

I. BIOTECNOLOGIA, CITOLOGIA E FISILOGIA DE PLANTAS

MICROSPOROGÊNESE DE *COFFEA CANEPHORA* PIERRE EX FROEHNER COM NÚMERO DUPLICADO DE CROMOSSOMOS⁽¹⁾

YONE M. SELLITO BOAVENTURA ⁽²⁾

RESUMO

Realizou-se o estudo do comportamento meiótico de *C. canephora* tetraplóide com $2n = 44$ cromossomos por tratar-se de uma espécie considerada possível ancestral de *C. arabica* ($2n = 44$): constatou-se, em 92,0% das células-mães de pólen, em todas as fases da microsporogênese estudada, $2n = 44$ cromossomos. Em diacinese os cromossomos se apresentaram na forma de mono-, bi-, tri- e tetravalentes. Em metáfase 1, somente 13,16% das células apresentaram 22_{II} , sendo a seguinte a fórmula média do pareamento: 3,6_I; 15,2_{II}; 0,7_{III} e 1,9_{IV}. As irregularidades anafásicas resumiram-se praticamente na disjunção desigual dos cromossomos para os pólos de 21-23, 20-24 e 19-25. Somente 37,65% das células apresentaram segregação normal de 22 cromossomos para cada pólo. Em anáfase II, observaram-se sete tipos diferentes de distribuição cromatídica e, também, somente em 26,0% das células foi encontrada distribuição normal dos cromossomos. Após a citocinese, foram observadas tríades (1,6%), tétrades (77,0%) e políades (21,4%). A inviabilidade dos grãos de pólen foi alta, 79,0%. Observações em cortes transversais medianos de frutos mostraram 43,4% do tipo normal, sendo 11,0% do tipo moça e 32,4% do chato. Em 56,6% dos frutos, não houve desenvolvimento de sementes, formando-se apenas perisperma.

Termos de indexação: café, *Coffea canephora* tetraplóide, microsporogênese.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 21 de maio e aceito em 21 de agosto de 1990.

⁽²⁾ Seção de Citologia, Instituto Agronômico, Caixa Postal 28, 13001 Campinas, SP.

ABSTRACT

MICROSPOROGENESIS IN A TETRAPLOID PLANT
OF *COFFEA CANEPHORA* PIERRE EX FROEHNER

Cytological investigations in a tetraploid plant of *Coffea canephora* with $2n = 44$ chromosomes were performed. In every meiosis phase studied, 92.0% of the pollen mother cells were found as $2n = 44$ chromosomes. In diakinesis, the chromosomes were found as univalents, bivalents, trivalents and quadrivalents. At first metaphase, only 13.16% were 22_{II} . The average chromosomic associations were 3.61_I , 15.21_{II} , 0.71_{III} , and 1.93_{IV} . Irregular chromosomic distribution to the poles included 21-23, 20-24 and 19-25, while only 37.65% of the cells exhibited normal segregations of 22 chromosomes to each pole at first anaphase. At second anaphase, seven different types of chromatic distribution were found and only 26.0% of the cells showed regular segregation to the poles. After cytokinesis, triads (1.6%), tetrads (77.0%) and polyads (21.4%) were observed. Pollen viability was 21.0%. Observations made on transversal slices of the fruits showed 43.4% normal, 11.0% being of the "peaberry" type and 32.4% of the "flat" normal ones. Fruits without normal seed development, were found in a percentage of 56.6, resulting in empty fruit locus.

Index terms: *Coffea*, *Coffea canephora* tetraploid, microsporogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Das espécies descritas de café, apenas duas, *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex Froehner, têm interesse econômico. Essas espécies apresentam uma série de características distintas, sendo *C. canephora* diplóide auto-incompatível e mais adaptada a regiões de clima quente e úmido, enquanto *C. arabica* é tetraplóide, autocompatível e cultivada em clima mais ameno (COSTA, 1978).

Com relação ao número de cromossomos, o gênero *Coffea* compreende dois grupos: um tetraplóide, com $2n = 44$, que caracteriza a espécie *C. arabica*, e outro diplóide, com $2n = 22$, determinado nas outras espécies (SYBENGA, 1960).

