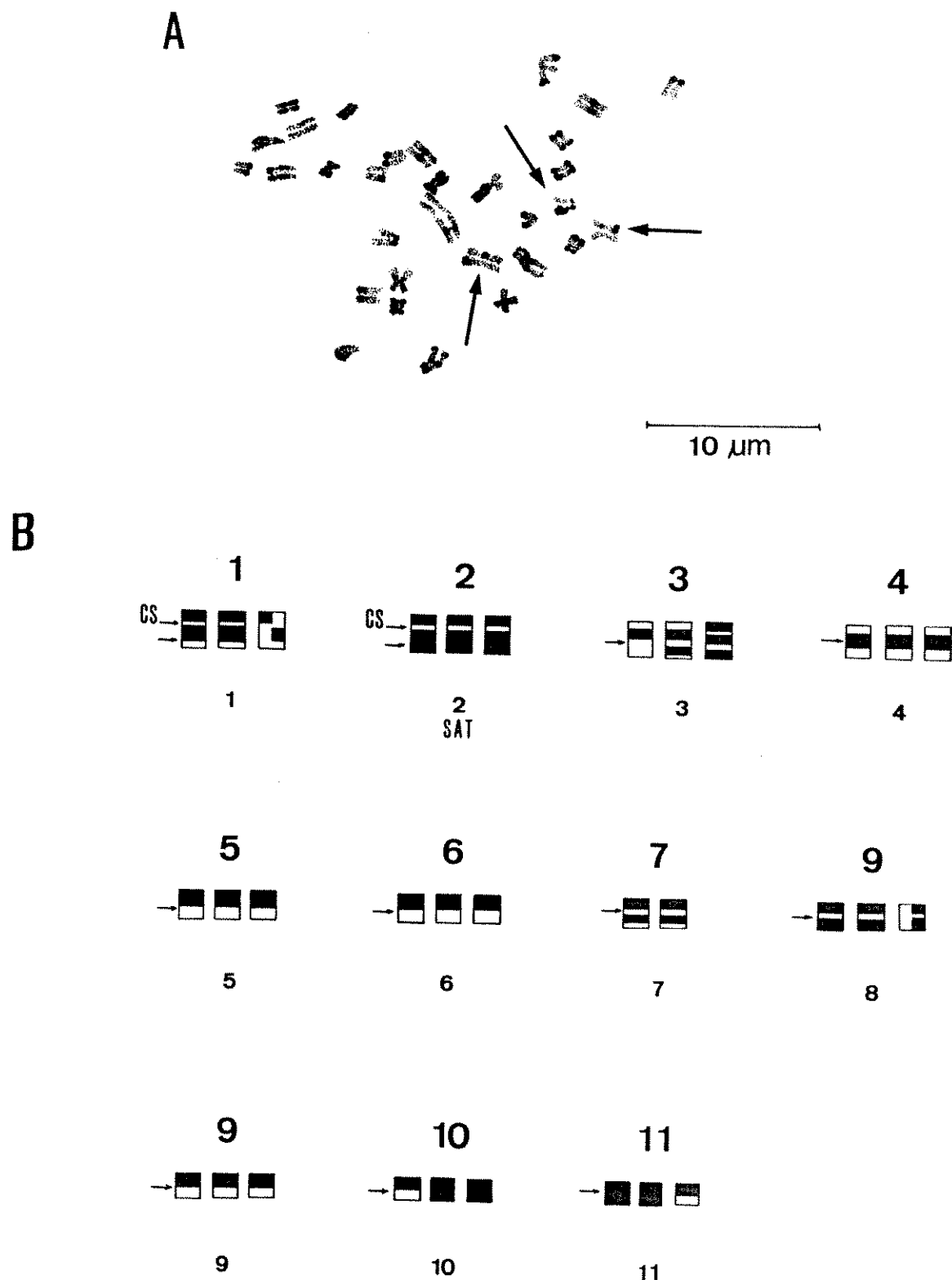


FIGURA 18 - Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{2b} da técnica NOR (impregnação pela prata) (FOTO G, FIGURA 23) - (QUADRO VIII). Setas: bandas assimétricas. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de KRUG (1934), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

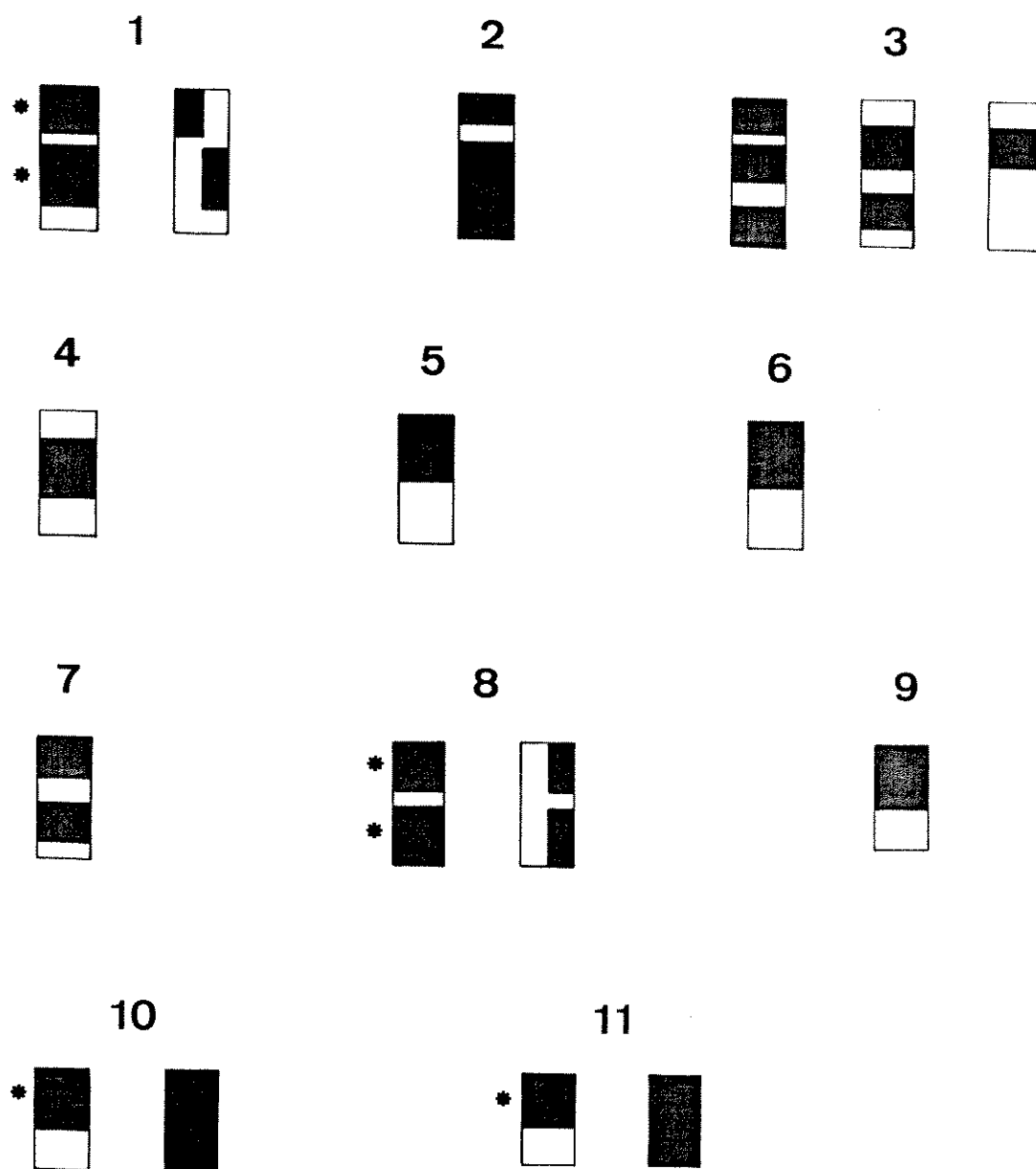


FIGURA 19 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. dewevrei*, planta 766, bandados pela modificação T_{2b} da técnica NOR (impregnação pela prata) (QUADRO VIII).

O símbolo * indica as bandas que se repetiram nos cromossomos de alguns grupos.

4.3.3.2. *C. racemosa*

Para esta espécie, foram selecionados dois ideogramas, dos cinco obtidos, que melhor representaram as diferenças encontradas com as modificações da metodologia NOR (QUADRO VIII), (FIGURAS 20, 21 e 22; FIGURA 23 - FOTOS D e F).

Semelhantemente a *C. dewevrei*, observou-se nestas preparações com a impregnação pela prata, a ocorrência de alguns cromossomos com apenas um dos segmentos da cromátide bandados, como é o caso dos cromossomos dos grupos 1, 2, 5, 6, 7 e 8 (FIGURA 22).

A impregnação pela prata, nestas células do endosperma de *C. racemosa*, pareceu mais homogênea quanto a formação de bandas que aquela que ocorreu com o emprego das técnicas de bandamento-C e com o emprego da tripsina.

Os resultados obtidos com o emprego das modificações das técnicas de bandas-C, -G e NOR, em *C. racemosa*, não revelaram a presença de um segundo grupo de cromossomos nucleolares (SAT) como observado por MAGLIO (1983). Provavelmente, esse conjunto seja constituído por cromossomos situados entre os menores do genoma, os quais não mostraram diferenças aparente da região SAT.

Os resultados obtidos em *Hippeastrum psittacinum*, através do emprego das metodologias de banda-C não foram semelhantes, sendo até o oposto àqueles obtidos em *C. dewevrei* e *C. racemosa*.

A única metodologia que se mostrou relativamente adequada a ponto de produzir diferenciação em bandas nos cromosso-

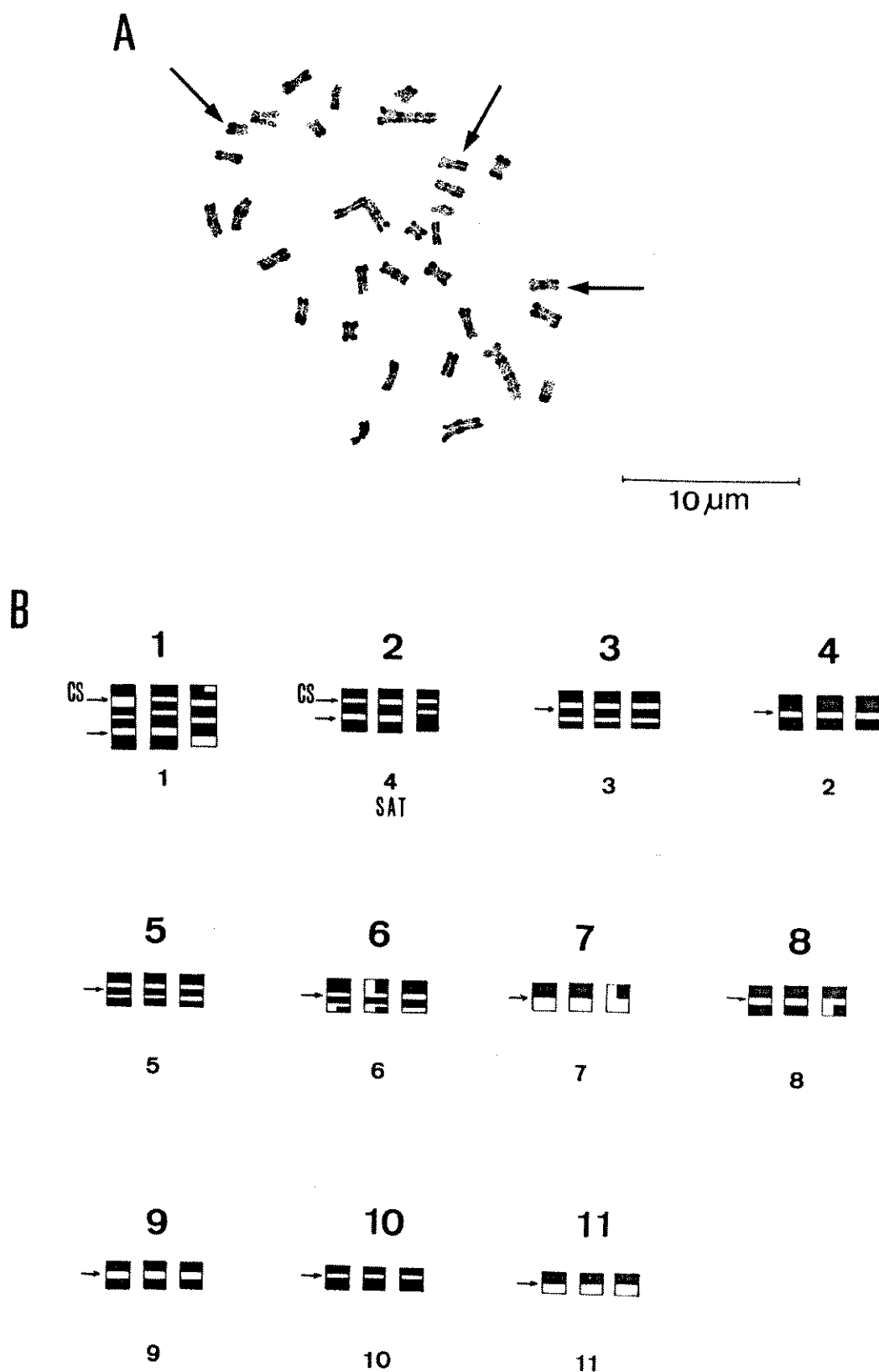
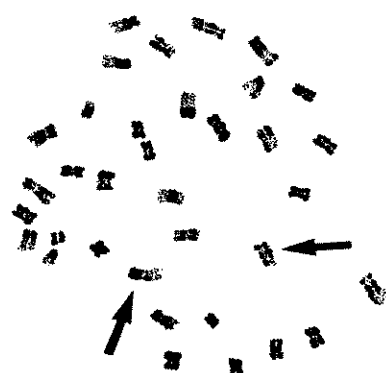


FIGURA 20 - A) Esquema dos cromossomos em prometáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta 1193-3-2, bandados pela modificação T_{2a} da técnica NOR (impregnação pela prata) (FOTO F, FIGURA 23) (QUADRO VIII). Setas: assimetria de bandas. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de BOUHARMONT (1959), a localização do centrômero e, os números logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

