

Observações na Microsporogênese de *Coffea eugenioides* Moore com Número de Cromossomos Duplicado¹

Y.M.S. Boaventura*, N.D. da Cruz*, C.R.B. Gomes**

ABSTRACT

Although colchicine-induced polyploid plants of *Coffea eugenioides* were obtained by Mendes in 1939, no previous reports were found describing the meiotic behaviour of these plants. The present paper is a cytological study of *C. eugenioides* + Co with $2n = 44$ chromosomes, undertaken primarily due to the importance of this species as a putative ancestral of *Coffea arabica*. Floral buds were fixed in Carnoy and slides were prepared according to the usual aceto-carmine procedure. Observations of 477 pollen mother cells showed a stable number of 44 chromosomes in every microsporogenesis studied. In diakinesis, the chromosomes were found as univalents, bivalents, trivalents and quadrivalents. In this phase, a constant group of 6 to 8 bivalents near the nucleolus was observed. In the 133 cells in metaphase I, only 3.76% were 22II. The average chromosomal conjugations were 2.36I, 14.27II, 0.36III and 3.33IV. Irregular chromosomal distribution at the poles, in the form of 21-23 and 20-24, were found in 39.58% of the observed cells. In anaphase II, only 38.18% of the cells showed a normal distribution of 22 chromosomes for each microspore. In the remaining cells (61.82%), six different types of chromatic distribution were found. After cytokinesis, triads (2.4%), tetrads (88.4%) and polyads (9.2%) were observed. Pollen viability was 80%. Observations made on transversal slices of fruits showed 69.0% ovule fertilization. The remaining 31.0% had only perisperm (abortive). The observed fruits were 39.5% "normal berry" type and 29.5% "peaberry" type.

INTRODUÇÃO

Com relação ao número de cromossomos, o gênero *Coffea* L. compreende dois grupos, um tetraplóide com $2n = 44$ que caracteriza a espécie *C. arabica* e outro diplóide com $2n = 22$ determinado nas outras espécies (20). Pela incompatibilidade do número de cromossomos em cruzamentos dessas espécies diplóides com *C. arabica* em um programa de melhoramento, houve necessidade de se duplicar artificialmente o número de cromossomos daquelas. Com esse objetivo, A.J.T. Mendes já em 1939, conseguiu obter

RESUMO

Usando colchicina, foram obtidas plantas de *Coffea* com $2n = 44$ cromossomos de algumas espécies diplóides introduzidas. O estudo do comportamento meiótico de *C. eugenioides* + Co com $2n = 44$ cromossomos foi realizado primeiramente por tratar-se de uma espécie considerada um possível ancestral de *C. arabica*. Botões florais foram fixados em Carnoy e as lâminas preparadas segundo a técnica usual do carmin acético. Em 477 células mães de pólen analisadas foi possível constatar um número estável de 44 cromossomos, em todas as fases da microsporogênese estudadas. Em fase de diacinese os cromossomos se apresentaram na forma de mono-, bi-, tri- e tetraivalentes. Nesta fase foi observado, junto ao nucléolo, um aglomerado constante de 6 a 8 bivalentes. Nas 133 células em metáfase I apenas 3.76% das células apresentaram 22II. A fórmula média do pareamento determinado foi 2,36I; 14,27II; 0,36III e 3,33IV. As irregularidades anafásicas se resumem praticamente na distribuição irregular dos cromossomos para os polos, na forma de 21-23 e 20-24, porém 60,42% das células apresentaram uma disjunção normal de 22-22 cromossomos. Em anáfase II foram observados seis tipos diferentes de distribuição cromática; em 38,18% das células foi encontrada uma distribuição normal de 22 cromossomos para cada micrósporo. Após a citocinese foram observadas tríades (2,4%), tétrades (88,4%) e políades (9,2%). A viabilidade dos grãos de pólen foi de 80%. Observações em cortes transversais de frutos mostraram boa porcentagem de fertilização dos óvulos (69,0%), sendo 39,5% dos frutos do tipo "chato" e 29,5% do tipo "moca". Nos frutos, 31,0% formaram só perisperma, portanto, abortivos.

plantas de algumas espécies de *Coffea* com $2n = 44$ cromossomos

O estudo da microsporogênese das espécies que foram duplicadas é de grande interesse para o melhoramento, principalmente as espécies *C. liberica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* que são consideradas, por suas características morfológicas e genéticas, as espécies mais prováveis de participação na origem de *Coffea arabica*, se a origem desta última se deu realmente por alopoliploidia.