Se bem que haja possibilidade de hibridações entre as espécies diplóides e *C. arabica*, achou-se de interesse duplicar o número de cromossomos de algumas dessas espécies para posterior cruzamento com *C. arabica*. Com esse objetivo, MENDES (1939) conseguiu obter plantas de algumas espécies diplóides de *Coffea* com $2n = 44$ cromossomos.

A duplicação do número de cromossomos de *C. canephora* foi obtida pela primeira vez por MENDES (1947) através do tratamento de sementes com soluções de colquicina nas concentrações de 0,15 a 0,60%. Essa duplicação foi posteriormente conseguida por outros investigadores: VISHVESHWARA & CHINNAPPA (1965); CAPOT et al. (1968); BERTHOU (1975); MONACO et al. (1975).

O estudo da microsporogênese das plantas tetraplóides das espécies diplóides que foram duplicadas é de interesse para investigações de natureza evolutiva e para o melhoramento do cafeeiro, principalmente das espécies *C. congensis*, *C. canephora* e *C. eugenoides*, consideradas, por suas características morfológicas e genéticas, as que provavelmente participaram da origem de *C. arabica*, se realmente essa origem se deu por aloploidia (CARVALHO & MONACO, 1967).

A análise do comportamento meiótico de uma planta tetraplóide de *C. eugenoides* já foi realizada (BOAVENTURA et al., 1988). Neste trabalho, apresenta-se o estudo de uma planta de *Coffea canephora* tetraplóide: foi escolhida por ter sido a primeira a ter o número duplicado de cromossomos e por ter sido utilizada para estudos do endosperma, de embriões e de hibridações que, posteriormente, deram origem ao café denominado Icatu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A planta duplicada de *C. canephora* em estudo, bem como o representante da espécie diplóide estudada, pertencentes à coleção de espécies de *Coffea* do Instituto Agrônomo, encontram-se no Centro Experimental de Campinas, sob os números C1330 Dp e C801.

De julho a setembro de 1981-1987, coletaram-se ramos com botões florais em fase ideal para estudos meióticos. A coleta, a fixação e a análise citológica do material, bem como a análise de frutos e sementes, foram realizadas da mesma maneira que em outros trabalhos dos mesmos autores, em plantas tetraplóides de outras espécies de *Coffea* duplicadas: BOAVENTURA & CRUZ (1987); BOAVENTURA et al. (1988).

3. RESULTADOS

As observações citológicas em células-mães de pólen de *Coffea canephora* duplicado revelaram que, em 511 células, 92,0% apresentaram $2n = 44$ cromossomos, como esperado, embora houvesse variações $2n = 42$ a 46.

O material permitiu uma análise a partir de células em diacinese. Nesta fase, observou-se a formação de mono-, bi-, tri- e tetravalentes em 84,0% das 56 células analisadas (Figura 1A). Apenas 5,0% das células mostraram 22_{II} e, 11,0% número cromossômico diferente de $2n = 44$. Observou-se, ainda um aglomerado constante de 1 a 4 cromossomos na região do nucléolo.

Em 114 células analisadas em metáfase I, só 15 (13,16%) apresentaram 22_{II} . Todos os tipos de pareamento cromossômico encontrados nessa fase estão no quadro 1, mostrando a formação de mono-, bi-, tri- e tetravalentes (Figura 1B), podendo-se ainda notar que três células apresentaram $2n = 43$ cromossomos, duas, $2n = 42$ e, duas, $2n = 45$.