A



10 μm

B

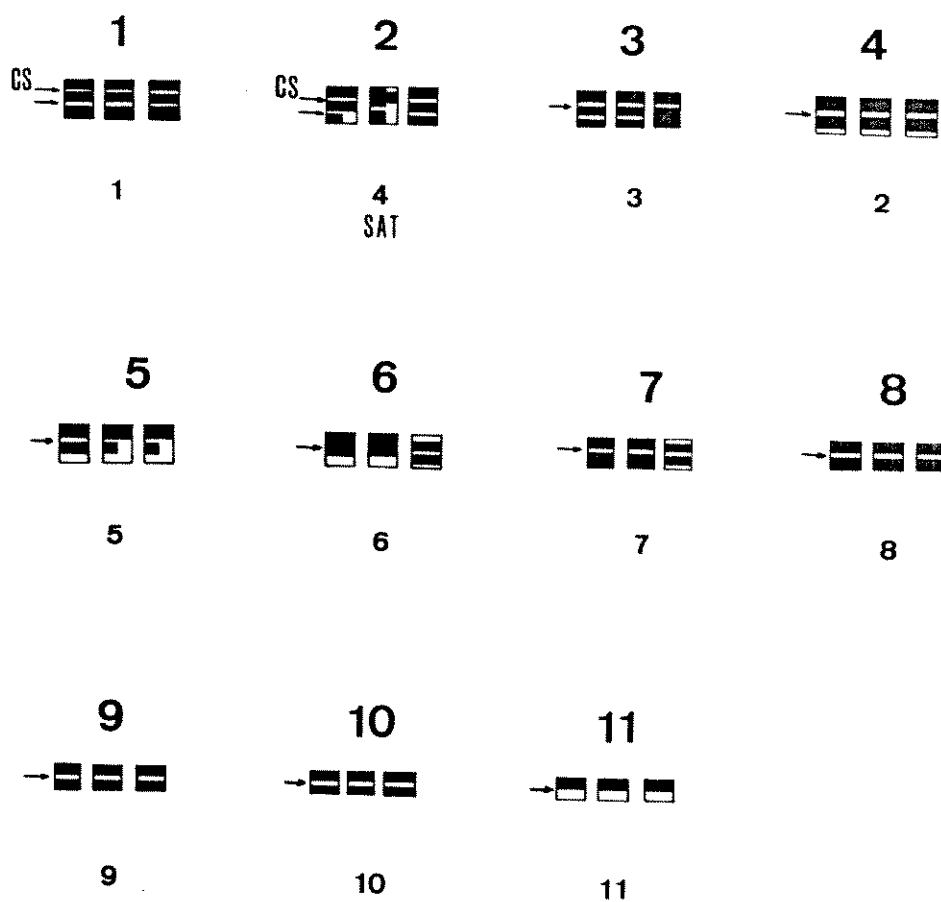


FIGURA 21 - A) Esquema dos cromossomos na metáfase de uma célula do endosperma de *C. racemosa*, planta 1194-2-10, bandados pela modificação T_{3e} da técnica NOR (impregnação pela prata) (FOTO D, FIGURA 23) (QUADRO VIII). Setas: bandas assimétricas. B) Ideograma. As setas indicam, de acordo com o esquema de BOUHARMONT (1959), a localização do centrômero e, os número logo abaixo dos grupos indicam a similaridade com os cromossomos esquematizados por este mesmo autor. CS = constrição secundária.

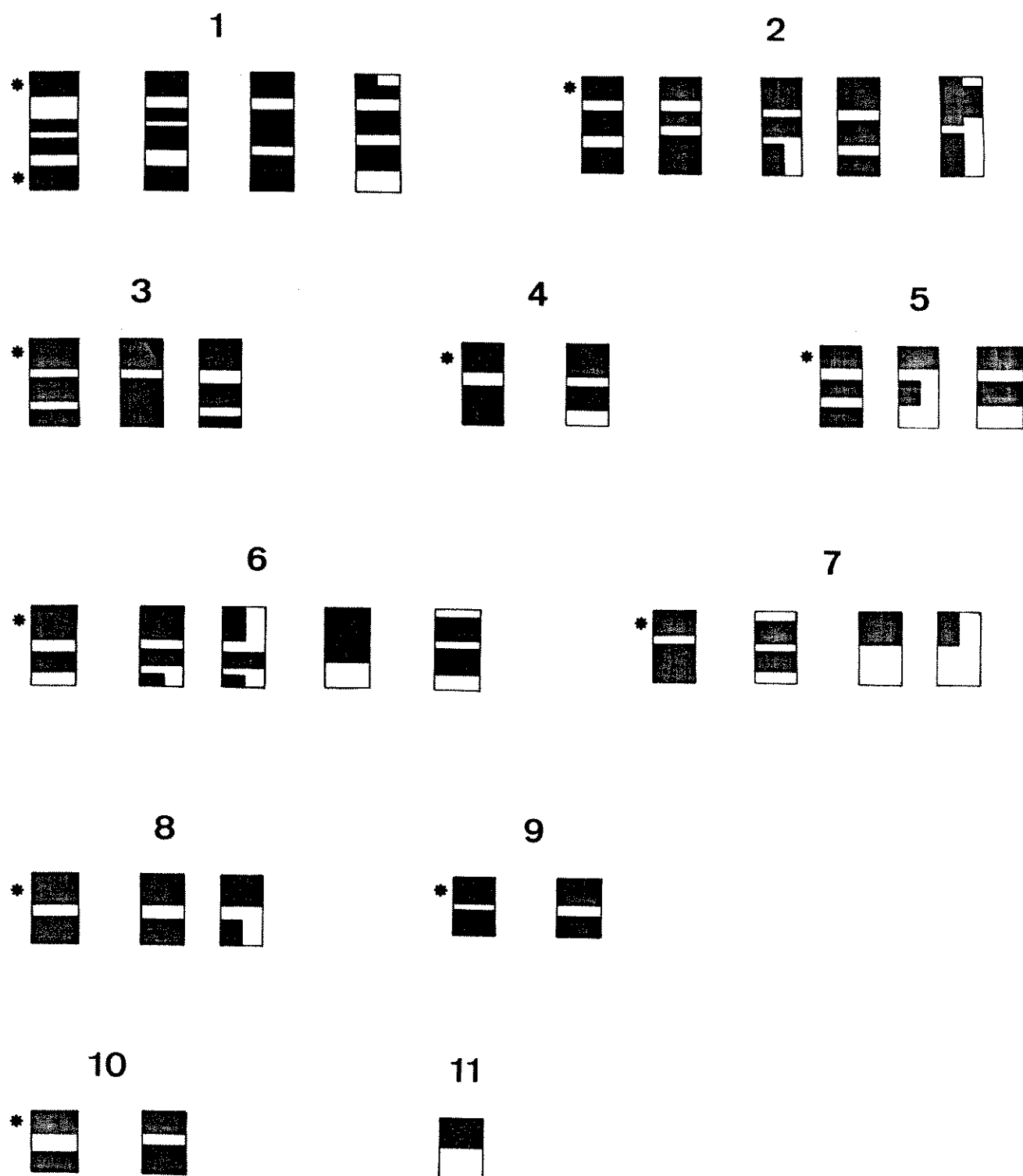


FIGURA 22 - Esquema comparativo dos cromossomos de *C. racemosa* bandados pelas modificações na técnica NOR (impregnação pela prata) (QUADRO VIII).

O símbolo * indica as bandas que se repetiram nos cromossomos de alguns grupos.

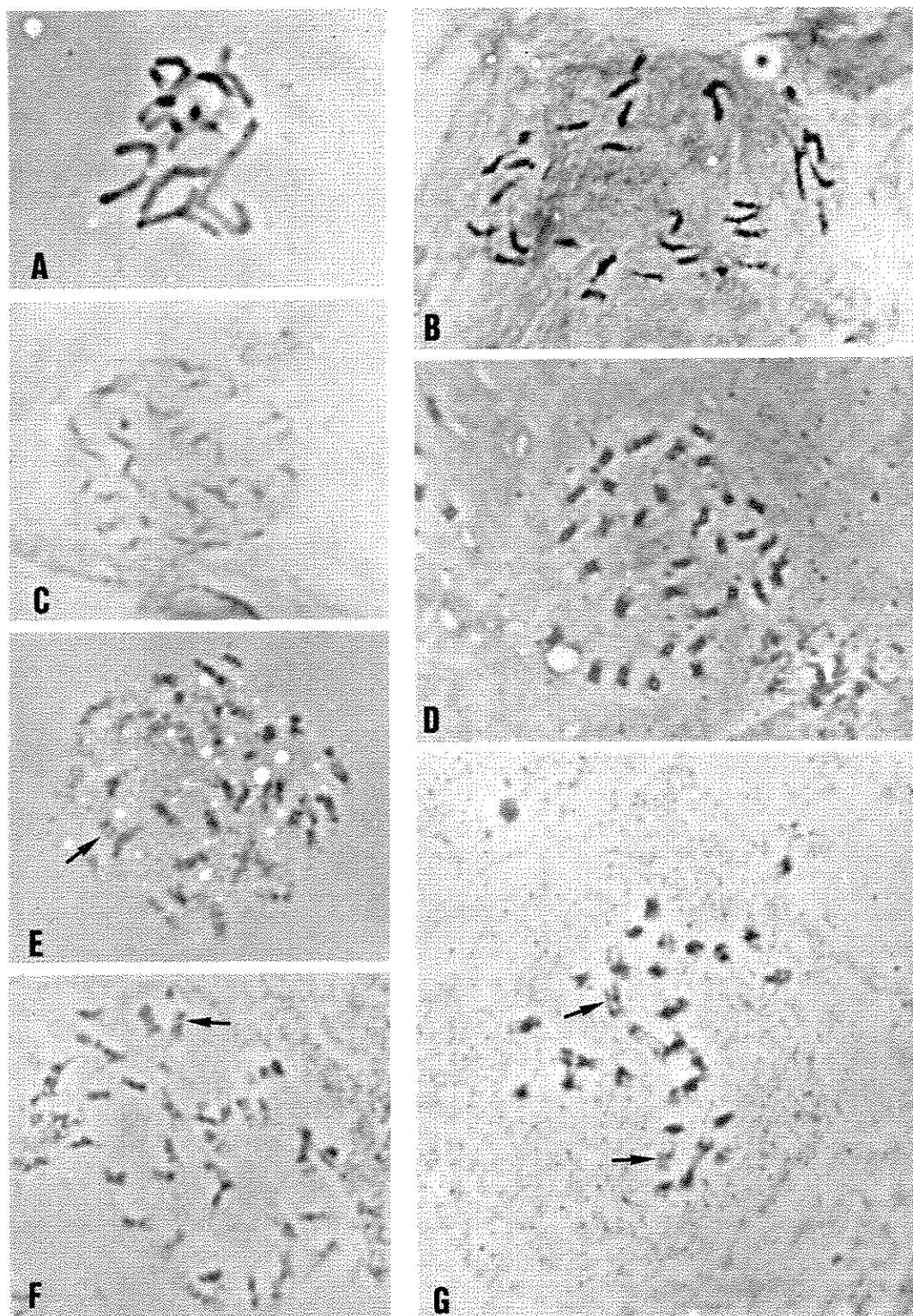


FIGURA 23 - FOTO A - *Hippeastrum psittacinum*, célula da raiz colorida pela técnica de STACK & CLARKE (1973a, b) (X 1792). FOTO B e C - pro-metáfase em célula do endosperma de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, bandadas pela técnica de banda-G (QUADRO VI) com as modificações T_{1a} e T_{4a} , respectivamente (X 1577). FOTOS D e E - prometáfase em células do endosperma de *C. racemosa*, bandadas pela técnica NOR (BLOOM & GOODPASTURE, 1976) (QUADRO VIII), com as modificações T_{3e} (D e E) e T_{2a} (F) (X 1920). FOTO G - metáfase de *C. dewevrei* bandada pela T_{2b} (NOR - QUADRO VIII) (X 1920). Setas: assimetria de bandas impregnadas pela prata.

mos de *H. psittacinum* foi aquela citada por STACK & CLARKE (1973b) a qual não deu bons resultados para os cromossomos das espécies de café aqui estudadas (FIGURA 23, FOTO A).

As variações na metodologia que produzem bandas-G com tripsina, também não revelaram adequadas para *H. psittacinum*. As observações mostram que esta espécie parece ser mais susceptível ao tempo de exposição à solução de tripsina, do que as espécies de café. O mesmo se verificou para tempo e diluição da solução de Giemsa em tampão Sørensen.

O material, talvez pela presença da parede celular (*H. psittacinum*), parece ser muito susceptível à etapa do despregamento da lamínula em nitrogênio líquido. Além disso, a baixa temperatura (-183°C) do nitrogênio parece fragmentar muito o tecido radicular esmagado.

A coloração de Feulgen que foi empregada nos cromossomos dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* não produziu bons resultados. As lâminas apresentaram os cromossomos muito pouco corados, com um tom pálido, não sendo possível distinguir, pela reação de Schiff a heterocromatina.

Quando se utilizou o endosperma inteiro, este se endureceu após o tempo da hidrólise em HCl (ácido clorídrico) tanto na concentração de 1N como na de 5N. Este endurecimento dificultou a etapa de esmagamento. A modificação introduzida então para minimizar este problema, foi colorir o material já esmagado. A coloração apresentada foi pálida, não havendo diferenciação de cor entre os cromossomos e o citoplasma.

As mudanças no tempo, concentração e temperatura do

ácido clorídrico bem como no tempo de exposição ao reativo de Schiff, não favoreceram a coloração dos cromossomos e, principal_{mente}, a visualização dos segmentos heterocromáticos.

O emprego de Giemsa somente, diluído em tampão fosfato Sørensen (1/150) nesta proporção deu bons resultados para os cromossomos de *C. dewevrei* os quais foram apenas esquematizados na FIGURA 24.

Em tecidos embrionários presentes junto com o tecido dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, pelo que se pôde observar, não apresentaram diferenciação com o emprego das técnicas de bandamento-C, G ou NOR. A aparência dos cromossomos era de entumescimento, ou de coloração excessiva. Para se obter um padrão de bandas nos cromossomos do tecido embrionário há necessidade de se testar melhor as modificações aqui introduzidas nas metodologias de bandamento.

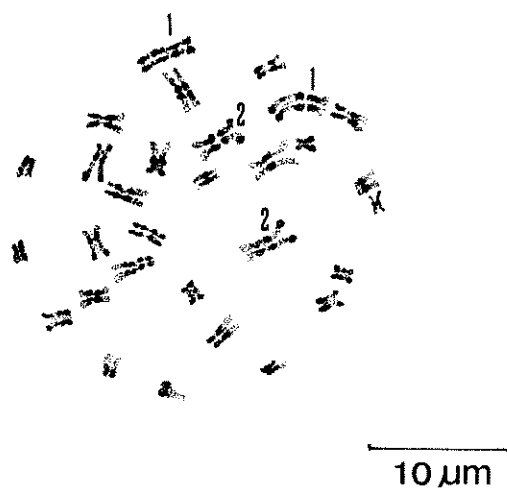


FIGURA 24 - Esquema dos cromossomos na prometáfase de uma célula do endosperma de *C. dewevrei*, planta número 6, corados apenas com solução diluída de Giemsa em tampão fosfato Sørensen (1/150), após o despregamento da lamínula. As setas indicam a posição do centrômero.

1 = cromossomos homólogos do grupo 1.

2 = cromossomos homólogos do grupo 2 - SAT.

5. DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE DE DIVISÃO MITÓTICA NOS ENDOSPERMAS

Os endospermas de *C. dewevrei* raça *excelsa* apresentaram uma atividade mitótica mais acentuada nas camadas periféricas bem como naqueles endospermas com um diâmetro entre 1 a 4 mm e aqui denominadas por pequenos.