A análise do comportamento meiótico desses autotetraplóides só agora está sendo realizada e a primeira a ser concluída é (*C. eugenioides* + Co = *C. eugenioides* ($2n = 22$) com número de cromossomos duplicado pela colchicina ($2n = 44$)).

¹ Recebido para publicação em setembro 1986
O primeiro autor recebe Bolsa de Pesquisa do CNPq

* Seção de Citologia, Instituto Agrônomo, IAC, C.P. 28, Campinas, SP, Brasil

** Estagiária - estudante, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

A espécie *C. eugenoides* foi trazida para a coleção de espécies da Seção de Genética do Instituto Agrônômico em 1953. O material foi introduzido através do D.A. dos EE UU. Em 1957, ramos ponteiros e laterais de diversos exemplares foram tratados com colquicina com a finalidade de duplicação de cromossomos. O método utilizado foi aquele desenvolvido e descrito por Mendes (10) para café. Em seguida o material foi enxertado, num total de 137 enxertos, dos quais 84 se desenvolveram. Apenas um deles foi conservado por apresentar algumas características de duplicação.

MATERIAL E METODOS

A planta duplicada em estudo, bem como a espécie diplóide original encontram-se no ripado da Seção de Genética no Centro Experimental de Campinas, fazendo parte da coleção de espécies de *Coffea* do Instituto Agrônômico, as quais receberam os números 1140-16 + Co e 1140-24.

Botões florais foram coletados nos meses de junho a setembro e fixados diretamente no campo, em solução de Carnoy 3:1 (mistura de álcool etílico absoluto e ácido acético glacial). O fixador foi renovado três vezes em um período de 48 horas. O material foi resfriado e guardado em congelador à temperatura de -20° no próprio fixador.

O método da preparação das lâminas foi o usual utilizado na Seção de Citologia, isto é, lâminas semi-permanentes por esmagamento de anteras com carmim acético a 1.2% (7). Essas preparações foram guardadas em geladeira, apresentando uma duração aproximada de 15 dias.

Cinco botões coletados ao acaso foram usados na análise de tétrades de micrósporos. Todas as cinco anteras foram utilizadas para cada preparação (coloração com carmim acético) e de cada preparação foram analisadas 100 células mães de pólen, totalizando 500 contagens. As observações sobre a viabilidade do pólen, através de contagens de grãos com protoplasma, foram feitas também em cinco preparações com carmim acético, cada uma representando uma flor. Foi utilizado sempre pólen maduro, coletado no dia da antese, de flores previamente protegidas.

As células mães de pólen, nos diferentes estádios da meiose, foram observadas, interpretadas e fotografadas.

A análise das sementes formadas por fruto e os tipos de frutos formados, se "chato" ou "moca" foram feitas por meio de cortes transversais em 200

frutos coletados ao acaso e no estágio de fruto maduro, tanto na planta de *C. eugenoides* ($2n$) como em *C. eugenoides* + Co ($4n$).

RESULTADOS

As observações citológicas em células mães de pólen de *Coffea eugenoides* duplicado revelaram, em 477 células, um número estável de 44 cromossomos, em todas as fases da microsporogênese estudadas que permitiram uma contagem.

As fases iniciais do processo meiótico são normalmente difíceis de interpretar nas diferentes espécies.

Em fase de diacinese, em 60 células, os cromossomos apresentaram-se na forma de mono-, bi-, tri- e tetraivalentes. Foi observado um aglomerado constante de 6 a 8 pares de cromossomos na região do nucléolo.