QUADRO 1. Tipos mais comuns de pareamento cromossômico em 114 microsporócitos de *C. canephora* tetraplóide em metáfase I

Mono- valentes I	Bi- valentes II	Tri- valentes III	Tetra- valentes IV	2n	Frequência	
					nº	%
—	22	—	—	44	15	13,16
4	16	—	2	44	10	8,77
2	17	—	2	44	7	6,14
2	15	—	3	44	7	6,14
5	14	1	2	44	6	5,26
—	20	—	1	44	6	5,26
—	18	—	2	44	6	5,26
3	15	1	2	44	5	4,38
—	16	—	3	44	5	4,38
1	16	1	2	44	4	3,51
2	19	—	1	44	4	3,51
7	13	1	2	44	4	3,51
7	15	1	1	44	4	3,51
3	16	—	2	43	3	2,63
—	14	—	4	44	3	2,63
4	18	—	1	44	3	2,63
5	16	1	1	44	3	2,63
6	12	2	2	44	3	2,63
2	16	2	1	44	3	2,63
10	13	—	2	44	2	1,75
4	20	—	—	44	2	1,75
4	12	—	4	44	2	1,75
3	6	3	5	44	1	0,87
5	9	3	3	44	1	0,87
13	9	1	2	42	1	0,87
4	14	2	1	42	1	0,87
4	13	1	3	45	1	0,87
1	22	—	—	45	1	0,87
7	11	1	3	44	1	0,87
M 3,61	15,21	0,71	1,93	—	114	—

M = média.