Estudos similares foram desenvolvidos em *C. arabica*, por MENDES, em 1941, embora estes estudos não tivessem sido quantificados. Este autor, estudando o desenvolvimento do endosperma de *C. arabica* vars. *typica* e *semperflorens* observou durante os três primeiros meses de desenvolvimento deste tecido, que seu crescimento se dava pelas camadas teciduais periféricas, enquanto que as camadas celulares centrais perdiam esta capacidade de divisão, aumentando apenas no volume celular.

MEDINA (1964) também observou que os endospermas de *C. arabica*, com um tamanho compreendido entre 2 a 3 mm eram mais ativos mitoticamente, sendo melhor utilizados para trabalhos citológicos. Essa mesma atividade foi observada nos endospermas maiores, porém somente em algumas regiões e que, provavelmente, seriam aquelas aqui denominadas por periféricas.

Essa capacidade das células periféricas de reterem a potencialidade meristemática e produzirem continuamente novas células, enquanto que as células mais centrais no endosperma apenas aumentam seu volume foi também observado em milho (*Zea mays*) por LAMPE (1931).

Com relação aos efeitos da temperatura, sabe-se que as baixas temperaturas exercem influência na mitose, retardando ou interrompendo o seu ciclo, reduzindo a taxa de síntese de DNA nos cromossomos e evitando o alinhamento dos mesmos na placa metafásica (MOH & ALÂN, 1964).

Estudos realizados por BROWN (1951) em raízes de ervilha tratadas com diferentes temperaturas, mostraram a influência da temperatura na duração dos estádios de divisão do ciclo mitótico. As variações mais significativas estavam compreendidas entre as temperaturas de 15°C e 25°C. Ao elevar-se a temperatura, observava-se uma redução no ciclo mitótico e ao diminuir a temperatura, o ciclo tornava-se mais longo.

Resultados semelhantes foram obtidos por MOH & ALÂN (1964) em raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* cult. San Fernando), quando tratadas a 4°C e a 23°C. O tratamento das raízes por um período de tempo à temperatura de 4°C ocasionava a retenção das células em prometáfase e, temperaturas inferiores a esta causavam uma compactação dos cromossomos no centro da célula.

Posteriormente MOH (1966), estudando o mesmo cultivar de feijão concluiu que este tratamento a baixa temperatura (4°C) também provocava retardamento no ciclo de divisão celular no meristema apical e, de forma semelhante às raízes, um tratamento prolongado por mais de 3 horas a 4°C causava a retenção dos cromossomos das células em prometáfase.

No caso dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* não se pode afirmar com certeza que o tratamento com solução de KCl (cloreto de potássio) 0,075M a 0°C por um período entre 1 a 2 horas tenha interferido na duração do ciclo da mitose e, mais

especificamente, na quantidade de células na metáfase. Porém, as observações realizadas nos endospermas dessas duas espécies de café indicaram que o número de células em prófase e prometáfase era elevado e que a quantidade de células na metáfase era pequena. Essa situação é similar àquela relatada por MOH & ALÁN (1964) e MOH (1966), como mencionado anteriormente.

Observações semelhantes a estas também foram feitas por MEDINA (1964 e 1965) nos endospermas de algumas espécies de café, incluindo *C. dewevrei*, embora nesses trabalhos a autora não tenha usado qualquer tipo de pré-tratamento para os endospermas.

O fato de se encontrar diversas células em metáfase, com os cromossomos levemente compactados e próximos uns aos outros não proporcionando um bom espalhamento como era de se esperar, pode ser explicado, em parte, pelo tratamento com KCl a baixa temperatura. Esse efeito seria similar àquele descrito por MOH (1966) em células meristemáticas do ápice de feijão *P. vulgaris* cult. San Fernando.

WIMBER (1966), observando a duração do ciclo nuclear em *Tradescantia paludosa* em três temperaturas diferentes (13°C, 21°C e 30°C) concluiu que, a 21°C e a 30°C a duração dos estádios da mitose era praticamente idêntica e que esse fato sugeriria a existência, na mitose desta planta, de um intervalo relativamente largo, de variação para temperatura ideal. Abaixo deste valor as mudanças no tempo de duração da mitose seriam mais drásticas.

A análise da variância aplicada nos endospermas de *C. dewevrei* mostrou não haver interação significativa

entre as temperaturas de coleta, de 11°C e 27°C, com a atividade mitótica dos endospermas, nos três tamanhos diferentes, indicando que a quantidade de células mitoticamente ativas e, mais precisamente, de células em metáfase, não é afetada pela temperatura de coleta. Esse fato leva a suposição de que: (1) nos endospermas de *C. dewevrei*, esteja acontecendo algo similar aos dados obtidos por WIMBER (1966), onde haveria um intervalo de variação de temperatura no qual a atividade mitótica (duração dos estádios e número de células ativas em cada estágio) não seria significativamente afetada; ou (2) que o tratamento com a solução de KCl a 0°C tenha afetado o ciclo celular, mascarando um provável contraste entre as duas temperaturas de coleta (11°C e 27°C). Este efeito teria então provavelmente uniformizado os ciclos de divisão dos endospermas coletados tanto a 27°C como a 11°C.

Observou-se que algumas células dos endospermas de *C. dewevrei* possuíam o número de cromossomos duplicados ($6x=66$) em metáfase e prometáfase. Esse fato já tinha sido observado por MEDINA (1964 e 1965) e considerado como endomitose o que, segundo a autora, é comum neste tecido devendo estar relacionado com o desenvolvimento do embrião.

5.2. BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Os resultados obtidos para os cromossomos das células dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, através das variações nas metodologias de bandas-C, -G e NOR, não permitem afirmar com toda a certeza, principalmente no que concerne às bandas-C, se os segmentos corados pelo Giemsa ou impregnados pela

prata correspondem à denominada heterocromatina constitutiva, como classicamente definida, isto é, replicação tardia de seu DNA, seqüências de DNA repetitivo ou heteropicnose positiva.

Alguns autores como DANIEL & LAM-PO-TANG (1973) discordam da validade dos métodos de banda-C, por si só, para a definição ou localização da heterocromatina constitutiva.

SAUAIA⁽¹⁾, considerou inconsistente a idéia de associação de bandas-C, com regiões de DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva ou com estruturas de cromatina.

De acordo com COMINGS (1978) houve uma generalização da idéia de correspondência entre bandas-C, com regiões de DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva, devido aos trabalhos iniciais de hibridação in situ de DNA/RNA e posterior coloração com Giemsa.

Foram assumidos, aqui, os termos segmentos ou faixas coradas pelo Giemsa e bandas para aqueles segmentos diferenciados nos cromossomos segundo a modificação da metodologia aplicada. Não foi feita, portanto, correlação entre heterocromatina constitutiva e regiões de DNA de replicação tardia pelos motivos expostos anteriormente.

(1) SAUAIA, H. 1982. Cromatina. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 34. Campinas, UNICAMP. (Conferência não publicada).

5.2.1. BANDA-C

Através de uma rápida análise dos ideogramas obtidos por algumas das diferentes modificações na metodologia da banda-C, para ambas as espécies de café aqui estudadas, pode-se observar que as bandas-C não se restringem às regiões circunvizinhas ao centrômero, nos cromossomos, podendo ocorrer também nas regiões intermediárias ou nas extremidades dos mesmos, sendo então respectivamente designadas por bandas-C intercalares e teloméricas.

Bandas-C de ocorrência centromérica e telomérica foram obtidas por FISKESJÖ (1974) nos cromossomos das células da raiz de *Allium cepa* e *A. proliferum* variando-se o tempo de incubação do material. As bandas de ocorrência telomérica eram características do material com 2 semanas de estocagem. A medida que as lâminas permaneciam estocadas por mais tempo (2 a 3 meses) a formação de bandas exclusivamente centroméricas, após o bandamento, era constante.

YEN & FILION (1977), trabalhando com algumas espécies de *Avena* e variando a técnica de banda-C, concluíram haver no mínimo duas classes de heterocromatina constitutiva denominadas por centromérica e intercalar/telomérica. Segundo os autores, essas classes de heterocromatina constitutiva são reflexos, provavelmente, da variação na temperatura da hidrólise em ácido clorídrico (HCl).

As variações aqui encontradas, tanto nos ideogramas dos cromossomos de *C. dewevrei* como naqueles de *C. racemosa*, estariam relacionadas às modificações introduzidas e empregadas. Essas mo

dificações foram feitas nas etapas do tratamento do material com hidróxido de bário (tempo, temperatura e concentração), com a solução salina de 2 X SSC (tempo, temperatura e pH) e com a diluição e tempo da solução corante Giemsa/Tampão fosfato Sörensen (QUADRO V).

Segundo SUMNER (1972), o estágio mais crítico no processo do bandamento-C é o tratamento com a solução de hidróxido de bário. Esse mesmo passo crítico é também encontrado no método combinado de bandamento-C com impregnação pela prata por TUCK-MULLER *et al.* (1984).

Nos cromossomos do endosperma de *C. excelsa* e *C. racemosa*, esse fato parece também verdadeiro.

De acordo com SUMNER (1972), os tratamentos com solução de hidróxido de bário a temperaturas elevadas e por tempos prolongados causam a distorção dos cromossomos, enquanto que tratamentos curtos de até 5 minutos com solução de hidróxido de bário seriam efetivos para o bandamento.

Tratamentos por tempos prolongados em solução alcalina (com o hidróxido de bário) removeriam aproximadamente 75% do DNA, resultando numa coloração fraca dos cromossomos (HOLMQUIST, 1979).

No caso, em questão, o tratamento dos cromossomos dos endospermas por um curto período de tempo não foi suficiente para promover o bandamento (QUADRO V, T_{13a}). Os cromossomos, quando analisados, mostraram uma coloração regular e intensa, semelhante aos métodos de orceína ou carmim acético, indicando não ter ocorrido diferenciação em bandas ao longo dos mesmos.

FILION (1974) concluiu que tratamentos com solução de

hidróxido de bário em concentração fraca, aplicada à temperatura ambiente e por um período de tempo prolongado (30 minutos) produzem bandas nítidas.

Em café, o emprego deste tratamento só funcionou para *C. racemosa* (QUADRO V, T_{10b}) enquanto que para *C. deweyrei* não se obteve bandas nítidas. Os resultados distintos obtidos com o emprego das modificações T_{10a} e T_{10b} , que diferem apenas na diluição da solução Giemsa/tampão fosfato Sørensen, é explicado pelo número muito baixo de lâminas (menos que 5) que foram submetidas a modificação T_{10a} , não se constituindo essa diferença de concentração em fator limitante.

Pelos resultados obtidos com o hidróxido de bário, o melhor tratamento para café é aquele que combina a temperatura elevada, ao redor de 50°C, com um tempo máximo de 15 minutos de imersão das lâminas na solução.

Além do tratamento com solução de hidróxido de bário, o tempo de incubação na solução salina de 2 X SSC foi importante para o bandamento em café.

Os valores empregados inferiores a 60 minutos (1 hora) (QUADRO V, T_{19} e T_{20}) não foram suficientes para promover o bandamento. O aspecto dos cromossomos era sempre de homogeneamente corados, ou muito opacos e pálidos ou então densamente corados. Os melhores tempos empregados estiveram entre 60 a 120 minutos de exposição do material aderido na lâmina à solução de 2 X SSC, a uma temperatura ao redor de 65°C.

COMINGS (1973) afirma que a exposição do material por um período de tempo excessivo na solução de 2 X SSC resulta na reversão das bandas. As soluções de 2 X SSC em maior ou menor

concentração, juntamente com o tempo, têm a capacidade de extrair uma porcentagem do DNA dos cromossomos (COMINGS *et al.*, 1973).

Interessantes são os achados de GOSTEV & ASKER (1979), que obtiveram diferenciação longitudinal nos cromossomos em plantas como *Salvia* spp., *Plantago* sp., *Rosa damascena*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* e *Pimpinella anisum* com a exposição do material em solução de 2 X SSC por 5 a 6 horas a temperatura ambiente.

No caso dos cromossomos de café, não foi testada esta combinação de tempo e temperatura.

Pelos dados obtidos (QUADRO V) parece que os diferentes valores de pH da solução salina 2 X SSC (7,5 a 7,9) não se constituíram em fatores limitantes no bandamento-C. Obteve-se resultados positivos com solução salina de pH 7,5 (T_{15}) e pH 7,7 (T_{25}). Resultado negativo surgiu com o emprego da modificação T_{23a} onde o pH da solução salina foi igual a 7,6. Outros resultados tanto positivos quanto negativos, foram obtidos na maior parte das modificações onde o pH de 2 X SSC foi 7,8 (T_2 , T_8 ou T_{15} ou ainda T_{21}). Esses resultados levam a suposição de que outros fatores, como o tempo de duração da exposição do material à solução de 2 X SSC, estariam limitando o bandamento.

O malogro da formação de bandas observado nas técnicas T_3 e T_4 (QUADRO V) deve estar provavelmente ligado ao número de lâminas por cuba, durante o período do tratamento com a solução de 2 X SSC. Nestas duas técnicas foram colocadas até 10 lâminas por cuba durante a etapa 2 X SSC. Segundo MACKENZIE & LUBS (1973) e FILION (1974) um número de lâminas superior a dois, por cuba, causa mudanças no pH da solução de 2 X SSC. De acordo com HOLM-

QUIST (1979) há uma interferência do vidro das lâminas com a solução de 2 X SSC ou 6 X SSC, à temperatura de 60-65°C, na qual há liberação dos óxidos de sódio, cálcio e silício (Na_2O , CaO e SiO_2 , respectivamente) o qual altera, de maneira significativa, o pH desta solução para valores mais alcalinos. Soluções de 2 X SSC com o pH de valores alcalinos (acima de pH 8,0) causam distorção nos cromossomos, deixando-os intumescidos (MACKENZIE & LUBS, 1973). Esse fato pode explicar porque duas modificações idênticas, como a T_2 e T_3 e outras duas também idênticas como a T_4 e T_9 apresentaram resultados diferentes como visto no QUADRO V. O tempo de maturação do material, por si só, parece não ser suficiente para explicar a diferença nos resultados. Da mesma forma que a diferença na diluição da solução de Giemsa em tampão Sörensen.

FILION (1974) observou, com respeito ao tempo do material em solução de SSC, que um período longo de incubação nesta solução requer um tempo maior na solução corante Giemsa / tampão fosfato Sörensen. Essa correlação não é muito rígida para o bandamento-C em *C. dewevrei* e *C. racemosa* porque foi obtido resultado positivo, quanto à formação de bandas, tanto deixando-se o material por 19 horas em solução corante Giemsa 1/100 como por 4 horas em solução Giemsa 1/150, quando o material já havia passado por 2 horas em 2 X SSC a 65°C e pH 7,8 (T_2 e T_{17b} QUADRO V).

Concentrações fortes das soluções corantes, com 1/50 (Giemsa/tampão fosfato Sörensen) durante um período de tempo prolongado, obscurecem as bandas, deixando os cromossomos densamente corados (QUADRO V, T_1 e T_7). Inversamente, soluções corantes de Giemsa/tampão fosfato Sörensen, mais diluídas ou mais fracas como 1/100 e 1/150, por curtos períodos de tempos (QUADRO V, T_6 ,

T_{11} , T_{12} , T_{13} , T_{17a} , T_{18c} , T_{18d} e T_{22}) não são suficientes para diferenciarem as regiões bandadas. Os cromossomos permanecem palidamente corados, sendo difícil distinguí-los em regiões bandadas.