Em 133 células analisadas em metáfase I, apenas 5 células (3.76%) apresentaram 22II. O modo de pareamento cromossômico nesta fase pode ser apreciado no Quadro 1 de distribuição de mono-, bi-, tri- e tetraivalentes. O número de monovalentes variou de 0 a 6 por célula; a frequência de bivalentes de 4 a 22; os trivalentes presentes só foram vistos em algumas poucas células, de 1 a 2; e os tetraivalentes apresentaram uma variação de 1 a 9. Na Fig. 1 pode ser observada a célula que apresentou 6 bivalentes e 8 tetraivalentes. A fórmula média do pareamento determinada foi 2.36I; 14.27II; 0.36III e 3.33IV.

Em anáfase I 60.42% das células analisadas apresentaram uma disjunção normal para os polos de 22-22 cromossomos. As irregularidades anafásicas se resumem praticamente na distribuição irregular dos cromossomos para os polos de 20-24 (Fig. 2) e 21-23 (Quadro 2). Cromossomos retardatários foram vistos muito raramente (Fig. 3). Pontes cromatínicas não foram notadas em AI ou AII.

No Quadro 3 estão demonstrados os seis tipos de distribuição cromatídica observados em anáfase II que variou de 20 a 24 cromossomos por polo. Apenas 38.18% das células em anáfase II analisadas apresentaram uma distribuição normal de 22 cromossomos para cada um dos quatro polos (Figura 4).

Após a ocorrência da citocinese foram observadas tríades (2.4%), tétrades (88.4%) (Fig. 5), poliades de micrósporos (9.2%) e a ocorrência de micrócitos (Quadro 4). A viabilidade dos grãos de pólen encontrada foi de 80% (Fig. 6).