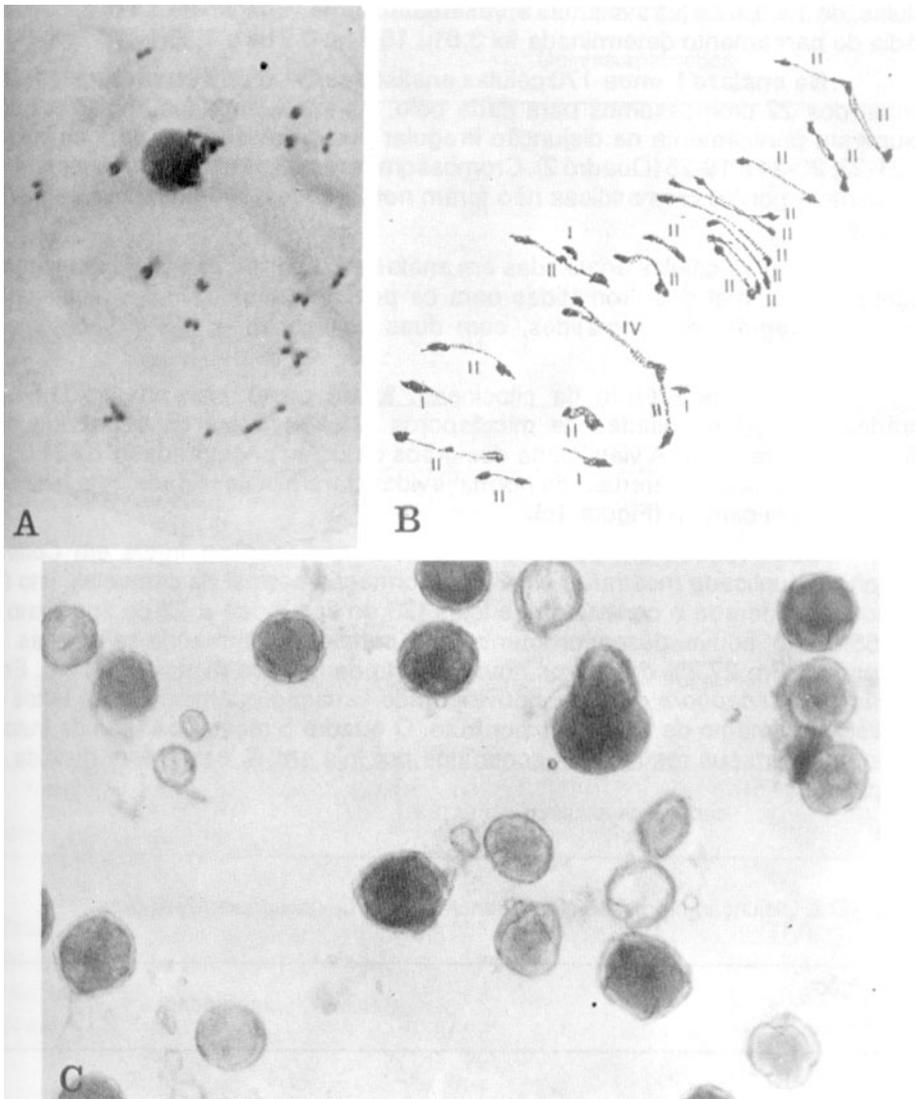


Figura 1. Microsporogênese em *C. canephora* tetraplóide — A: Diacinese com $3_{15_{II}} 1_{III} 2_{IV}$, $2n = 44$ cromossomos. X 500. B: Interpretação de uma metáfase I com $4_{18_{II}} 1_{IV}$. C: Campo com grãos de pólen viáveis e inviáveis. X 314.

O número de monovalentes, presente em quase todas as células, variou de 1 a 13 e, o de bivalentes, de 6 a 22. Os trivalentes foram vistos em poucas células, de 1 a 3, e os tetravalentes apresentaram uma variação de 1 a 5. A fórmula média do pareamento determinada foi 3,61_I; 15,21_{II}; 0,71_{III} e 1,93_{IV}.

Na anáfase I, entre 170 células analisadas, 37,65% tiveram segregação normal dos 22 cromossomos para cada pólo. As irregularidades anafásicas se resumiram praticamente na disjunção irregular dos cromossomos para os pólos de 21-23, 20-24 e 19-25 (Quadro 2). Cromossomos retardatários foram vistos muito raramente e pontes cromatídicas não foram notadas, seja em anáfase I, seja em anáfase II.

Das 171 células analisadas em anáfase II, apenas 26,0% apresentaram segregação normal das cromátides para os pólos, enquanto 74,0% mostraram disjunção irregular de cromátides, com duas células $2n = 42$ cromossomos (Quadro 3).

Após a ocorrência da citocinese, foram observadas tríades (1,6%), tétrades (77,0%) e políades de micrósporos (21,4%), além da ocorrência de micrócitos (Quadro 4). A viabilidade dos grãos de pólen encontrada foi de 21,0%. Grãos de tamanhos diferentes do normal evidenciaram inviabilidade pela falta de coloração com carmim (Figura 1c).

Observações em cortes transversais medianos de frutos em *Coffea canephora* duplicado mostraram 45,8% de formação normal de sementes, isto é, quando considerado o conteúdo das lojas (23 do tipo moca e 73 do tipo chato). Em 56,6 não houve desenvolvimento das sementes, formando-se apenas o perisperma. Em 27,2% dos frutos houve aborto de um dos óvulos (23 + 34). Em relação a *C. canephora* diplóide, houve grande 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. canephora* diplóide e tetraplóide.

QUADRO 2. Disjunção cromossômica na anáfase I em *C. canephora* tetraplóide

Distribuição dos cromossomos	Células analisadas	
	nº	%
22-22	64	37,65
21-23	55	32,35
20-24	46	27,06
19-25	5	2,94
Total	170	100,00

QUADRO 3. Distribuição cromatídica em anáfase II em *C. canephora* tetraplóide

Distribuição dos cromossomos	Células analisadas	
	nº	%
22-22 -- 22-22	44	25,75
22-22 -- 21-23	36	21,04
21-23 -- 21-23	28	16,37
22-22 -- 20-24	26	15,20
20-24 -- 20-24	18	10,53
21-23 -- 20-24	17	9,94
22-22 -- 21-19*	2	1,17
Total	171	100,00

* 2n = 42 cromossomos.