As concentrações de 1/50 de Giemsa/tampão fosfato Sørensen, por um tempo de até 30 minutos, não são adequadas para a visualização das bandas nos cromossomos dos endospermas de café, porque estes se tornam muito corados (T_{14b} e T_{18b} , QUADRO V). Tempos inferiores àquele (12 ou 15 minutos) (T_{27} e T_{28} , QUADRO V) também não são suficientes para colorir as estruturas bandadas. Parece que o tempo ideal para a diluição 1/50 estaria entre 15 a 30 minutos, embora não tenha sido testado.

Com relação à solução Giemsa/tampão fosfato Sørensen para a diluição 1/150, parece que o tempo mínimo de exposição do material a esta solução é 3 horas (T_{15}). Tempos inferiores (T_{17a} , T_{18c} e T_{18d}) não são suficientes para a visualização das bandas.

Sabe-se, como visto anteriormente, que o tempo de maturação das lâminas com o material, antes do bandamento, exerce uma influência na localização e ocorrência das bandas (FISKESJÖ, 1975). No caso dos cromossomos dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* ainda não se tem dados suficientes para tal afirmação, porém supõe-se que o aumento do período de maturação deve influenciar na conformação dos cromossomos e na formação das bandas. As lâminas de endospermas, antes do bandamento e, estocadas por 54 dias não servem para o bandamento-C porque os cromossomos permanecem opacos, sem um contorno nítido e as células, em geral, se tornam quebradiças, não resistindo às etapas do bandamento, soltando-se muitas delas durante os sucessivos tratamentos a que são submetidas. Supõe-se que a perda de água, juntamente com a

temperatura de 4°C, durante esse longo período de maturação, esteja relacionada com a distorção da morfologia dos cromossomos dos materiais estocados. Essas considerações entretanto, estão restritas às modificações T_{18c} e T_{18d} .

HOLMQUIST (1979) observou que, em preparações citológicas que utilizaram células oriundas de uma linhagem de cultura de células de rato, que as lâminas contendo material, com 46 dias de maturação necessitavam de um tratamento mais longo em solução alcalina que o normal. A estocagem das lâminas a baixa temperatura (-20°C) minimizava esse período maior de tratamento em solução alcalina. Essa conclusão é contudo conflitante com os dados obtidos em café e discutidos anteriormente.

O período de estocagem do material até o momento do bandamento (maturação) é portanto muito variável entre os materiais. Alguns, inclusive, não fornecem bom padrão de bandas enquanto não permanecerem por um período de maturação de 5 dias como em *Secale cereale* (LIMIN & DVORÁK, 1976) e *Tulipa* spp. (FILLION, 1974); de 7 a 14 dias para *Nigella* sp. (GILOT-DELHALLE et al., 1976) ou então sem estocagem como para algumas espécies de *Scilla* (VOSA, 1973b).

Em café, obteve-se bandamento com lâminas de endospermas estocados por 2 (T_{25}), 8 (T_{14a} e T_{17b}), 12 (T_{15}), 14 (T_9 e T_{10B}), 21 (T_2), 28 (T_8 - FOTO D, FIGURA 8) e 36 dias (T_{16}). Com a mesma metodologia porém, com o período de maturação diferente, resultados positivos foram obtidos tanto com 8 (T_{17b}) como com 36 dias de maturação.

Comparando-se os resultados obtidos em *C. dewevrei* através do bandamento-C, observa-se que não há ainda um padrão de ban

das definido e que se repita uniformemente, permitindo a construção de um ideograma comum. Há variações quanto a localização e ocorrência das bandas em cada cromossomos de cada grupo.

Essas variações obtidas se devem em parte ao emprego de modificações nas metodologias de bandas-C, a um provável polimorfismo no padrão de bandas entre os cromossomos do mesmo grupo quando se comparam os cromossomos de espécimens diferentes, ou a um provável polimorfismo entre as células do endosperma. Além disso, a ocorrência da posição das bandas está relacionada com o grau de contração cromossômica que é diferente nas diferentes fases da mitose, incluindo a prometáfase e a metáfase. Segundo MARTÍN & SIMAK (1968) contrações diferenciadas dos cromossomos numa mesma célula podem ocorrer. Esse fato então, alteraria a posição das bandas, bem como o próprio comprimento cromossômico que geraria agrupamentos artificiais.

De acordo com MOK & MOK (1976) e GOSTEV & ASKER (1979), nas plantas com cromossomos pequenos as bandas são melhor visualizadas na prometáfase.

As diferenças encontradas entre os cromossomos de *C. dewevrei* bandados pelas modificações T_{15} e T_{16} (QUADRO V e FIGURAS 5 e 6) parecem estar relacionados a um provável polimorfismo de bandas existente entre as plantas 63 e 766 bandados respectivamente por essas modificações. Essas modificações são muito similares em suas etapas de trabalho.

Dos grupos de cromossomos estabelecidos para as plantas de números 63 e 766, somente o grupo 2 foi que apresentou um padrão de bandas comuns às duas pelas modificações T_{15} e T_{16} , respectivamente.

Da mesma forma, ao se comparar o esquema da FIGURA 3 que foi obtido pela modificação T_2 , do grupo 4 de cromossomos da planta 63 é semelhante quanto ao padrão de bandas aos cromossomos do mesmo grupo da planta 766 (FIGURA 6) obtidos pela modificação T_{16} . O mesmo verificando-se com os cromossomos dos grupos 5 e 10.

O esquema da FIGURA 7 ilustra essas variações observadas. Dentro desse esquema há grupos, como o de número 1, bastante homogêneos e outros bem heterogêneos (grupo 4).

Algumas bandas ocorrem em quase todos os ideogramas obtidos de *C. dewevrei* como é o caso das duas bandas assinaladas no esquema dos grupos 2, 8 e 10, sendo que nesses últimos podem se fundir em uma só.

A maior parte dos grupos apresentou mais de um tipo de bandamento ao longo dos cromossomos. Essa modificação não ocorreu só a nível da metodologia empregada mas, entre os componentes de cada grupo, em um mesmo ideograma.

Os grupos 2, 3, 5, 6, 7, 9 e 11, a despeito das diferenças, apresentaram pelo menos uma banda ou duas comuns a todos os demais cromossomos (FIGURA 7).

A execução de novas lâminas com os endospermas dessas plantas de números 63 e 766 de *C. dewevrei* submetidas à mesma técnica poderá certamente fornecer dados sobre a ocorrência ou não de diferenças nas bandas.

Como o endosperma é um tecido triplóide, a diferença no padrão de bandas de um dos pares do conjunto, também pode ser explicada por um provável cruzamento com alguma planta de *C. ca-*

nephora cv. Kouillou, a qual possui algumas plantas bastante próximas ao café excelsa.

Para a mesma planta de *C. racemosa* H6595, pelo emprego das modificações T_{10b} e T_{17b} , os cromossomos dos grupos 1, 5, 6, 9 e 10 mostraram menos variações (FIGURAS 9 e 10) quando comparados pelo esquema da FIGURA 11, que os demais grupos.

Embora as duas modificações sejam bem distintas (T_{10b} e T_{17b} , QUADRO V) quanto ao tempo e temperatura do tratamento (solução de hidróxido de bário) pode-se observar essas semelhanças entre os ideogramas.

Semelhantemente a *C. dewevrei* há necessidade de se testar mais estas metodologias porque o número de resultados positivos é ainda pequeno, não se podendo concluir muito a respeito das variações obtidas.

Analisando-se as duas espécies de café, a tendência, quanto à formação de bandas-C, é a presença de bandas teloméricas e pericentroméricas. Grupos de cromossomos como o grupo 1, se mostraram muito semelhantes quanto a ocorrência das bandas, entre *C. dewevrei* e *C. racemosa*. O mesmo acontecendo com os grupos 6, 9, 10 e 11 que ambas as espécies mostraram possuir coincidência com a localização de algumas bandas (FIGURAS 7 e 11).

Para a obtenção de banda-C, portanto, é necessário a combinação de fatores tais como tempo, temperatura, pH e concentração das soluções utilizadas em cada etapa do bandamento. Essas combinações estão sujeitas ao material utilizado e, segundo BENTZER & LANDSTRÖM (1975) a mesma combinação de fatores que induz a formação de bandas ao longo dos cromossomos de determinados vegetais torna-se inadequada para os cromossomos de outros.

Com relação às espécies de café ora em questão, verifica-se que há pelo menos uma técnica da metodologia de banda-C que produz resultados mais positivos para ambas, como pode ser visto pelo QUADRO V, que no caso são as de números T_{15} e T_{17b} que são muito semelhantes quando se considera os tratamentos do procedimento para banda-C.

Basicamente, as melhores combinações para se obter bandas-C em *C. dewevrei* e *C. racemosa* (QUADRO V, FOTO C, FIGURA 8) são aquelas com solução saturada de hidróxido de bário por 15 minutos a 50 ou 5°C, seguidos dos tratamentos em solução salina 2 X SSC a 65°C, por 60 ou 120 minutos, com pH 7,5 a 7,8, com 2 a 3 lâminas por cuba de vidro. A diluição do Giemsa em tampão fosfato Sørensen de 1/100 ou 1/150 deve durar de 3 a 19 horas para a promoção de cor contrastante. O tampão deve ter um pH ao redor de 6,9. O tempo de maturação das lâminas deve ser inferior a 54 dias.

A ocorrência de polimorfismo observado nas lâminas pelo procedimento de banda-C ou variantes de banda-C, tanto em cromossomos homólogos de uma mesma planta ou entre plantas diferentes foi demonstrado por VOSA (1973b), em *Scilla sibirica*, por WEIMARCK (1975) em *Secale cereale* e por BENTZER & LANDSTRÖM (1975) para *Leopoldia comosa*. Esses autores observaram diferentes variantes para um mesmo cromossomo homólogo, dentro da mesma planta que estudaram, e geralmente estavam relacionadas com a ocorrência, em alguns materiais, de bandas intercalares e variações na extensão das bandas teloméricas.

Variantes de bandas-C também foram observadas em espécies do grupo *Scilla sibirica* (= *S. sibirica*) por GREILHUBER & SPETA (1978), porém variações entre os cromossomos homólogos de

mesma planta e entre espécies diferentes estavam associadas de acordo com esses autores, a rearranjos estruturais que envolviam a heterocromatina, revelada pela técnica de banda-C.

A ocorrência de rearranjos estruturais na forma de pequenas inversões e translocações, no gênero *Coffea*, foi sugerida por MEDINA (1972) que estudou a meiose de híbridos diplóides interespecíficos.

O poliformismo visto, com relação à ocorrência de bandas-C, nas espécies *C. dewevrei* e *C. racemosa*, pode ser em parte, consequência desses pequenos rearranjos estruturais, embora seja muito cedo para se afirmar tal idéia pois, o número de células bandadas por uma mesma técnica é ainda reduzido e insuficiente. No momento, é provável que outros fatores relacionados com a técnica de banda-C estejam causando esse polimorfismo. Deve-se dizer também que a heterogeneidade dos cromossomos dentro de um mesmo grupo, ou entre grupos iguais, porém de células e/ou espécimens diferentes, ou ainda endospermas diferentes, pode ser devido a agrupamentos artificiais.

5.2.2. BANDAS COM TRIPSINA

Os diferentes procedimentos de banda-G, encontrados em literatura são, em parte, específicos para cromossomos humanos e/ou mamíferos (SEABRIGHT, 1971; CHIARELLI *et al.*, 1972; COOPER & HSU, 1972; SCHNEDL & CZACKER, 1974; BROWN *et al.*, 1975) utilizando a tripsina diluída em diferentes concentrações e em diferentes soluções tampão.

Segundo a idéia de OKADA & COMINGS (1974) e COMINGS (1977 e 1978) as estruturas de bandas-G corresponderiam aos cromômeros observados em paquíteno.

Devido a uma contração cromossômica mais acentuada nos cromossomos dos vegetais, na metáfase, GREILHUBER (1977 e 1984) não considera válida a ocorrência da bandas-G em cromossomos de vegetais, mesmo porque, segundo esse autor, a presença de seqüências repetitivas em quantidade moderada em tais cromossomos não favorece a ocorrência de bandas-G.

Os resultados obtidos em café com o emprego de solução de tripsina revelaram a ocorrência de uma diferenciação ao longo dos cromossomos, os quais se coravam muito pelo Giemsa.

Devido ao grau de contração e ao tamanho reduzido dos cromossomos dessas duas espécies de café, supõe-se que as estruturas coradas pelo Giemsa, não correspondam às bandas-G como definidas por GREILHUBER (1975 e 1977) e COMINGS (1977 e 1978), mas sejam na verdade semelhantes às bandas-C.

MERRICK *et al.* (1973) e ÖZKINAY & MITELMAN (1979) observaram, utilizando cromossomos humanos, que quanto maior o tempo de exposição do material a ação da tripsina, as bandas-G desapareciam formando-se então, em outras áreas, estruturas de bandas que posteriormente foram identificadas como sendo aquelas de bandas-C.

Para esses autores, a exposição do material por 10, 15 ou até 30 minutos em solução de tripsina era suficiente para promover a reversão das bandas-G para -C.

Os dados obtidos mostraram que os tempos de exposição

do material em solução de tripsina que dão bons resultados são 4 e 8 minutos. Abaixo desses valores não se obteve a formação de bandas (QUADRO VI).

Esse resultado pode ser explicado em parte pela idéia da não ocorrência das bandas-G em vegetais. Tempos inferiores a 4 minutos se mostraram insuficientes, e os cromossomos se apresentaram homogeneamente corados, devido a ausência de bandamento. Tempos superiores a 8 minutos seriam longos demais e provavelmente estariam exercendo algum tipo de digestão mais pronunciada nos cromossomos.

Não se pode afirmar se a formação dessas estruturas de bandas estaria relacionada com a extração de proteínas de natureza ácida (KATO & MORIWAKI, 1972), ou com uma interação de DNA-histonas (HSU, 1974) ou ainda com a degradação de proteínas não histônicas (BURKHOLDER & DUCZEK, 1980a).

Observou-se que, a despeito do tempo da maturação das lâminas, o máximo possível de exposição do material à solução de tripsina é de 8 minutos (QUADRO VI). Esse tratamento funcionou tanto para lâminas com 14 dias e 18 dias como para lâminas com 70 dias de maturação a 4°C.

Segundo MERRICK *et al.* (1973), quanto maior o tempo de exposição do material à solução de tripsina, maior também deverá ser o tempo na solução Giemsa.

Para os cromossomos de *C. dewevrei* e *C. racemosa* essa correlação não foi válida porque os cromossomos do endosperma tratados a 8 minutos com tripsina deram bons resultados tanto na coloração Giemsa/tampão fosfato Sørensen por 5 como por 7 minutos (QUADRO VI, T_{1b} , T_{1c}) e em tempos superiores como 20 minutos

e 8 horas (QUADRO VI, T_{4a} e T_{9a}). Tempos de exposição dos cromossomos em tripsina por 4 minutos só deram resultados positivos com o tempo no corante igual a 10 minutos e na diluição 1/100 de Giemsa/tampão fosfato Sørensen.