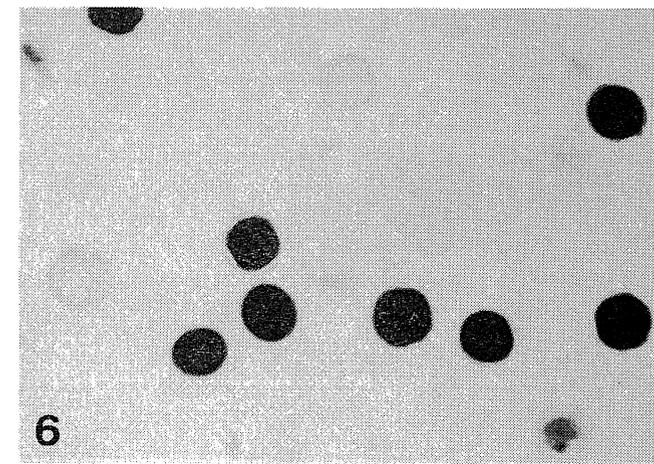
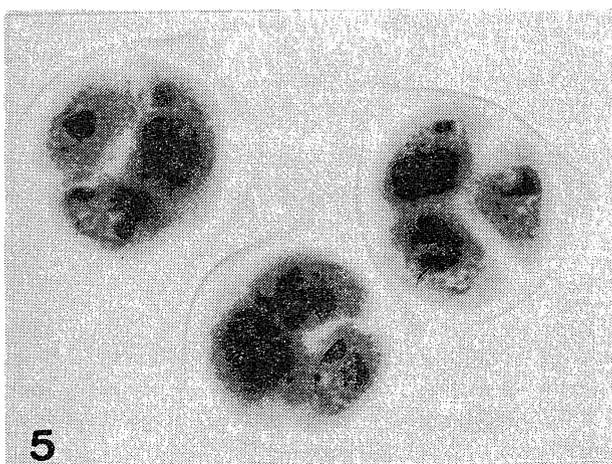
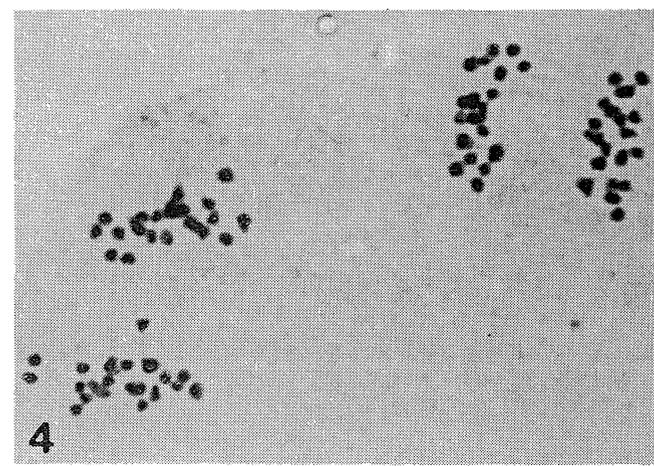
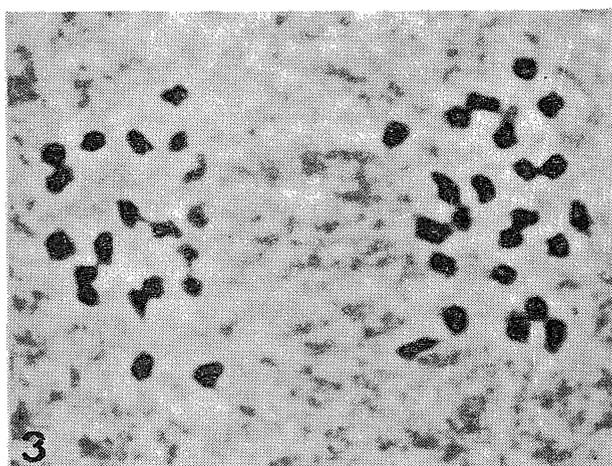
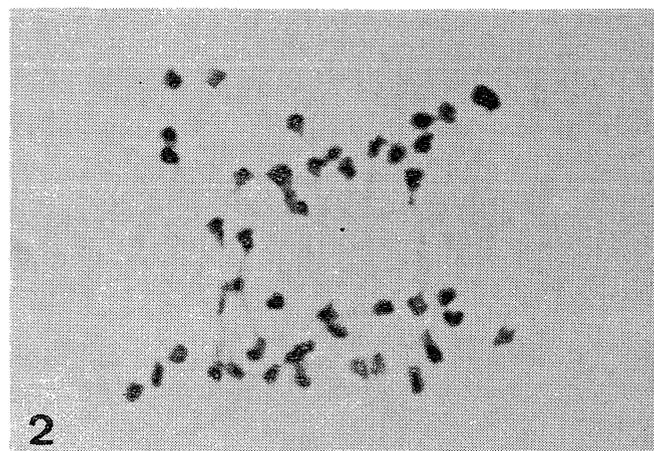
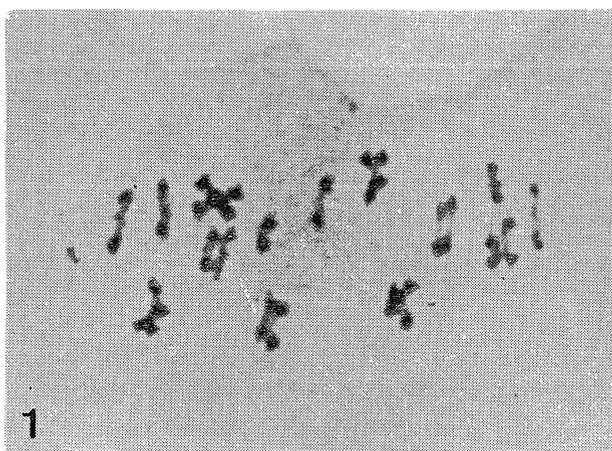


Fig. 1 a 6. Microsporogênese em *C. eugenoides* + Co. Fig. 1. Metáfase I com 6II e 8IV. X 1536. Fig. 2. Anáfase I com disjunção 20-24 cromossomos. X 1920. Fig. 3. Anáfase I, alguns bivalentes atrasados na separação. X 1536. Fig. 4. Anáfase II com distribuição normal de 22 cromossomos. X 1200. Fig. 5. Tétrades normais. X 600. Fig. 6. Grãos de pólen viáveis e inviáveis. X 480.

Observações em cortes transversais medianos de frutos em *Coffea eugenioides* + Co, mostraram uma alta porcentagem de fertilização dos óvulos (69.0%), sendo 39.5% do tipo "chato" (desenvolvimento normal de duas lojas com formação de uma semente em cada uma delas) e 29.5% do tipo "moca" (desenvolvimento de apenas uma loja com a formação de uma única semente). No frutos do tipo "chato", observou-se tanto a formação de duas sementes, como

de apenas uma, totalizando respectivamente 15.0% e 24.5%, em relação aos 200 frutos examinados. O restante dos frutos, 31.0%, formaram só perisperma, portanto abortivos. Em relação à *C. eugenioides* diplóide houve uma variação quantitativa nos frutos e no desenvolvimento de sementes por fruto. O Quadro 5 mostra os tipos de frutos encontrados e seus respectivos conteúdos por loja em *C. eugenioides* diplóide e tetraplóide.