QUADRO 4. Formação de micrósporos em tétrades, tríades, pêntades e micrócitos em *C. canephora* tetraplóide

Tipos de formação	Células analisadas	
	nº	%
Tétrades	385	77,0
Tríades	8	1,6
Pêntades	13	2,6
Tétrades com micrócitos		
1	78	15,6
2	7	1,4
Tríades com micrócitos		
1	7	1,4
2	1	0,2
3	1	0,2
Total	500	100,0

QUADRO 5. Tipos de frutos e número de sementes observados em 210 frutos de *C. canephora* diploide e *C. canephora* tetraploide

Tipo de fruto	Conteúdo das lojas dos frutos	Diploide				Tetraploide			
		Fruto		Semente		Fruto		Semente	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Moca	1 endosperma	95	45,2	95	40,3	23	11,0	23	24,0
	1 perisperma	25	11,9	0	0,0	34	16,1	0	0,0
	2 endospermas	61	29,1	122	51,7	5	2,4	10	10,4
Chato	1 endosp. + 1 perisp.	19	9,1	19	8,1	63	30,0	63	65,6
	2 perispermas	10	4,7	0	0,0	85	40,5	0	0,0
Frutos		210	100,0			210	100,0		
Sementes				236	100,0			96	100,0

4. DISCUSSÃO

A planta de *Coffea canephora* com número de cromossomos duplicado (n° C1330 Dp) já havia sido utilizada por MEDINA et al. (1978) para determinação do número de cromossomos em endospermas e embriões de café. Em contagens realizadas em 504 células de endosperma, encontraram-se vários níveis cromossômicos, como 3X, 4X, 5X, 6X, 7X e 11X. Na análise de 180 células de embriões, constatou-se a presença de dois grupos, um de nível triploide onde 27 e 22% corresponderam a 32 e 33 cromossomos respectivamente e, outro, de nível tetraploide, com 10% das células com 44 cromossomos. De todas as espécies e formas de café estudadas, *C. canephora* tetraploide apresentou o mais alto grau de variação numérica e maior quantidade de endospermas malformados e não desenvolvidos, sugerindo que essa variação pudesse ser decorrente de uma meiose altamente irregular, com ocorrência de monovalentes e de diferentes constituições dos gametas envolvidos na fertilização. Apesar das variações cromossômicas detectadas, concluiu-se que esse exemplar de *C. canephora* realmente se apresentava com número duplicado de cromossomos ($2n = 44$).

BOAVENTURA et al. (1981), correlacionando o número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea*, verificaram um aumento substancial no número de cloroplastos, 58,7%, na planta *C. canephora* tetraploide, em relação à diplóide. Com base nesse resultado, concluíram que, realmente, a planta estudada, C1330 Dp, devia apresentar 44 cromossomos, o que foi confirmado no presente trabalho, agora em células esporógenas.

A microsporogênese em *C. canephora*, com 22 cromossomos, estudada por Mendes, em 1950, mostrou um processo normal de pareamento e separação dos cromossomos, produzindo grãos de pólen com 11 cromossomos. Somente em pequena porcentagem (6,32) das células-mães dos grãos de pólen em divisão meiótica foram contados 10 e 12 cromossomos em cada pólo celular, como resultado de uma separação anormal. Das células-mães de grãos de pólen estudadas, 93,68% se dividiram normalmente, de onde se concluiu que o pólen de *C. canephora* era normal. Nesse trabalho de MENDES (1950), observou-se, em paquíteno, a existência de um único cromossomo ligado pelo braço curto ao nucléolo, e em diacinese e metáfase I, somente bivalentes.

Em *C. canephora* tetraploide, foi observado, em diacinese, de 1 a 4 cromossomos ligados a um único nucléolo, o que era esperado pela poliploidização, isto é, até 2 bivalentes nucleolares. Os demais se apresentaram na forma de mono-, bi-, tri- e tetravalentes, e assim se mantiveram até a metáfase I.

A análise da microsporogênese demonstrou que a planta de *C. canephora* tetraploide C1330 Dp teve o seu número cromossômico duplicado ($2n = 44$) e maior taxa de irregularidades em todas as fases da meiose, quando comparada com as observadas em *C. eugenioides* tetraploide (BOAVENTURA et al., 1988). No entanto, parece haver também no tecido somático uma instabilidade na divisão mitótica, o que explica o aparecimento de algumas células-mães de pólen com número diferente de 44 cromossomos, variável de 42 a 46.