Pelos resultados obtidos, não se pode afirmar com segurança que o tempo de maturação da lâmina independe do tempo de exposição do material à tripsina e ao corante.

Comparando-se os dados obtidos para os cromossomos de *C. dewevrei* através das variações na metodologia de banda-G (FIGURA 15), com os dados obtidos para essa mesma espécie, utilizando as variações na metodologia de banda-C (FIGURA 7) pode-se observar a presença de algumas bandas comuns.

O grupo 1 de cromossomos, embora tratado por duas diferentes metodologias, apresentou muitas semelhanças, quanto à coloração dos segmentos bandados.

Com menos estruturas de bandas comuns, estão os grupos 7, 8, 9, 10 e 11 quando comparados após tratamento pelo procedimento de banda-C e pelo procedimento de banda-G com tripsina.

Devido a essas semelhanças supõe-se ser mais provável a formação de estruturas semelhantes às bandas-C.

Sobre *C. racemosa* pouco se pode acrescentar porque foi observado até o momento apenas uma única célula com os cromossomos bandados. Comparando-se os ideogramas de *C. dewevrei* bandados pela tripsina, das FIGURAS 12 a 15, com aqueles de *C. racemosa* (FIGURA 17) observa-se que há grupos de cromossomos com um padrão de bandas muito parecido, como é o caso dos grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 11.

Para qualquer conclusão, é necessária a análise de um maior número de lâminas de *C. racemosa*, incluindo outros espécimens, para se testar melhor essa metodologia de bandas com tripsina.

O uso de uréia, inicialmente utilizada na concentração de 8M, mostrou ter um efeito destrutivo nas células do endosperma. A diminuição da concentração para os valores de 2 M e 1 M mostrou que havia minimização dos danos celulares, embora nenhuma dessas duas últimas concentrações e nem mesmo a original (8M) (QUADRO VII) tivessem sido eficientes para promover a formação de bandas cromossômicas, em café, sendo que as células ficaram apenas mais ou menos coloridas.

Essas flutuações de coloração foram observadas tanto na modificação T_2 como na modificação T_3 e, pela análise das lâminas, não estão relacionadas com o tempo de exposição do material à solução de uréia e com o tempo de coloração. Outros fatores, por hora não investigados, como a maturidade das lâminas estejam, talvez, relacionados com essa ausência de bandas.

É provável também que o tempo utilizado no tratamento, com o emprego de uréia, de 2 a 10 minutos, seja ainda pequeno demais.

Finalizando, tem-se que as bandas aqui obtidas pelo uso controlado da tripsina não corresponderiam àquelas obtidas por DREWRY (1982) nos cromossomos de *Pinus resinosa* e por SATO & YOSHIOKA (1984) nos cromossomos de *Nothoscordum fragrans*, não sendo também similar àquelas observadas por MURATA & ORTON (1984) nos cromossomos de *Apium graveolens*, devido ao tamanho dos mesmos (maiores que dez micrômetros) e o grau de compactação, quan-

do comparados às bandas-C ou -G de acordo com as condições de impregnação.

5.2.3. BANDAS COM IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

ZHENG & BURKHOLDER (1982) observaram, em alguns cromosomos humanos e das células L de camundongos, a formação de bandas por impregnação pela prata equivalentes às bandas-C e -G. De acordo com esses autores, a prata reagiria especificamente com as regiões de heterocromatina centromérica e com regiões de cromatina que apresentam banda-G.

De acordo com a proposição inicial de BLOOM & GOODPASTURE (1976), períodos de exposição mais prolongados (20 a 30 minutos) do material em solução de nitrato de prata promoveria a formação de bandas em outras regiões ao longo dos cromossomos, além da região NOR. Essas bandas seriam equivalentes às bandas-C ou -G, de acordo com o tempo e condição de impregnação.

Os resultados obtidos com as etapas T_1 e T_2 (QUADRO VIII) que utilizaram a solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 50% indicam para os cromossomos dos endospermas de café, que tempos iguais ou superiores a 30 minutos produzem um excesso de impregnação pela prata. Parece que este resultado independe da idade das lâminas (2 ou 43 dias de maturação - QUADRO VIII).

A concentração da solução de nitrato de prata também interfere no tempo necessário para a formação de bandas. Enquanto que, para a concentração de 50% de AgNO_3 o tempo que promoveu o bandamento está entre 10 a 20 minutos, para a concentração de

8% esse tempo estendeu para 1 a 2 horas (QUADRO VIII, modificações T_2 e T_3).

Com o emprego de solução aquosa de nitrato de prata por um período igual ou superior a uma hora, a 50%, tanto para o tecido dos endospermas como para o embrião em formação, a impregnação se deu de forma distinta nas células desses dois tipos de tecido. Enquanto que, nos cromossomos das células do endosperma a impregnação foi muito intensa, não sendo possível distinguir bandas, nos cromossomos das células do embrião esta impregnação foi menos acentuada, permitindo reconhecer algumas estruturas de bandas em alguns cromossomos.

A idade das lâminas parece não influenciar significativamente a ocorrência de bandamento nos cromossomos dos endospermas de café como pode ser observado pela modificação T_3 (QUADRO VIII). Deve entretanto, haver um limite de tempo do material durante o período de maturação que, a partir dele não mais se obtenha a formação de bandas com a impregnação pela prata, visto que para os endospermas de café, *C. dewevrei* e *C. racemosa*, lâminas preparadas com 60 dias de maturação já apresentavam sinais de desidratação e enrugamento tecidual.

Comparando-se os resultados obtidos em *C. racemosa*, vê-se que há semelhanças entre os grupos dos dois espécimens, notadamente entre os cromossomos dos grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 a despeito de serem duas plantas de origem diferentes e submetidas a duas modificações distintas quanto à concentração e tempo da solução aquosa de nitrato de prata (T_{3a} e T_{3e} respectivamente, QUADRO VIII).

Os estudos citoquímicos sugerem que a ligação da prata

nos cromossomos se dá em sítios onde há proteínas histônicas (BLACK & ANSLEY, 1964), ou onde haja proteínas não histônicas (HOWELL, 1977) ou com grupos carboxil presentes nas fosfoproteínas nucleolares (BUYS & OSINGA, 1984).

No presente trabalho, não se tem dados suficientes para confirmar qual desses fenômenos, acima mencionados, estaria ocorrendo, provavelmente.

Observou-se em alguns cromossomos do endosperma de café, a ocorrência de assimetria lateral em algumas bandas obtidas pelas modificações da técnica NOR (FIGURAS 18 a 22 e FOTOS D a G, como indicado pelas setas), a qual parece não estar relacionada com a idade da lâmina e nem com o tratamento aplicado.

GALLOWAY & EVANS (1975) observaram assimetria lateral na heterocromatina centromérica (banda-C) de alguns cromossomos humanos, após tratamento com BUdR e coloração combinada de fluorescente e Giemsa. Segundo esses autores essa assimetria cromossômica lateral refletiria não somente variações do conteúdo de DNA satélite mas, de outros DNA repetitivos que ocupam a região de banda-C.

Casos de assimetria nas bandas e na heterocromatina foram observados por TAKAYAMA & MATSUMOTO (1982) em cromossomos de células de rato oriundas de cultura. Esses pesquisadores combinaram a etapa de marcação dos cromossomos com BUdR seguido pela coloração diferencial de Giemsa. Notaram a formação de bandas semelhantes às bandas-G e, em alguns cromossomos, a presença de segmentos teloméricos assimétricos e que foram explicados devido à coloração diferencial e preferencial do Giemsa e que teriam riqueza de seqüências A-T.

Assimetria heterocromática ocorrendo nos segmentos intercalares foi observada por ALVES (1982) em células de ratos, mantidas em cultura. De acordo com esse autor, a assimetria lateral composta observada envolveria rearranjos cromossômicos, e inversões das posições das seqüências.

Segundo LIN & DAVIDSON (1974), essa assimetria lateral dentro da região heterocromática centromérica nos cromossomos do rato seria devido a uma distribuição desigual da base timina entre as duas cadeias complementares polinucleotídicas.

Esse princípio de explicação para a assimetria lateral em regiões heterocromáticas também confirmado por ROCCHI (1982) em cromossomos humanos.

Demonstração de assimetria lateral, através do badamento-G, em cromossomos do embrião do camundongo albino, foi feita por TUCCI & SKALKO (1977 e 1979). A assimetria lateral, obtida sem o uso de BUdR ou outro tipo de agente, ocorreu tanto nos telômeros como nos segmentos intersticiais de alguns cromossomos.

Conforme esses autores, esse fenômeno pode ter ocorrido através de trocas entre cromátides irmãs, de forma desigual.

É interessante salientar que os dados obtidos por TUCCI & SKALKO (1977 e 1979) e aqueles aqui apresentados sobre a ocorrência de assimetria lateral são diferentes daqueles que utilizam o BUdR, uma vez que o princípio da formação dessa assimetria é diferente. A bromo deoxiuridina (BUdR) se comporta como um substituto de nucleotídeos afins durante o período de síntese do DNA.

No caso dos cromossomos de café, não se sabe se é real

mente a distribuição desigual das bases A-T que estaria promovendo a assimetria lateral, de acordo com LIN & DAVIDSON (1974); se é a variação do conteúdo de DNA satélite ou de outro DNA repetitivo (GALLOWAY & EVANS, 1975); se são permutas desiguais entre cromátides irmãs (TUCCI & SKALKO, 1977 e 1979) ou se é consequência de rearranjos estruturais pequenos como proposto por ALVES (1982) e sugerido por MEDINA (1972) e MEDINA *et al.* (1977) com base em estudos de híbridos interespecíficos de café. Para tal, seriam necessárias novas e mais detalhadas observações a esse respeito, bem como a obtenção de um padrão de bandas para *C. deweyi* e *C. racemosa*.

Com respeito a todas as técnicas e respectivas modificações aplicadas para a formação de bandas nesses materiais ora estudados, ainda não foi possível a obtenção de um único padrão de bandas suficientemente estável e que se repetisse sem grandes alterações dentro da mesma modificação de bandamento empregada para cada espécie. Ocorreram diversas diferenças, quanto ao tamanho, posição e número de bandas por conjunto de cromossomos homólogos dentro da mesma espécie. Estas foram atribuídas a diferentes fatores, como a metodologia empregada, tempo, temperatura ou pH das soluções usadas no processo de bandamento, a fase mitótica em que se achavam os cromossomos, a qual implica no maior ou menor grau de condensação dos cromossomos e, conseqüentemente, no número e extensão das bandas formadas. Além disso, algumas das diferenças poderiam ter surgido devido a erros na interpretação e durante o processo de esquematização, pela câmara clara, dos cromossomos, o que resultaria na maior ou menor extensão das bandas observadas e a artificialidade dos agrupamentos devido ao grau diferencial de contração cromossômica em uma mesma célula.

Face aos dados discutidos anteriormente parece haver algumas semelhanças entre alguns grupos de cromossomos dentro da mesma espécie e entre as espécies comparadas *C. dewevrei* e *C. racemosa*. Foram observadas também algumas similaridades entre os padrões de bandas obtidos com as diferentes técnicas (C, G e NOR) contudo devido ao número baixo de células bandadas obtidas (menos de dez) não se pôde tirar mais conclusões a respeito de afinidades entre as espécies. A princípio, com base nesses dados iniciais, parece que a diferença entre os cromossomos de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, através das técnicas de bandamento, não é muito forte, sendo muito mais o comprimento total de cada cromossomo, o fator que diferencia essas duas espécies (maiores em *C. dewevrei*).

O uso de Giemsa somente após a remoção da lamínula, nos cromossomos dessa única célula obtida do endosperma de *C. dewevrei*, planta 6, evidenciou estruturas diferenciadamente coradas, como observado pela FIGURA 24. Nota-se a coloração dos grupos cromossômicos 1 e 2 (sat) que é semelhante àquela obtida para banda-C (FIGURA 7). Nesta célula, não foi observada nenhuma assimetria lateral aparente. Contudo, como somente estes dados se restringem a esta única célula obtida, não se pode afirmar se o Giemsa sozinho é ou não suficientemente adequado para detectar assimetria lateral, quer em *C. dewevrei* ou quer em *C. racemosa*, como visto pela impregnação pela prata.

Robson e Williams (1977, apud GUERRA FILHO, 1983) observaram, com o emprego de Giemsa somente e com técnica de bandamento-C e -G, coincidência do padrão de coloração diferencial, nos cromossomos do mixomiceto *Dictyostelium discoideum*.

GUERRA FILHO (1983) empregou a coloração Giemsa após

hidrólise clorídrica nos cromossomos de diversos vegetais, concluindo que, nestas circunstâncias, o uso de Giemsa era melhor adequado para a visualização de segmentos densamente condensados em contraposição àqueles menos condensados, para vegetais com cromossomos pequenos. Observou discrepâncias quanto a posição dos segmentos corados pelo Giemsa com aqueles bandados pelas técnicas de bandas-C, em um mesmo espécime vegetal, como em *Citrus sinensis*.

Com respeito às soluções fixadoras, pelo que se pôde observar, não houve interferência apreciável dos fixadores com a formação de bandas.

Segundo CROSSEN (1973), as soluções fixadoras de ácido acético-metanol 1:3, ou ácido acético-etanol 1:3 não interfeririam com o padrão de bandas nos cromossomos. Outras, como o ácido acético-metanol 1:1, resultariam em preparações com cromossomos indistintos.

HOLMQUIST (1979) observou que o uso de fixadores como o metanol não eram recomendados, porque o mesmo interferia consideravelmente na etapa de depuração do DNA no bandamento C.

No caso, não foi usado o metanol puro, sendo a solução mais usada a mistura de ácido acético-etanol 1:1, o que segundo HOLMQUIST (1979) é recomendado.

BURKHOLDER & DUCZEK (1980a) observaram a extração de uma parte das proteínas histônicas através da fixação em metanol-ácido acético 3:1, o que seria importante para a formação de bandas. Essa idéia até certo ponto contradiz em parte com aquela proposta por HOLMQUIST (1979), no que diz respeito ao bandamento C.

Nos cromossomos mitóticos das raízes de *Allium cepa*, MELLO *et al.* (1976) observaram que durante a etapa de hidrólise ácida em HCl 4N (26°C) cerca de 60 a 70% das histonas eram removidas dos cromossomos o que, segundo os autores estaria relacionado com o mecanismo de ação do reativo de Schiff.

A ausência de coloração pelo método de Feulgen, tanto para os cromossomos das células dos endospermas de *C. dewevrei* como de *C. racemosa*, pode ser atribuída a diferentes fatores. Um deles é o tempo requerido pelo material na etapa da hidrólise ácida (HCl), que pode variar. MELLO *et al.* (1976) observaram que os cromossomos metafásicos de *Allium cepa*, quando submetidos de 20 a 30 minutos à hidrólise clorídrica, apresentavam somente os telômeros corados após o uso do reativo de Schiff. Comparativamente aos dados obtidos por VOSA (1976b) essas regiões coradas pela reação de Feulgen corresponderiam àquelas obtidas pelo emprego de bandas-C.