Quadro 1. Tipos mais comuns de pareamento cromossômico em 133 microsporócitos de *C. eugenioides* + Co ($2n = 44$) em metáfase I.

Monovalentes I	Bivalentes II	Trivalentes III	Tetравалentes IV	Frequência	%
2	17	—	2	21	15.78
—	16	—	3	11	8.27
4	16	—	2	10	7.52
4	14	—	3	7	5.26
—	18	—	2	7	5.26
2	19	—	1	7	5.26
—	20	—	1	6	4.51
1	14	1	3	6	4.51
2	15	—	3	6	4.51
—	22	—	—	5	3.76
—	12	—	5	5	3.76
4	10	—	5	5	3.76
2	13	—	4	5	3.76
—	14	—	4	5	3.76
3	15	1	2	4	3.01
1	16	1	2	3	2.25
2	11	—	5	2	1.51
—	8	—	7	2	1.51
6	15	—	2	1	0.75
—	4	—	9	1	0.75
4	7	2	5	1	0.75
Outros tipos				13	9.77
Média	2.36	14.27	0.36	3.33	

Quadro 2. Disjunção cromossômica em Anáfase I em *C. eugenioides* + Co.

Distribuição dos Cromossomos	22-22	21-23	20-24	Total
No de células	87	35	22	144
%	60.42	24.31	15.28	—

Quadro 3. Distribuição cromatídica em Anáfase II em *C. eugenoides* + Co.

Distribuição dos Cromossomos	22-22	22-22	22-22	21-23	20-24	21-23	Total
	22-22	21-23	20-24	21-23	20-24	20-24	
No. de células	42	19	18	17	8	6	110
%	38.18	17.27	16.36	15.45	7.27	5.45	—

Quadro 4. Formação de micrósporos em Tétrades, Triádes, Pêntades e micrócitos em *C. eugenoides* + Co.

Tipos de formação	Tétrades	Triádes	Pêntades	Tétrades com micrócitos		Triádes com micrócitos			Total
				1	2	1	2	3	
No. de células	442	12	6	29	8	1	1	1	500
%	88.4	2.4	1.2	5.8	1.6	0.2	0.2	0.2	—

Quadro 5. Tipos de frutos e número de sementes observado em 200 frutos de *C. eugenoides* (2n) e *C. eugenoides* + Co (4n).

Tipo do fruto	Conteúdo das lojas	2n		4n	
		No.	%	No.	%
"moca"	1 endosperma	25	12.5	59	29.5
	1 perisperma	22	11.0	20	10.0
"chato"	2 endospermas	53	26.5	30	15.0
	1 endosp + 1 perisp.	49	24.5	49	24.5
	2 perispermas	50	25.0	42	21.0
	3 perispermas	1	0.5	—	—
No. total de sementes		180	—	168	—

DISCUSSÃO

A planta de *Coffea eugenoides* com número de cromossomos duplicado (n° 1140—16+Co) já havia sido utilizada por Medina (6) para a determinação do número de cromossomos em café. Em contagens realizadas nesse tecido encontrou 53, 64, 66, 67 e 69 cromossomos, concluindo que embora as células do endosperma sejam normalmente inconstantes no número cromossômico (9), o número determinado nesse tecido parecia demonstrar que este indivíduo realmente se apresentava duplicado ($2n = 44$). Concluiu ainda, pelo número de cromossomos do en-

dosperma, que a fertilização dos óvulos correspondente a cada endosperma estudado possivelmente deveria ter ocorrido por gametas com número de cromossomos diferentes de 22, resultantes, portanto, de meiose irregular.

