

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM COFFEA

XI — MÉTODOS DE TRATAMENTO PELA COLCHICINA

Antônio J. T. Mendes

1 — Introdução

2 — Material e métodos de tratamento

- a) Sementes
- b) Gemas foliares
- c) Enxertos

3 — Resultados obtidos

- a) *Coffea arabica*
- b) *Coffea canephora*
- c) *Coffea Dewevrei*
- d) Híbridos interespecíficos

4 — Conclusões

Sumário

Summary

Literatura citada

Explicação das figuras

1 — INTRODUÇÃO

O número básico de cromossômios no gênero *Coffea* é 11 (1, 2). Com exceção da espécie *C. arabica*, um número de espécies cultivadas e até agora estudadas citologicamente tem $2n=22$. Conquanto exista na literatura referência à espécie *C. arabica* com $2n=22$ (1), tôdas as suas variedades, extensivamente cultivadas no Brasil, têm $2n=44$, aparecendo, apenas ocasionalmente, plantas com $2n=22$, as quais são quase inteiramente estéreis e constituem a forma "monosperma" (8, 11, 12). Formas com $2n=66$ e $2n=88$ também têm sido algumas vezes encontradas nas lavouras de café formadas com variedades que normalmente têm $2n=44$ (4). Uma das espécies diplóides ($2n=22$) é *C. Dewevrei*; recentemente surgiu em São Paulo uma nova forma com $2n=44$ (7), tida a princípio como pertencente a esta última espécie, mas que, pelos estudos da Subdivisão de Genética do Instituto Agronômico, ainda não publicados, deve ser um híbrido, em cuja composição a espécie *C. Dewevrei* deve ter entrado.

Híbridos triplóides ($2n=33$), artificiais e naturais, têm sido obtidos entre as espécies diplóides ($2n=22$) e a espécie *C. arabica* ($2n=44$) (6, 7).

Baseando-nos nas recentes investigações sobre o efeito do alcalóide colchicina na duplicação do número normal dos cromossômios de diversas plantas, demos início a uma série de experiências, afim de também obter poliplóides artificiais dentro do gênero *Coffea*. O principal interesse em vista, com tal experimentação, foi: 1) a obtenção de híbridos interespecíficos férteis; 2) a obtenção de linhas puras de variedades de *C. arabica* com $2n=44$ cromossômios pela duplicação do número dos cromossômios das plantas que ocasionalmente ocorrem com $2n=22$.

Um breve comunicado sobre as primeiras experiências levadas a efeito foi publicado anteriormente (9). No presente artigo apresentaremos os métodos desenvolvidos desde então, com uma análise dos resultados a que chegamos.

2 — MATERIAL E MÉTODOS DE TRATAMENTO

Na coleção de espécies e variedades de *Coffea*, mantida no Instituto Agrônomo, a três espécies tem sido dada maior atenção nos estudos de genética e citologia: *C. arabica* ($2n=44$), *C. canephora* ($2n=22$) e *C. Dewevrei* ($2n=22$). As nossas experiências limitaram-se, a princípio, a tratamentos de sementes dessas espécies.

Devido à esterilidade das plantas "monospermas" ($2n=22$) de *C. arabica* e dos híbridos interespecíficos ($2n=33$) entre as formas com $2n=44$ desta espécie e as duas outras, com $2n=22$, os métodos usados para tratamento de sementes não podiam ser aplicados aqui. Desenvolvemos, então, com sucesso, um novo método para tratamento de ramos de café cuja apresentação constitui o principal objetivo deste artigo.

a) Tratamento de sementes

As sementes de café são constituídas por um abundante endosperma (10) de natureza córnea, que encerra o embrião, de tamanho reduzido. Quando semeadas em canteiro levam, ordinariamente, um mês para germinar; semeadas em caixas de Petri, tendo ao fundo um papel de filtro úmido, emitem uma pequena radícula dentro de 10 a 15 dias.

Sementes tratadas pelo processo ordinário de imersão, durante um certo tempo, em soluções fracas (0,075%, por exemplo) de colchicina, antes da semeadura não sofrem alteração. Mesmo após uma permanência de vários dias em soluções, cuja concentração foi até de 0,6%, as plantas obtidas não apresentavam nem sequer raízes com número dobrado de cromossômios.