MARKS (1983) observou que em cromossomos de raízes de *Anemone blanda*, *Scilla siberica* e *Fritillaria lanceolata*, tempos de exposição prolongados destes materiais em hidrólise ácida por HCl 5N a temperatura ambiente (60 a 100 minutos) levavam a formação de segmentos cromossômicos diferencialmente corados, sendo que estas bandas obtidas pelo uso do método de Feulgen coincidiam com a posição daquelas reveladas pelo bandamento-C. Tempos curtos de exposição do material não eram suficientes para a formação de bandas, permanecendo os cromossomos com um tom pálido.

Além do tempo da hidrólise que pode ter sido insuficiente para os cromossomos de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, outras explicações podem ser levantadas para explicar essa ausência de coloração pela reação Feulgen, como (1) provável presença de pro-

teínas básicas remanescentes as quais, de acordo com MELLO *et al.* (1976) e MELLO & VIDAL (1977) poderiam assumir propriedades das chamadas proteínas residuais (acidídicas) durante esse tratamento, não se descomplexando do DNA e, portanto, não expondo as purinas à ação do HCl; (2) grau de compactação dos cromossomos o que de acordo com Gledhill (1966, apud MELLO & VIDAL, 1977) é devido aos tipos de complexos nucleoprotéicos formados que originam diferentes graus de enrolamento e condensação do filamento cromatínico; (3) resistência maior à despolimerização do ácido apurínico, como demonstrado por MELLO (1978) em *Triatoma infestans*, para a heterocromatina em relação à eucromatina.

Seriam necessárias novas observações quanto à etapa hidrolítica em HCl nos cromossomos dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa* para se concluir qual concentração de HCl seria a mais adequada e qual o melhor tempo de hidrólise do material para a obtenção de segmentos cromossômicos corados pelo método de Feulgen.

Finalizando, a despeito das modificações introduzidas nas técnicas de bandamento cromossômico (C, G e NOR), as mesmas se mostraram-se promissoras na elaboração de um cariótipo para *C. dewevrei* e *C. racemosa*. O bandamento cromossômico, em plantas como essas que possuem cromossomos pequenos, é possível, desde que ajustada a técnica ao material.

6. CONCLUSÕES

A atividade mitótica mais intensa nos endospermas de *C. dewevrei* raça *excelsa*, é verificada nas camadas mais externas ou naqueles endospermas com um tamanho de até 4 mm.

Plantas de cromossomos pequenos como *C. dewevrei* e *C. racemosa* são sensíveis às técnicas de bandamento cromossômico.

As técnicas devem ser adaptadas ao material, no caso o endosperma, no sentido de se obter melhores resultados.

O emprego das técnicas que produzem bandas-C, bandas com o emprego da tripsina e bandas obtidas pela impregnação pela prata indicaram similaridades entre alguns grupos de cromossomos como o grupo 1, quando se comparou os resultados de bandas pelos três procedimentos dentro da mesma espécie e entre espécies de café.

Com base nas similaridades de algumas bandas comuns às técnicas C, G e NOR, parece que o mecanismo envolvido no bandamento cromossômico está relacionado com o grau de compactação dos cromossomos e não somente ao mecanismo de denaturação-renaturação do DNA ou somente à extração de proteínas e DNA.

Não se pode afirmar se os segmentos cromossômicos diferenciados pelas técnicas de bandamento aqui usadas corresponderiam entre si a regiões heterocromáticas de replicação tardia.

O emprego de solução de tripsina nos cromossomos de *C. dewevrei* e *C. racemosa* induz a formação de bandas. Não se pode afirmar se estas são iguais às bandas-G que ocorrem nos cromossoo

mos de mamíferos.

A assimetria lateral de bandas observadas em alguns cromossomos de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, através da impregnação pela prata, poderia estar relacionada: (a) a distribuição desigual de bases A-T do DNA; (b) a variações do conteúdo de DNA sat ou de outro DNA repetitivo; (c) a permutas desiguais entre cromátides irmãs; (d) consequência de pequenos arranjos cromossômicos.

O uso de solução Giemsa após o despregamento da lamínula parece ser eficiente para a visualização de segmentos corados distintamente. Novas lâminas devem entretanto, serem feitas para se confirmar esse dado.

O fato de não se ter obtido coloração dos cromossomos dos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, pelo método de coloração de Feulgen, não indica que os cromossomos desse tecido não tenha quantidade apreciável de heterocromatina ou que não sejam sensíveis à hidrólise.

A idade das lâminas após o despregamento da lamínula indicou ser um fator que interfere no bandamento.

A pouca quantidade de células na prometáfase e metáfase, verificada nos endospermas de *C. dewevrei* e *C. racemosa*, provavelmente está relacionada com o tratamento a baixa temperatura (0°C) em solução de KCl a 0,075 M de concentração, a que foi submetido este tecido.

Os dados embora iniciais, indicam que o emprego de soluções fixadoras à base de álcool etílico absoluto e ácido acético glacial, em combinações, não interferem no bandamento.

Não se pôde estabelecer um cariótipo preciso, por nenhuma das técnicas empregadas, para *C. dewevrei* e *C. racemosa*. No entanto, pelos resultados obtidos, acredita-se que estas técnicas sejam válidas para promoverem a diferenciação longitudinal dos cromossomos de café, pretendendo-se intensificar seu uso para a obtenção de um cariótipo para essas espécies de café aqui estudadas e também para algumas outras.

A despeito do uso das modificações de bandas-C, -G e NOR, em *C. racemosa*, não se constatou a presença de um segundo conjunto de cromossomos homólogos satélites (SAT).

7. LITERATURA CITADA

- ALVES, P. 1982. The structure and position of mouse centromeric heterochromatin in BrdU-labelled chromosomes and diplochromosomes stained by the pH 10.4 method. Chromosoma, 85:713-22.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P. & SAUNDERS, G.F. 1970. Localization of repetitive DNA in the chromosomes of *Microtus agrestis* by means of in situ hybridization. Chromosoma, 32: 224-36.
- ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics, 10:81-6.
- AYRES, G.C.M. 1954. A ocorrência de plasmodesmas no endosperma de *Coffea arabica* var. *typica* Cramer. Bragantia, 13(22):281-6.
- BABCOCK, E.B. & CAMERON, D.R. 1934. Chromosomes and phylogeny in *Crepis*, II: the relationships of one hundred eight species. Univ. Calif. Publ. Agr. Sci., 6:287-324.
- BACK, F. 1976. The variable condiction of euchromatin and heterochromatin. Int. Rev. Cytol., 45:25-64.
- BENTHAM, G. & HOOKER, J.D. 1873. Rubiaceae. In: ——— & ——— ed. Genera Plantarum. 1873/1876. Londres, Reeve & Co; William & Norgate. V.2, p.7-151.
- BENTZER, B. & LANDSTRÖM, T. 1975. Polymorphism in chromosomes of *Leopoldia comosa* (Liliaceae) revealed by Giemsa staining. Hereditas, 80:219-32.

- BERLOWITZ, L. 1974. Chromosomal inactivation and reactivation in mealy bugs. Genetics, 78:311-22.
- BERLOWITZ, L.; PALLOTTA, D. & SIBLEY, C.H. 1969. Chromatin and histones: binding of tritiated actinomycin D to heterochromatin in mealy bugs. Science, 164:1527-29.
- BERTHAUD, J. & GUILLAUMET, J.L. 1978. Les caféiers sauvages en Centrafrique. Resultats d'une mission de prospection (janvier-fevrier 1975). Café Cacao Thé, 22(3):171-86.
- 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., 65:77-84.
- BERTHOU, F. & TROUSLOT, P. 1977. L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en serie; premiers resultats. In: 8ème. Colloque Scientifique International sur le café, Abidjan, ASIC, p.373-83.
- BERTHOU, F.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F. & QUETIER, F. 1980. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. arabica*. Café Cacao Thé, 24(4):313-26.
- BERTHOU, F.; VEDEL, F. & MATHIEU, C. 1982. Variation dans le structures de l'ADN des organites cellulaires chez les principales espèces du genre *Coffea*. In: 10ème Colloque International sur le café, Salvador(BA), ASIC. p.67-8.

- BLACK, M.M. & ANSLEY, H.R. 1964. Histone staining ammoniacal silver. Science, 143:693-5.
- BLOOM, S.E. & GOODPASTURE, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum. Genet., 34:199-206.
- BOUHARMONT, J. 1959. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre Coffea. Bruxelles, INEAC. 94p. (Série Scientifique, no. 77).
- BOUHARMONT, J. 1963. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. Euphytica, 12: 254-7.
- BRIDSON, D.M. 1982. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. Cinchonoideae) for part 2 of "Flora of Tropical East Africa": Rubiaceae. Kew Bull., 36(4):817-59.
- BROWN, R. 1951. The effects of temperature on the duration of the different stages of cell division in the root-tip. J. Exp. Bot., 2(1):96-110.
- BROWN, R.L.; PATHAK, S. & HSU, T.C. 1975. The possible role of histones in the mechanism of chromosomal G-banding. Science, 189:1090-1.
- BROWN, S.W. 1966. Heterochromatin. Science, 151:417-25.
- BRUTLAG, D.L. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatin. Annu. Rev. Genet., 14:121-44.
- BURKHOLDER, G.D. & DUCZEK, L.L. 1980a. Proteins in chromosome

- banding. I. Effect of G-banding treatments of proteins of isolated nuclei. Chromosoma, 79:29-41.
- BURKHOLDER, G.D. & DUCZEK, L.L. 1980b. Proteins in chromosome banding. II. Effect of R- and C-banding treatments on the proteins of isolated nuclei. Chromosoma, 79:43-51.
- BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. 1982. A relation between G-, C- and N-band patterns as revealed by progressive oxidation of chromosomes and a note on the nature of N-bands. Genetica, 58:3-9.
- BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. 1984. Seletive staining of the some set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. Chromosoma, 89:387-396.
- CARVALHO, A. 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial a espécies arbórea. Separatas dos Boletim da Superintendência dos Serviços do café, São Paulo, 226/228 e 230. 33p.
- CARVALHO, A.; FERWERDA, F.P.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; MEDINA, D.M.; MENDES, A.J.T. & MÔNACO, L.C. 1969. In: FERWERDA, F.P. & WIT, F. ed. 1969. Outline of perennial crops breeding in the tropics. Wageningen, Landbouwhogeschool Wageningen. Misc. Paper 4. p. 189-241.
- CARVALHO, A. & MÔNACO, L.C. 1959. Híbridos entre *Coffea* e *Psilanthopsis*. Bragantia, 18:21-9.
- CARVALHO, A.; TEIXEIRA, A.A. & FAZUOLI, L.C. 1982. Possibilidade de aproveitamento do café excelsa (*Coffea dewevrei*). Ciência. Cult., 34(7):14. Resumos.

CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E.J.; SIMONSSON, E.; WAGH, U. & ZECH, L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell Res., 49: 219-22.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; WAGH, U. & SIMONSSON, E. 1969a. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. Exp. Cell Res., 58:128-40.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; WAGH, U. & SIMONSSON, E. 1969b. DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. Exp. Cell Res., 58:141-52.

CHARRIER, A. 1975. Contribution a l'étude génétique de *Mascarocoffea*. In: 7 me. Colloque International sur le café, Hambourg, ASIC. p.483-95.

CHARRIER, A. 1977. La structure génétique du genre *Coffea*; ses conséquences pour l'amélioration des caféiers cultivés. In: 8 me. Colloque Scientifique International sur le café, Abidjan, ASIC. p.399-405.

CHARRIER, A. 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache. *Mascarocoffea*. Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Paris, O.R.S.T. O.M. Mémoires n  87. 223p.

CHEVALIER, A. 1929. Les caféiers du globe: I. Généralités sur les café. Paris, Paul Lechevalier. 196p. (Encyclopédie agricole n  5).

- CHEVALIER, A. 1947. Les caféiers du globe: III. Systematique des Caféiers et faux-caféiers, maladies et insectes nuisibles. Paris, Paul Lechevalier. 356p. (Encyclopédie biologique n° 22).
- CHIARELLI, B.; CHIARELLI, M.S. & SHAFER, D.A. 1972. Chromosome banding with trypsin. Genetica, 43:190-4.
- CHINNAPPA, C.C. 1974. B chromosome in *Coffea arabica*. J. Coffea Res., 4(3):61-6.
- 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 un the genus *Coffea*. I. Scanning electron microscopy. J. Coffee Res., 4(2):29-39.
- CHINNAPPA, C.C. & MORTON, J.K. 1978. Heterochromatic banding patterns in two species of *Trillium*. Can. J. Genet. Cytol., 19:667-78.
- CHINNAPPA, C.C. & WARNER, B.G. 1982. Domatia and leaf epidermal characteristics in relation to pollen morphology in *Coffea* L. J. Coffee Res., 12(4):85-91.
- COMINGS, D.E. 1972. The structure and function fo chromatin. Adv. Hum. Genet., 3:237-431.
- COMINGS, D.E. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. Exp. Cell Res., 77:469-93.

- COMINGS, D.E. 1977. Chromosome banding and chromosome proteins. III. In: III Congresso Latinoamericano de Genética, Montevideo (Uruguay). p.24-33. (Resūmenens).
- COMINGS, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Annu. Rev. Genet., 12:25-46.
- COMINGS, D.E. & AVELINO, E. 1975. Mechanisms of chromosomes banding. VII. Interaction of methylene blue with DNA and chromatin Chromosoma, 51:365-79.
- COMINGS, D.E.; AVELINO, E.; OKADA, T.A. & WYANDT, H.E. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. Exp. Cell Res., 77:469-93.
- COMINGS, D.E. & DRETS, M.E. 1976. Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding ? Chromosoma, 56:199-211.
- COMINGS, D.E.; KOVACS, B.W.; AVELINO, E. & HARRIS, D.C. 1975. Mechanisms of chromosome banding. V. Quinacrine banding. Chromosoma, 50:111-45.
- COMINGS, D.E. & MATTOCCIA, E. 1970. Studies of microchromosomes and G-C rich DNA satellite in the quail. Chromosoma, 30:202-14.
- CONAGIN, C.H.T.M. & MENDES, A.J.T. 1961. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia, 20(34):786-804.