Boaventura *et al.* (2), no trabalho em que correlacionam número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea*, verificaram um aumento substancial no número de cloroplastos, em média 65%, nas plantas tetraplóides em relação às diplóides da mesma espécie, sendo que *C. eugenoides* + Co foi a que apresentou o maior aumento, 92.7% em relação à

C. eugenoides diplóide. Com base nesse resultado concluíram, mais uma vez, que realmente a planta devia apresentar 44 cromossomos, o que foi confirmado desta vez no presente trabalho, agora em células esporóginas.

A microsporogênese de *Coffea eugenoides* Moore com 22 cromossomos foi estudada por Medina *et al* (8), na qual foi constatado um processo normal de pareamento e separação dos cromossomos, produzindo no final do processo grãos de pólen com 11 cromossomos e fertilidade alta (95%)

No trabalho desses autores (8), em 65% das células analisadas em diacinese de *C. eugenoides*, foi observado dois bivalentes relacionados ao nucléolo. Monovalentes só raramente foram observados nesta fase e em metáfase I. Em *C. eugenoides* + Co foi observado um aglomerado constante de 6 a 8 pares de cromossomos ligados a um único nucléolo, diferindo desse modo do esperado pela poliploidização, isto é, até 4 bivalentes nucleolares, de acordo com o trabalho de Medina *et al* (8). Os demais se apresentaram na forma de mono-, bi-, tri- e tetraivalentes que se mantiveram até a metáfase I. Pinto-Maglio (14), estudando a morfologia de cromossomos nucleolares em espécies de *Coffea*, em fase de paquíteno, encontrou em *C. eugenoides* diplóide um só bivalente associado ao nucléolo, embora em outras três espécies estudadas tenha encontrado dois pares. Esta variação, segundo a autora, pode ser atribuída a influências tanto do ambiente como genéticas. Nesse último caso essa inconsistência entre espécies poderia estar relacionada à perda do "locus" da principal região organizadora do nucléolo, permitindo que outros "loci" de outros cromossomos formassem nucléolos, que por fusão originariam um nucléolo maior, ficando desse modo, associado a vários cromossomos. É possível que este fenômeno tenha ocorrido em *C. eugenoides* + Co com o aumento do número de "locus" pela poliploidia.

Vishveshwara e Chinnapa (21), analisando as associações cromossômicas em diacinese e metáfase I de uma planta de *C. canephora*, que também teve seu número cromossômico duplicado pela ação da colquicina, encontrou uma média por célula de 1.18I; 7.42II; 1.5III e 5.75IV. A frequência das várias associações mostraram que os bivalentes nessa espécie são consideravelmente em maior número que os tetraivalentes e os mono- e trivalentes são em número bem menor e de médias quase iguais. No nosso caso a média de mono- e bivalentes apresentaram-se em dobro (2.36I e 14.27II) do encontrado por aqueles autores (21), sendo que trivalentes só foram verificados em 14 células das 133 analisadas em metáfase I (Quadro 1), dando uma média de 0.36III por célula e a média

de tetraivalentes por nós encontradas foi de 3.33IV, o que é quase a metade da obtida para *C. canephora* + Co.

O maior número de monovalentes em *C. eugenoides* + Co indica que houve formação de um menor número de quiasmas, o que tem sido verificado para tetraplóides de várias espécies que possuem cromossomos pequenos e com baixa frequência de quiasmas (20).

Existe na literatura uma controvérsia quanto à relação de tamanho dos cromossomos e de formação de tetraivalentes em autopoliplóides.

Riley e Chapman (15) acham que a ocorrência de uma alta frequência de bivalentes nos autopoliplóides de trigo seria mais em decorrência do tamanho dos cromossomos e que os autopoliplóides com cromossomos mais longos seriam mais aptos em formar multivalentes (19). Ao contrário, Morrinson e Rajhathy (12) observaram que o número de associações de multivalentes é mais alto em autotetraplóides de cromossomos pequenos do que naqueles com cromossomos longos. Srivata e Raina (16), estudando um autotetraplóide de *Clitoria ternatea* com $2n = 16$, espécie que é composta por 4 pares homólogos de cromossomos longos e 4 pares curtos, encontrou fundamento para explicar a frequência de multivalentes nos autopoliplóides. Estes autores concluíram que depende mais do tamanho do cromossomo, o qual tem um efeito indireto na formação dos quiasmas que são controlados pelo genótipo.