VISHVESHVARA & CHINNAPPA (1965), analisando as associações cromossômicas em diacinese e metáfase I de uma planta de *C. canephora* que também teve seu número de cromossomos duplicado pela ação da colquicina, encontraram por célula média de 1,18_I; 7,42_{II}; 1,5_{III} e 5,75_{IV}. A frequência das associações mostrou que os bivalentes nessa espécie são consideravelmente em maior número que os tetravalentes, e os mono- e trivalentes são em número bem menor e de médias quase iguais. OWUOR (1985), em outra planta de *C. canephora* tetraplóide, analisando 38 células em metáfase I, observou uma frequência média de associação cromossômica de 2,4 ± 1,8_I; 14,9 ± 0,9_{II}; 0,8 ± 1,7_{III} e 2,3 ± 1,0_{IV}.

No presente trabalho, na análise das associações cromossômicas em 114 células em metáfase I, notou-se que os dados eram mais semelhantes aos observados por OWUOR (1985). Obteve-se quase a mesma frequência de bi- e trivalentes (15,21_{II} e 0,71_{III}); apenas os monovalentes se apresentaram em maior número e, os tetravalentes, em menor, dando média de 3,61_I e 1,93_{IV} por célula (Quadro 1). O maior número de monovalentes observados indica que houve, provavelmente, formação de menor número de quiasmas, o que tem sido verificado para tetraplóides de várias espécies que possuem cromossomos pequenos (SYBENGA, 1960).

Esses dados parecem indicar que, em café, há maior independência de homologia cromossômica para o pareamento, atuando mais eficazmente o controle genético.

As irregularidades anafásicas em *C. canephora* tetraplóide resumem-se praticamente na distribuição irregular dos cromossomos para os pólos, 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 pólos (62,35%), refletindo na distribuição das cromátides em anáfase II (Quadro 3). Nesta espécie, 37,65% das células analisadas em anáfase I apresentaram uma segregação normal de 22 cromossomos para cada um dos pólos. Resultado semelhante foi encontrado por OWUOR (1985) em outra planta de *C. canephora* tetraplóide, constatando que 40,3 ± 3,0% das células em anáfase I se separavam normalmente.

Devido à grande regularidade na divisão meiótica das células de *C. canephora* diplóide (93,68%), MENDES (1950) concluiu que o pólen era normal. Em *C. canephora* tetraplóide, apenas 21,0% dos grãos de pólen são viáveis, o que é esperado em uma planta que teve o número de cromossomos duplicado.

A fertilidade do pólen é muito reduzida em autotetraplóides, quando comparada à espécie diplóide original (BURNHAN, 1962). Anormalidades meióticas que promovem uma separação irregular e uma distribuição desigual de cromossomos para os diferentes pólos 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 diplóides (DAS et al., 1970). Esse resultado foi verificado para a planta de *C. canephora* tetraplóide estudada, pois a fertilidade dos grãos de pólen sofreu uma redução muito grande e apresentou grãos de pólen de tamanhos diferentes (Figura 1C). Em *C. eugenoides* tetraplóide, BOAVENTURA et al. (1988) encontraram 80% de grãos de pólen

viáveis e sem diferenças de tamanho, completamente diferente do observado para *C. canephora* tetraplóide (21,0%), apesar de o número de bivalentes na meiose ser semelhante. MÜNTZING (1951) acredita que a fertilidade em auto-, bem como em aloploplóides, é influenciada não-somente pela presença ou pela ausência de multivalentes, mas por tipos de controle genético. Os resultados obtidos nas duas plantas duplicadas confirmam esse parecer.

Essas irregularidades são evidenciadas na frutificação e nas sementes de *C. canephora* tetraplóide. Em café, observa-se a formação de dois tipos principais de frutos: o chato, que é o desenvolvimento normal de uma semente em cada uma das duas lojas do ovário, e o moca, que apresenta o desenvolvimento de semente em apenas uma loja (MENDES et al., 1954).

Quando se compara a produção de sementes nas duas plantas de ploidia diferentes (Quadro 5), pode-se observar que a espécie *C. canephora* diplóide apresenta uma quantidade elevada de grãos moca, característica que se acentuou em *C. canephora* tetraplóide, pois, neste caso, somente 2,4% dos frutos analisados foram do tipo chato e apresentaram apenas 96 sementes na análise de 210 frutos, contra 236 sementes da planta diplóide.