- COOPER, J.E.K. & HSU, T.C. 1972. The C-band and G-band patterns of *Microtus agrestis* chromosomes. Cytogenetics, 11:295-304.
- COOPER, K.W. 1959. Cytogenetics analysis of major heterochromatic elements (specially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster* and theory of "heterochromatin". Chromosoma, 10: 535-88.
- COSTE, R. 1968. Le caféier. Paris, G.P. Maisonneuve & Larose. 310p.
- CROSSEN, P.E. 1973. Factors influencing Giemsa band formation of human chromosomes. Histochemie, 35:51-62.
- CRUZ, N.D. 1972. Aneuplóides de café - aspectos morfológicos e citológicos na análise de duas progênies de café "Mundo Novo" (*Coffea arabica*). Tese de Doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.
- DANIEL, A. & LAM-PO-TANG, P.R.L.C. 1973. Mechanisms for the chromosomes banding phenomenon. Nature, 244:358-9.
- DARLINGTON, C.D. & LA COUR, L. 1940. Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. J. Genet., 60:185-213.
- DE CANDOLLE, A.P. 1830. Rubiaceae In: _____ ed. 1824/1873. Prodrum Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Paris, Treuttel et Wurtz. Vol.4, p.341-621.
- DEDECCA, D.M. 1957. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. Bragantia, 16(23):315-66.

- DEDECCA, D.M. 1958. Advances in coffee production technology. Recent advances in our knowledge of coffee trees. IV. Anatomy. Coffee & Tea Industries, 81(11):44-50.
- DEMARLY, Y. 1975. Amélioration du caféier liée aux progrès génétiques. In: 7ème. Colloque Scientifique International sur le café, Abidjan, ASIC. p. 423-435.
- DREWRY, A. 1982. G-banded chromosomes in *Pinus resinosa*. J. Herd., 73:305-6.
- DUTRILLAUX, B. 1973a. Application to the normal karyotype of R-band and G-band techniques involving proteolytic digestion. Nobel Symp., 23:38-42.
- DUTRILLAUX, B. 1973b. Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T. Chromosoma, 41:395-402.
- DUTRILLAUX, B.; GROUCHY, J.; FINAZ, C. & LEJEUNE, J. 1971. Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). C. R. Acad. Sci. Paris, sér.D. 273:587-8.
- ECKHARDT, R.A. & GALL, J.G. 1971. Satellite DNA associated with heterochromatin in *Rhynchosciara*. Chromosoma, 32:407-27.
- ELLISON, J.R. & BARR, H.J. 1972. Quinacrine fluorescent of specific chromosomes regions. Late replication and high AT content in *Samoaia leonensis*. Chromosoma, 36:375-90.
- FABER, F.C. VON. 1910. Een en Ander over de Biologie der Koffiebloenn. Teysmannia, 21:559-77.

- FABER, F.C. VON. 1912. Morphologisch-Physiologische Untersuchungen an Blüten von *Coffea*-Arten. Ann. Jar. Bot. Buitenz., sér. 2a., 25:59-160.
- FAGERLING, F. 1937. Embryologische, Zytologische und Bestäubungsexperimentelle Studien in der Familie Rubiaceae Nebst Bemerkungen über Einige Polyphoiditätsprobleme. Acta Horti-Bergiani, 11(9):199-460. (Tradução).
- FERWERDA, F.P. 1936. Die Befruchtungsverhältnisse bei den Niederländische-Indie angebauten Kaffeearten. Der Züchter, 8(4):92-102. (Tradução).
- FILION, W.G. 1974. Differential Giemsa staining in plants. I. Banding patterns in three cultivars of *Tulipa*. Chromosoma, 49(1):51-60.
- FILION, W.G. & BLAKEY, D.E. 1979. Differential Giemsa staining in plants. VI. Centromeric-banding. Can. J. Genet. Cytol., 21:373-8.
- FISKESJÖ, G. 1974. Two types of constitutive heterochromatin made visible in *Allium* by a rapid C-banding method. Hereditas, 78:153-6.
- FISKESJÖ, G. 1975. Chromosomal relationships between three species of *Allium* as revealed by C-banding. Hereditas, 81:23-32.
- FORNI-MARTINS, E.R. 1984. Estudos citotaxonômicos no complexo *Phaseolus-Vigna-Macropitilium* (Leguminosae-Papilionoideae). Tese de Mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

- FUNAKI, K.; MATSUI, S.I. & SASAKI, M. 1975. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. Chromosoma, 49:357-70.
- GALLOWAY, S.M. & EVANS, H.J. 1975. Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man. Preliminary notes. Exp. Cell Res., 94 (2):454-9.
- GERLACH, W.L. 1977. N-banded karyotype of wheat species. Chromosoma, 62:49-56.
- GERLACH, W.L. & PEACOCK, W.J. 1980. Chromosomal locations of highly repeated DNA sequences in wheat. Heredity, 44(2):269-76.
- GILOT-DELHALLE, J.; DEGRAEVE, N. & MOUTSCHEN, J. 1976. Cytotaxonomic investigation of the genus *Nigella* (Helleboraceae) with C-banding techniques. Caryologia, 29(2):139-54.
- GODIN, D.E. & STACK, S.M. 1975. Heterochromatic connectives between the chromosomes of *Secale cereale*. Can. J. Genet. Cytol., 17(2):269-74.
- GOMEZ, K.A. & GOMEZ, A.A. 1984. Statistical procedures for agricultural research. 2nd.ed. New York, John Wiley & Sons. 680p.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma, 53:37-50.
- GOSTEV, A. & ASKER, S. 1979. A C-banding technique for small

- plant chromosomes. J. Hered., 91:140-3.
- GREILHUBER, J. 1975. Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C-bands in *Vicia faba*. Plant Syst. Evol. 124:139-56.
- GREILHUBER, J. 1977. Why plant chromosomes do not show G-bands. Theor. Appl. Genet., 50:121-4.
- GREILHUBER, J. 1984. Chromosomal evidence in taxonomy. In: HEYWOOD, V.H. & MOORE, D.M. ed. 1984. Current Concepts in Plant Taxonomy. Londres, Acad. Press. V.25, p.157-80.
- GREILHUBER, J. & SPETA, 1978. Quantitative analysis of C-banded karyotypes, and systematics in the cultivated species of the *Scilla siberica* groups (Liliaceae). Plant Syst. Evol., 129:63-109.
- GUERRA FILHO, M.S. 1983. O uso de Giemsa na citogenética vegetal-comparação entre a coloração simples e o bandamento. Ciênc. Cult., 35(2):190-3.
- HAARER, A.E. 1958. Modern coffee production. Londres, Leonard Hill Ltd. 467p.
- HALLÉ, N. & FARIA, T. 1973. Le *Coffea racemosa* Lour. Agron. Moçambicana, 7(4):243-50.
- HANNAH, A. 1951. Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Adv. Genet., 4:87-125.
- HENNIG, W.; HENNIG, I. & STEIN, H. 1970. Repeated sequences in

- the DNA of *Drosophila* and their localization in Giant chromosomes. Chromosoma, 32:31-63.
- HERSKOWITZ, M.H. 1961. The hypothesis of nucleotide sharing by adjacent functional units of DNA. Genetics, 46:870.
- HEYN, A.N.J. 1936. Cytologische onderzoeken aan enkele Tropische Cultuurgewassen en de Beteekenis van degelijke onderzoeken voor de Plantenveredeling. Landbouw, 12(1):11-42. (Tradução).
- HOLMQUIST, G. 1979. The mechanism of C-banding depurination and β -elimination. Chromosoma, 72(1):203-24.
- HOMEYER, H. 1933. Zur Zitologie der Rubiaceen. Planta, 18:640.
- HOUK, W.G. 1938. Endosperm and perisperm of coffee with notes on the morphology of the ovule and seed development. Amer. J. Bot., 25:56-61.
- HOUK, W.G. 1939. Nomenclatura dos cafeeiros, lista de referências e bibliografias. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo. 49p. (Boletim técnico nº 63).
- HOWELL, W.M. 1977. Visualization of ribosomal gene activity; silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. Chromosoma, 62:361-7.
- HSU, T.C. 1973. Constitutive heterochromatin (C-band) technique. Nobel Symp., 23:32-33.

- HSU, T.C. 1974. Longitudinal differentiation of chromosomes. Annu. Rev. Genet., 7:153-76.
- HSU, T.C. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. Genetics, 79:137-50.
- HUANG, C.C. 1971. Replication of euchromatin and heterochromatin in mealy bug. Chromosoma, 34:230-42.
- JEWELL, D.C. 1981. Recognition of two types of positive staining chromosomal material by manipulation of critical steps in the N-banding technique. Stain Technol., 56:227-34.
- JONES, R.N. 1975. B chromosome systems in flowering plants and animals species. Int. Rev. Cytol., 40:1-100.
- KATO, H. & MORIWAKI, K. 1972. Factor involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. Chromosoma, 38:105-20.
- KONGSUWAN, K. & SMYTH, D.R. 1977. Q-bands in *Lilium* and their relationships to C-banded heterochromatin. Chromosoma, 60:169-78.
- KONGSUWAN, K. & SMYTH, D.R. 1978. DNA loss during C-banding of chromosomes of *Lilium longiflorum*. Chromosoma, 68:59-68.
- KONGSUWAN, K. & SMYTH, D.R. 1980. Late labelled regions in relation to Q- and C-band in chromosomes of *Lilium longiflorum* and *L. pardalinum*. Chromosoma, 76:151-64.
- KRUG, C.A. 1934. Contribuição para o estudo da cytologia do gê

- nero *Coffea*. Campinas, Instituto Agronômico. 10p. (Boletim técnico nº 11).
- KRUG, C.A. 1936. Estudos cytologicos em *Coffea*. II. Campinas, Instituto Agronômico. 5p. (Boletim técnico nº 27).
- KRUG, C.A. 1937. Observações citológicas em *Coffea*. III. Campinas, Instituto Agronômico. 19p. (Boletim técnico nº 27).
- KRUG, C.A. 1945. Melhoramento do cafeeiro: doze anos 1933-1944 de pesquisas básicas e aplicadas realizadas nas seções de Genética, Café e Citologia do Instituto Agronômico. Separata dos Boletim da Superintendência dos Serviços do Café, São Paulo 222/224. 32p.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A. 1939. Genetical proof for the existence of coffee endosperm. Nature, 144(3646):515.
- KRUG, C.A. & CARVALHO, A. 1951. The genetics of *Coffea*. Adv. Genet., 4:127-58.
- KRUG, C.A. & MENDES, A.J.T. 1943. Conhecimentos gerais sobre a genética e citologia do gênero *Coffea*. Rev. Agric.(Piracicaba), 18(11 e 12):399-408.
- KRUG, C.A. & MENDES, A.J.T. 1944. A importância da genética e da citologia para o melhoramento do cafeeiro. Boletim da Superintendência dos Serviços do Café, São Paulo 209:746-51.
- KUSH, G.S.; RICK, C.M. & ROBINSON, R.W. 1964. Genetics activity in a heterochromatic chromosome segment of the tomato. Science, 145:1432-4.

- LAMPE, L. 1931. A microchemical and morphological study of the developing endosperm of maize. Bot. Gaz., 91(4):337-76.
- LEBRUN, J. 1941. Recherches morphologiques et systématiques sur les caféiers du Congo. s.l., INEAC. 184p. (Hors série).
- LECOMTE, T. 1899. Le café. Culture, manipulation production. Paris, G. Carré et C. Naud. 342p.
- LEJEUNE, J. 1973. Scientific impact of study of fine structure of chromatids. Nobel Symp., 23:16-24.
- LELIVELD, J.A. 1938. Vruchtzetting bij Koffie. Arch. voor der Koffie-cultuur in Ned. Indie, 3:127-64.
- LEROY, J.F. 1961. *Coffea novae Madagascariensis*. J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 8(1 a 3):1-20.
- LEROY, J.F. 1962a. Prospection des caféiers sauvages: Rapport préliminaire sur une mission scientifique à Madagascar et aux Iles Mascareignes (27 avril-15 juillet 1962). J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 9(3/6):211-44.
- LEROY, J.F. 1962b. Sur l'existence d'un caféier sauvage aux îles Philippines: *Coffea mabesae* (Elmer) J.F.Ler. (Subg. *Paracoffea*) J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 9(7/10):417-9.
- LEROY, J.F. 1962c. *Coffeae novae Madagascariensis et Mauritiana*. J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 9(11/12):525-30.
- LEROY, J.F. 1967a. Diagnose différentielle du genre *Paracoffea* Ler. J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 14(6/7):226.

- LEROY, J.F. 1967b. Recherches sur les caféiers. Sur la classification biologique des caféiers et sur l'origine et aire du genre *Coffea*. C. R. Acad. Sci. Paris, sér.D, 265:1043-5.
- LEROY, J.F. 1967c. Recherches sur les caféiers. Esquisse d'une théorie sur l'évolution des espèces. C. R. Acad. Sci. Paris, sér.D, 265:1373-6.
- LEROY, J.F. 1972. Prospection des caféiers sauvages de Madagascar deux espèces remarquables. Adansonia, sér. 2, 12(2):317-28.
- LEROY, J.F. & PLU, A. 1966. Sur le nombres chromosomiques des *Coffea* malgaches. Café Cacao Thé, 10(3):216-7.
- LEVAN, A. 1946. Heterochromaty in chromosomes during their contraction phase. Hereditas, 32:449-68.
- LIMA-DE-FARIA, A. 1959. Incorporation of tritiated Thymidine into meiotic chromosome. Science, 130:503-4.
- LIMA-DE-FARIA, A. & JAWORSKA, H. 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature, 217:138-42.
- LIMA-DE-FARIA, A.; REITALU, J. & O'SULLIVAN, M.A. 1965. Replication of autosomal heterochromatin in man. Chromosoma, 16:152-61.
- LIMA-DE-FARIA, A.; SARVELLA, P. & MORRIS, R. 1959. Differential chromomere numbers at meiosis and mitosis in *Ornithogalum*. Hereditas, 45:467-80.
- LIMIN, A.E. & DVORÁK, J. 1976. C-banding of rye chromosomes with cold SSC bufer. Can. J. Genet. Cytol., 18(3):491-6.

- LIN, C.C. & SANDE, J.H. VAN DE. 1975. Differential fluorescent staining of human chromosomes with daunomycin and adriamycin-The D-bands. Science, 190:61-3.
- LIN, M.S. & DAVIDSON, R.L. 1974. Centric fusion, satellite DNA and DNA polarity in mouse chromosomes. Science, 185:1179-81.
- LINNAEUS, C. VON. 1762. *Specie Plantarum*. 2ed. Stockholm, Laurentii Salvi. v.1, p.245-6.
- LITTAU, V.C.; BURDICK, C.J.; ALLFREY, V.G. & MIRSKY, A.E. 1965. The role of histones in the maintenance of chromatin structure. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 54:1204-12.
- LOEWUS, M.W.; BROWN, S.W. & MC LARDEN, A.D. 1964. Base ratio in DNA in male and female *Planococcus citri*. Nature, 203:104.
- LONGO, C.R.L. 1972. Estudos dos pigmentos falvonóides e sua contribuição a filogenia do gênero *Coffea*. Tese de Doutoramento apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.
- LOPES, C.R. & MÔNACO, L.C. 1979. Chemotaxonomic studies of some species of the genus *Coffea*. J. Plant Crops, 7(1):6-14.
- LOPES, C.R.; SHEPHERD, G.J. & CURI, P.R. 1985. Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de *Coffea*. In: V. Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, Botucatu. p.165. Resumos.
- LOUARN, J. 1972. Introduction à l'étude génétique des *Mascarocoffea*; Nouvelles déterminations de leurs nombres chromosomiques. Café Cacao Thé, 16(4):312-6.
- LUBS, H.A.; MCKENZIE, W.H. & MERRICK, S. 1973. Comparative methodology and mechanisms of banding. Nobel Symp., 23:315-22.