A que nível a variação do comprimento cromossômico interferiria sobre a frequência de quiasmas em espécies de *Coffea* ainda é desconhecido. Bouharmont (3) concluiu que a morfologia e em grande parte o comprimento dos cromossomos de todas as espécies desse gênero por ele estudadas é muito semelhante. É patente a diferença no pareamento cromossômico nas duas espécies *C. canephora* + Co (21) e *C. eugenoides* + Co. Nas espécies diplóides *C. canephora* e *C. eugenoides*, ambas autoincompatíveis, o número médio de quiasmas formado por célula, é 14.57 e 16.85 respectivamente (8). Essa diferença é pouco significativa, porém maior em *C. eugenoides*, onde seria esperado maior número de agrupamentos cromossômicos no tetraplóide dessa espécie do que em relação à anterior, em decorrência do maior número de quiasmas. No entanto, em *C. eugenoides* + Co foi determinado maior número de monovalentes e menor de tetraivalentes e trivalentes do que em *C. canephora* + Co (21). Portanto, em café pelo menos, parece que o pareamento está mais condicionado por fatores genéticos.

As irregularidades anafásicas em *C. eugenoides* + Co se resumem praticamente na distribuição irregular dos cromossomos para os polos, o que é esperado, pois a formação de multivalentes nas duas fases anteriores promove, durante a anáfase I, uma disjunção desigual de cromossomos para os dois polos, refletindo na distribuição das cromátides em anáfase II. Nesta espécie, 38.18% das células analisadas apresentaram a separação normal de 22 cromossomos para cada um dos polos. Resultado semelhante também foi verificado por Armstrong e Robertson (1) em autotetraplóides de *Trifolium hybridum* L.

Em *C. eugenoides* diplóide (8) foi encontrado 95% de tétrades normais e de pólen viável, baixando esta taxa para 88.4% e 80% em *C. eugenoides* duplicado respectivamente, o que não é normalmente esperado em uma planta que teve o número cromossômico duplicado. A fertilidade do pólen é muito reduzida em autotetraplóides quando comparada à espécie diplóide original (4).

Anormalidades meióticas que promovem uma separação irregular e uma distribuição desigual de cromossomos para os diferentes polos resultam normalmente na variação do tamanho e na diminuição da fertilidade do pólen, fertilidade essa que se reduz à metade nos tetraplóides induzidos se comparados aos diploides (5). Esse resultado foi verificado para *C. canephora* + Co (dados ainda não publicados), mas não se aplica à *C. eugenoides* + Co, pois, nesta espécie a fertilidade dos grãos de pólen sofreu uma redução muito pequena, e pouco variou o tamanho do pólen.

Stebbins (17, 18) defende a idéia que a esterilidade é consequência direta de fatores controlados geneticamente, mais do que aqueles de natureza desconhecida. Müntzing (13) também acredita que a fertilidade em auto, bem como em aloploiplóides, é influenciada não somente pela presença ou ausência de multivalentes, mas por tipos de controle genético. Os resultados obtidos neste trabalho parecem confirmar a idéia desses dois últimos autores.

A alta fertilidade em *C. eugenoides* + Co pode ser melhor apreciada pela comparação das análises do

número de sementes nas espécies diplóide e tetraplóide (Quadro 5).

Quando é comparada a produção de sementes nas duas plantas de ploidias diferentes (Quadro 5) pode ser observado que a planta duplicada apresenta o dobro de grãos do tipo "moca" e a metade do número de frutos do tipo "chato", tipo normal, que a planta diplóide, mas o número de sementes não difere muito.

Sybenga (20) responsabiliza as irregularidades meióticas como a causa principal de formação de frutos "moca" em café, determinando a diminuição de produção. Podem ocorrer também em café, segundo Sybenga, casos de formação de sementes vazias ou sementes mal desenvolvidas. Neste caso, o autor acredita que houve a fertilização mas o embrião atrofia e o integumento pode se desenvolver apenas o suficiente para que se forme uma película verde, mais espessa, que evita que o endosperma entre em colapso sob a pressão do grão vazio (Ferwerda, 1937a; 1948a, b, apud 20). Pela descrição, essa película parece corresponder ao chamado perisperma de Mendes (11), onde pode-se inferir uma correlação entre o número de frutos só com perisperma ou com endospermas mal formados.