5. CONCLUSÕES

1. A planta da espécie *C. canephora* teve o número de cromossomos duplicado ($2n = 44$), apesar de apresentar 8,0% de células com número cromossômico que variou de $2n = 42$ a $2n = 46$, em todas as fases da meiose.

2. Ocorreram irregularidades, em freqüências variáveis, em todo o processo meiótico, resultando em 21,0% de grãos de pólen viáveis.

3. O maior número de grãos moca e de lojas somente com perisperma são provavelmente decorrentes das anormalidades citológicas e genéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTHOU, F. Méthods d'obtention de polyploides dans le genre *Coffea* par traitements localisés des bourgeons à la colchicine. *Café Cacao Thé*, Paris, 19(3):197-202, 1975.

BOAVENTURA, Y.M.S. & CRUZ, N.D. da. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon X *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden) Chev.) que originou o café 'Icatu'. *Turrialba*, San José, 37(2):171-178, 1987.

—————; ————— & GOMES, C.R.B. Observações na microsporogênese de *Coffea eugenioides* Moore com número de cromossomos duplicado. *Turrialba*, San José, 38(1):31-38, 1988.

- BOAVENTURA, Y.M.S.; MEDINA, D.M.; VIEIRA, M.J.F.R. & ARRUDA, H.V. de. Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea* L. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 4(1):15-21, 1981.
- BURNHAN, C.R. *Discussions in cytogenetics*. 1.ed. Minneapolis, Burges Publishing Company, 1962. 375p.
- CAPOT, J.; DEPAUTEX, B. & DURANDEAU, A. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire: duplication chromosomique et hybridation. *Café Cacao Thé*, Paris, 12(2):114-126, 1968.
- CARVALHO, A. & MONACO, L.C. Genetic relationships of selected *Coffea* species. *Ciência e Cultura*, São Paulo 19(1):151-165, 1967.
- COSTA, W.M. Relação entre grau de resistência a *Hemileia vastatrix* e produtividade no café Icatu. *Bragantia*, Campinas 37:1-9, 1978.
- DAS, B.C.; PRASAD, D.N. & SIKDAR, A.K. Colchicine induced tetraploids of mulberry. *Caryologia*, Pisa, 23(3):283-293, 1970.
- MEDINA, D.M.; LOPES, C.R.; CONAGIN, C.H.T.M. & RIJO, L. Cytological studies in the endosperm and embryo of *Coffea* L. *Caryologia*, Pisa, 31(4):435-448, 1978.
- MENDES, A.J.T. *Duplicação do número de cromossomos em café, algodão e fumo pela ação da colchicina*. Campinas, Instituto Agrônômico, 1939. 21p. (Boletim técnico, 57)
- . Observações citológicas em *Coffea*: XI. Métodos de tratamento pela colchicina. *Bragantia*, Campinas, 7:221-230, 1947.
- ; MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café 'Mundo Novo'. *Bragantia*, Campinas, 13:257-279, 1954.
- MENDES, C.H.T. Observações citológicas em *Coffea*: XIV. Microsporogênese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, Campinas, 10:97-104, 1950.
- MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R. & CARVALHO, A. New technique for colchicine treatment of coffee seedlings. *Turrialba*, San José, 25(3):323-324, 1975.
- MÜNTZING, A. Cytogenetic properties and practical value of tetraploid rye. *Hereditas*, Lund, 37:18-84, 1951.
- OWUOR, J.B.O. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr.:II. Meiosis in F₁ hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica*, Wageningen, 34(2):355-360, 1985.
- SYBENGA, J. Genética y citología del café: una revisión de literatura. *Turrialba*, San José, 10(3):83-137, 1960.
- VISHVESHWARA, S. & CHINNAPPA, C.C. Induced auto-tetraploid in *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Current Science*, Bangalore, 34(3):90-92, 1965.