- LYON, M.F. 1974. Gene and chromosome inactivation. Genetics, 78:305-9.
- MACGREGOR, H.C. & KEZER, J. 1971. The chromosomal localization of a satellite DNA in the testis of *Plethodon cinereus cinereus*. Chromosoma, 33:167-82.
- MAGLIO, C.A.F.P. 1983. Morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno no gênero *Coffea* L. Tese de Mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.
- MARKS, G.E. 1983. Feulgen banding of heterochromatin in plant chromosomes. J. Cell Sci., 62:171-6.
- MARKS, G.E. & SCHWEIZER, D. 1974. Giemsa banding: karyotype differences in some species of *Anemone* and *Hepatica nobilis*. Chromosoma, 44:405-21.
- MASUBUCHI, M. 1974. Early replicating DNA in heterochromatin of *Plagiochila ovalifolia* (liverworts). Bot. Mag. Tokyo, 87: 229-35.
- MATÉRN, B. & SIMAK, M. 1968. Statistical problems in karyotypes. Hereditas, 59:280-8.
- MATSUI, S.I. & SASAKI, M. 1973. Differential staining of organisms in mammalian chromosomes. Nature, 246:148-50.
- MCKENZIE, W.H. & LUBS, H.A. 1973. An analysis of the technical variables in the production of C-bands. Chromosoma, 41:175-82.
- MEDINA, D.M. 1960. Macrosporogênese, formação e desenvolvimento

- to do saco embrionário, do endosperma e do embrião em *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. Bragantia, 19:767-84.
- MEDINA, D.M. 1964. O endosperma de café como material para estudos citológicos. Bragantia, 23:179-86.
- MEDINA, D.M. 1965. Novas observações citológicas no endosperma de café. Bragantia, 24:369-84.
- MEDINA, D.M. 1972. Caracterização de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Tese de Doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.
- MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. 1959. Autoincompatibilidade em *Coffea dewevrei* De Wild et Th. Dur. Bragantia, 18:283-93.
- MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. & CRUZ, N.D. 1974. Microsporogênese em *C. liberica* Hiern., *C. racemosa* Lour., *C. kapakata* Hirsch e *C. eugenoides* Moore. Ciênc. Cult., 26:277.
- MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. & CRUZ, N.D. 1977. Microsporogenesis in diploid species of *Coffea*. Caryologia, 30(1):13-25.
- MEDINA, D.M. & RIJO, L. 1969. Microsporogênese em *Coffea stenophylla* G. Don. e *C. salvatrix* Swynn et Phil. Bragantia, 28:307-22.
- MEDINA, F.J.; RISUENO, M.C.; SANCHEZ-PINA, M.A. & FERNANDEZ - GOMEZ, M.E. 1983. A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. Chromosoma, 88(2):149-55.

- MEHRA, R.C. & FOGLE, T.A. 1982. Chromosome banding and karyotype analysis in *Phlox drummondii*. J. Hered., 73:345-8.
- MELLO, M.L.S. 1978. Heterocromatina. Ciênc. Cult., 30(3):290-303.
- MELLO, M.L.S.; CASEIRO FILHO, A.C. & CARVALHO, A.C. 1976. A hidrólise ácida e a reação de proteínas básicas de núcleos interfásicos e de cromossomos mitóticos. Rev. Bras. Biol., 36(1):171-7.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. 1977. A reação de Feulgen. Ciênc. Cult., 29(6):665-76.
- MENDES, A.J.T. 1938a. Os cromossômios das Rubiáceas. Campinas, Instituto Agronômico. 11p. (Boletim tecnico nº 55).
- MENDES, A.J.T. 1938b. Morfologia dos cromossômios de *Coffea excelsa* Chev. Campinas, Instituto Agronômico. 8p. (Boletim Tecnico nº 56).
- MENDES, A.J.T. 1941. Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. Amer. J. Bot., 28:784-9.
- MENDES, A.J.T.; MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. 1954. Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes do café "Mundo Novo". Bragantia, 13:257-79.
- MERKER, A. 1973. A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in *Triticale*. Hereditas, 75:280-2.

- MERRICK, S.; LEDLEY, R.S. & LUBS, H.A. 1973. Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. Pediatr. Res., 7:39-44.
- MILLER, O.J.; SCHRECK, R.R.; BEISER, S.M. & ERLANGER, B.F. 1973. Immunofluorescent studies of chromosome banding with anti-nucleoside antibodies. Nobel Symp., 23:43-8.
- MODEST, E.J. & SENGUPTA, S.K. 1973. Chemical correlates of chromosome banding. Nobel Symp., 23:327-334.
- MOH, C.C. 1966. The effect of low temperature in meristematic cells of the shoot apex of beans. Caryologia, 19(4):473-8.
- MOH, C.C. & ALÁN, J.J. 1964. The effect of low temperature on mitosis in the root tips of beans. Caryologia, 17(2):409-15.
- MOK, D.W.S. & MOK, M.C. 1976. A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. J. Hered., 67:187-8.
- MÔNACO, L.C. & CARVALHO, A. 1967. Genetic relationships of selected *Coffea* species. Ciênc. Cult., 19(1):151-65.
- MÔNACO, L.C. & CARVALHO, A. 1972. Incompatibilidade em *Coffea racemosa*. Ciênc. Cult., 24:150.
- MORISHIMA, A.; GRUMBACK, M. & TAYLOR, J.H. 1962. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 48:756-63.
- MOUTSCHEN, J. & GILOT-DELHALLE, J. 1973. Constitutive centromeric heterochromatin in *Nigella damascena*. Nucleus(Calcutta),

16(3):147-9.

- MURATA, M. & ORTON, T.J. 1984. G-band-like differentiation in mitotic prometaphase chromosomes of celery. J. Hered., 75:225-8.
- NATARAJAN, A.T. & GROOP, A. 1971. The meiotic behavior of autosomal heterochromatin segments in hedgehogs. Chromosoma, 35:143-52.
- OKADA, T.A. & COMINGS, D.E. 1974. Mechanisms of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomers of mitotic chromosomes. Chromosoma, 48:65-71.
- ODD, J.L. & SCHOLTEN, R. 1982. The staining of constitutive heterochromatin, and A-T and C-G rich DNA in lymphocytes and primary spermatocytes of the Chinese hamster. Genetica, 58:55-63.
- ÖZKINAY, C. & MITELMAN, F. 1979. A simple-trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. Hereditas, 90:1-4.
- PARDUE, M.L. & GALL, J.G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168:1356-8.
- PARIS CONFERENCE (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects. Orig. Art. ser. VIII. 7, 1972. New York, The National Foundation. p.1-46.
- PIZA, S.T. 1929. Observações sobre a caryocinese na raiz do caféiro. Rev. Agric. (Piracicaba), 4(1 e 2):9-12.

- PORTÈRES, R. 1962. Sur quelques caféiers sauvages de Madagascar. J. Agric. Trop. et Bot. Appl., 9(3/6):201-10.
- RAM, A.S. 1983. A chemotaxonomic study of some species of *Coffea*. Café Cacao Thé, 27(3):183-90.
- RAM, A.S.; SREENIVASAN, M.S. & VISHVESHWARA, S. 1982. Chemotaxonomy of *Mozambicoffea*. J. Coffee Res., 12(2):42-6.
- RIGLER, R. 1973. Interactions between acridines and DNA. Nobel Symp., 23:335-41.
- ROCCHI, A. 1982. On the heterogeneity of heterochromatin. Caryologia, 35(2):169-89.
- SANDE, J.H. VAN DE; LIN, C.C. & JORGENSEN, K.F. 1977. Reverse banding on chromosomes produced by a guanosine-cytosine specific DNA binding antibiotic: olivomycin. Science, 195:400-2.
- SATO, S. & YOSHIOKA, T. 1984. Heterogeneity of heterochromatic segments in *Notoscordum fragrans* chromosomes. Caryologia, 37:197-205.
- SCHNEDL, W. 1974. Banding patterns in chromosomes. Int. Rev. Cytol., supp 4:237-72.
- SCHNEDL, W. & CZAKER, R. 1974. Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat and sheep chromosomes (Bovidae). Cytogenet. Cell Genet., 13:246-55.
- SCHWEIZER, D. 1973. Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. Chromosoma, 40:307-20.

- SCHWEIZER, D. 1974. An improved Giemsa C-banding procedure for plant chromosomes. Experientia (Basel.), 30(5):570-1.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma, 58:307-24.
- SCHWEIZER, D. 1977. R-banding produced by DNase I digestion of chromomycin-stained chromosomes. Chromosoma, 64:117-24.
- SEABRIGHT, M. 1971. The use of proteolytic enzymes for mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. Chromosoma, 36:204-10.
- SHANKLAND, N.E. & GRANT, W.F. 1976. Localization of Giemsa bands in *Lotus pedunculatus* chromosomes. Can J. Genet. Cytol., 18(2):239-44.
- SHIRAIISHI, Y. & YOSIDA, T.H. 1972. Banding patterns analysis of human chromosomes by use of a urea treatment technique. Chromosoma, 37:75-85.
- SILVA, H.L. 1956. Número de cromossomos em *Coffea racemosa* Lour. Bragantia, 15:17-8. (Nota nº5).
- SIMÕES, L.C.G.; AMABIS, J.M. & CESTARI, A.N. 1975. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. Ciênc. Cult., 27(2):159-61.
- SOLTIS, D.E. 1982. Heterochromatin banding in *Boykinia*, *Heuchera*, *Mitella*, *Sullivantia*, *Tiarella* e *Tolmiea* (Saxifragaceae). Am. J. Bot., 69(1):108-15.

- STACK, S.M. & CLARKE, C.R. 1973a. Pericentromeric chromosomes banding in higher plants. Can. J. Genet. Cytol., 15(2):367-8.
- STACK, S.M. & CLARKE, C.R. 1973b. Differential Giemsa staining of the telomers of *Allium cepa* chromosomes: observation related to chromosome pairing. Can. J. Genet. Cytol., 15(2):619-24.
- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Londres, Edward Arnold. 216p.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistics with special reference to the biological sciences. 2a. ed. New York, Mc Graw-Hill Book Co. 633p.
- STEFOS, K. & ARRIGHI, F. 1974. Repetitive DNA of *Gallus domesticus* and its cytological locations. Exp. Cell Res., 83:9-14.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res., 75:304-6.
- SYBENGA, J. 1960. Genetica y citologia del café. Una revision de literatura. Turrialba, 10:83-137.
- SYBENGA, J. 1963. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. Euphytica, 12:254-7.
- TAKAYAMA, S. & MATSUMOTO, K. 1982. G-band-like structures and centromeric asymmetry in the BrdU containing mouse chromosomes. Chromosoma, 85:583-90.
- TATUNO, S.; TANAKA, R. & MASUBUCHI, M. 1970. Early DNA synthesis in the X-chromosome of *Pellia neesiana*. Cytologia, 35:220-25.

- TAUNAY, A.E. 1939. A história do café no Brasil. In: _____ ed. A história do café no Brasil. Rio de Janeiro, Ed. do Departamento Nacional do Café do Rio de Janeiro. 1939/1943. v.1, 338p.
- THOMAS, A.S. 1944. The wild coffees of Uganda. Emp. J. Exp. Agric., 12:1-12.
- TUCCI, S.M. & SKALKO, R.G. 1977. Demonstration of lateral asymmetry in G-bands mouse embryo chromosomes. Experientia (Basel), 33(1):1437-8.
- TUCCI, S.M. & SKALKO, R.G. 1979. Chromosomes lateral asymmetry: a sensitive assay for screening teratogenic agents. J. Environ. Payhol. Toxicol., 2:625-32.
- TUCK-MULLER, C.M.; BORDSON, B.L.; KANE, M.M. & HAMILTON, A.E. 1984. A method for combined C-banding and silver staining. Stain Technol., 59(5):265-8.
- UTAKOJI, T. 1972. Differential staining patterns of human chromosomes treated with potassium permanganate. Nature, 239:168-9.
- UTAKOJI, T. 1973. Differential staining of human chromosomes after oxidation treatment. Nobel Symp., 23:346-9.
- VOSA, C.G. 1970. Heterochromatin recognition with fluorochromes. Chromosoma, 30:366-72.
- VOSA, C.G. 1973a. The enhanced and reduced quinacrine fluorescence bands and their relationships to the Giemsa patterns in

- Allium flavum*. Nobel Symp., 23:156-8.
- VOSA, C.G. 1973b. Heterochromatin recognition and analysis of chromosome variation in *Scilla sibirica*. Chromosoma, 43:269-78.
- VOSA, C.G. 1975. The use of Giemsa and other staining techniques in karyotype analysis. Curr. Adv. Pl. Sci., 6(14):495-510.
- VOSA, C.G. 1976a. Chromosomes banding patterns in cultivated and wild barleys (*Hordeum* spp). Heredity, 37:395-403.
- VOSA, C.G. 1976b. Heterochromatic banding patterns in *Allium*. II. Heterochromatin variation in species of the *paniculatum* group. Chromosoma, 57:119-33.
- VOSA, C.G. 1977. Heterochromatic patterns and species relationships. Nucleus(Calcutta), 20(1 e 2):33-9.
- VOSA, C.G. 1979. Heterochromatic banding patterns in the chromosomes of *Brimeura* (Liliaceae). Plant Syst. Evol., 132:141-8.
- VOSA, C.G.; D'AMATO, G.; CARPINERI, R.; MARCHI, P. & DOMINICIS, G. 1972. Quinacrine-like fluorescence of the extracts from Papaveraceae and Fumariaceae. Nature, 239:405-6.
- VOSA, C.G. & MARCHI, P. 1972. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. Nature(New Biol.), 237:191-2.
- WARD, D.C.; REICH, E. & GOLDGERG, I.H. 1965. Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs.

Science, 149: 1259-63.

WEIMARCK, A. 1974. Elimination of wheat and rye chromosomes in a strain of octoploide *Triticale* as revealed by Giemsa banding technique. Hereditas, 77:281-6.

WEIMARCK, A. 1975. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. Hereditas, 79: 293-300.

WELLMAN, F.L. 1961. Coffee, botany, cultivation and utilization. Londres, Leonard Hill Ltd. 488p.

WIMBER, D.E. 1966. Duration of the nuclear cycle in *Tradescantia* root tips at three temperatures as measured with H^3 -thymidine. Am. J. Bot., 53(1):21-4.

YEN, S.T. & FILION, W.G. 1977. Differential Giemsa staining in plants. V. Two types of constitutive heterochromatin in species of *Avena*. Can. J. Genet. Cytol., 19:739-43.

YUNIS, J.J. & YASMINEH, W.G. 1971. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Science, 174:1200-9.

ZECH, L. 1973. Fluorescence banding techniques. Nobel Symp., 23:28-31.

ZHENG, H.Z. & BURKHOLDER, G.D. 1982. Differential silver staining of chromatin in metaphase chromosomes. Exp. Cell Res., 141:117-25.