CONCLUSÕES

A planta da espécie *C. eugenoides* realmente teve o número de cromossomos duplicado ($2n = 44$).

Embora no pareamento ocorra formação de polivalentes em frequência de 37.0% em relação aos bivalentes (14.30%), o comportamento meiótico é bastante regular, mais regular que outras espécies diplóides do gênero igualmente duplicadas (dados não publicados), produzindo 80% de grãos de pólen viáveis.

Em café o pareamento parece ser mais controlado geneticamente, desde que em duas espécies diferentes, *C. canephora* + Co (21) e *C. eugenoides* + Co, o comportamento no pareamento é bem distinto, sendo que as duas mesmas espécies diplóides, de acordo com Bouharmont (3), possuem cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes.

LITERATURA CITADA

1. ARMSTRONG, J.M.; ROBERTSON, R.W. 1956. Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. I. Cross and self-fertility and cytological observations. Canadian Journal of Agricultural Science 36:255-266.
2. BOAVENTURA, Y.M.S.; MEDINA, D.M.; VIEIRA, M.J.F.R.; ARRUDA, H.V. DE. 1981 Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea* L. Revista Brasileira de Botânica 4:15-21.
3. BOUHARMONI, J. 1959. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea* Bruxelles, INEAC. 94 p. (Série scientifique no. 77)
4. BURNHAN, C.R. 1962. Discussions in cytogenetics. Minnesota, Burgess.
5. DAS, B.C.; PRASAD, D.N.; SIKDAR, A.K. 1970. Colchicine-induced tetraploids of mulberry. Caryologia 23(3):283-293.
6. MEDINA, D.M. 1965. Novas observações citológicas no endosperma de café. Bragantia 24(29):269-384.
7. MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. 1964. Técnica citológica. Instituto Agronômico. 108 p. (Publicação no. 2610)
8. MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M.; CRUZ, N.D.A. 1977. Microsporogenesis in diploid species of *Coffea* L. Caryologia 30(1):13-25.
9. MEDINA, D.M.; LOPES, C.R.; CONAGIN, C.H.T.M.; RIJO, L. 1978. Cytological studies in the endosperm and embryo of *Coffea* L. Caryologia 31(4):435-448.
10. MENDES, A.J.T. 1939. Duplicação do número de cromossomos em café, algodão e fumo pela ação da colchicina. Instituto Agronômico. 21 p. (Boletim Técnico no. 57).
11. MENDES, A.J.T. 1941. Cytological observations in *Coffea*. II. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. American Journal of Botany 28(9):784-789.
12. MORRISON, J.W.; RAIHATHY, T. 1960. Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses. Chromosoma 11:297-309.
13. MUNTZING, A. 1951. Cytogenetic properties and practical values of tetraploid rye. Hereditas 37:18-84.
14. PINTO-MAGLIO, C.A.F. 1983. Morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquíteno no gênero *Coffea* L. Tese de dissertação para obtenção do título de Mestre. UNICAMP, Instituto de Biologia. 92 p.
15. RILEY, R.; CHAPMAN, V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature 182:713-715.
16. SRIVASTAV, P.K.; RAINA, S.N. 1982. Cytogenetics of *Clitoria*. I. Induced autotetraploidy in *C. ternatea*. Cytologia 47:99-107.
17. STEBBINS, JUNIOR, G.L. 1947. Types of polyploids: Their classification and significance. Advances in Genetics 1:403-430.
18. STEBBINS, JUNIOR, G.L. 1950. Variation and evolution in plants. 1 ed. New York, Columbia University Press.
19. STEBBINS, JUNIOR, G.L. 1977. Chromosomal evolution in higher plants. Tropical Forage Legumes. FAO. London. Edward Arnold.
20. SYBENGA, J. 1960. Genética y citología del café. Turrialba 10(3):83-138.
21. VISHVESHWARA, S.; CHINNAPPA, C.C. 1965. Induced auto-tetraploid in *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Current Science 34(3):90-92.