Sementes de *C. arabica*, postas a germinar em caixas de Petri e aspergidas com solução de colchicina de 0,075% a 0,6%, germinaram muito mal. Iniciada a germinação, notava-se um entumescimento muito pronunciado do hipocótilo. Lavadas então as sementes e transferidas para caixas com papel de filtro apenas umedecido com água, muitas delas chegavam a emitir novas raízes. De tais tratamentos, porém, apenas um número muito reduzido de plantas foi obtido. Várias delas produziram raízes,

nas quais se constatou a duplicação do número de cromossômios de 44 para 88, a parte aérea da maioria delas, porém, permanecendo normal. Algumas plantas inteiramente octoplóides foram, entretanto, obtidas, enquanto outras revelaram ser de constituição quimérica.

Sementes de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. excelsa* foram semeadas em canteiro. Ao iniciar a germinação, isto é, 30 e 40 dias após a sementeira, as sementes foram retiradas do solo, lavadas em água corrente e tratadas durante 4, 8 e 12 dias com soluções de colchicina a 0,15%, 0,3% ou 0,6%. Após o tratamento, as sementes foram postas em caixas de Petri umedecidas somente com água; após a emissão de novas raízes, eram replantadas em canteiro. O número de plantas obtidas através destes tratamentos foi muito pequeno relativamente ao de sementes tratadas. Das três espécies, no entanto, obtivemos algumas plantas inteira ou parcialmente "duplicadas".

Além destes métodos, diversos outros foram experimentados, constando alguns da rega de caixas com terra pelas soluções de colchicina, outros do tratamento por imersão, e outros ainda por tratamento intermitente (colchicina e água) em caixas de Petri.

Não possuímos dados que permitam uma análise estatística comparativa dos métodos ensaiados. À luz dos resultados obtidos, podemos, entretanto, assegurar que a duplicação pode ser conseguida pelo tratamento de sementes, sendo, porém, muito baixa a percentagem de sucesso.

b) Tratamento de gemas foliares

Preparamos uma pasta de lanolina contendo diferentes concentrações de colchicina (desde 0,01 até 0,6% em peso), a qual foi aplicada sobre gemas vegetativas de plantas adultas. O tratamento resultou num atraso de desenvolvimento das gemas. Quando, pela ação do ambiente, a pasta desaparecia, começava a brotação; as primeiras folhas dos novos ramos apresentavam-se completamente anormais e muito enrugadas; depois, porém, de emitir assim 3 ou 4 pares de folhas anormais, os ramos se normalizavam, sendo perfeitamente normais as flores formadas nas regiões de folhas anormais.

Aplicamos também sobre as gemas foliares, diariamente, e durante um tempo que se prolongou até um mês, soluções aquosas de colchicina desde 0,15 até 0,6%. Os resultados foram, entretanto, os mesmos. Não se constataram, pois, resultados práticos nestas experiências.

c) Tratamento de garfos e subsequente enxertia

Como já dissemos, o tratamento de sementes apenas apresenta uma eficácia reduzida e é somente aplicável nos casos de plantas cujo tecido somático possui o mesmo número de cromossômios que o embrião das sementes que produzem.

Os híbridos triplóides raramente produzem sementes e os seus embriões no geral dão formação a plantas com os mais variados números de cromos-

sômios. As plantas "di-haplóides" ("monospermas") também são estéreis e as raras sementes que produzem têm embriões com número de cromossômios igual ou próximo a duas vêzes o das di-haplóides (resultado de fertilização). Logo, o método de tratamento de sementes não pode ser aplicado nestes casos, pois não é de se esperar que do tratamento de sementes de triplóides se obtenham hexaplóides, e que o tratamento de sementes de uma planta monosperma produza um tetraplóide homozigoto.

Desde que o tratamento de gemas das plantas adultas pela colchicina em pasta ou em gotas também é ineficaz, tivemos que idealizar um novo método de tratamento que produziu resultados bastante satisfatórios. Consiste êsse processo no tratamento em laboratório, de secções de ramos mais ou menos lenhosos, com soluções de colchicina, seguindo-se a enxertia dos mesmos (*).

Com mais detalhes, êsse método consiste no seguinte: Colhem-se da planta, cujo número de cromossômios se deseja duplicar, ramos contendo duas ou três gemas (ramos grandes podem ser subdivididos em várias porções menores), eliminando-se o limbo de tôdas as fôlhas. Levam-se os ramos ao laboratório, onde se procede a um novo corte, com uma lâmina afiada, na base dos ramos, colocando-se individualmente em tubo de vidro tendo por fora uma tira de papel colada no sentido longitudinal e contendo alguns centímetros cúbicos de solução de colchicina a 0,25 ou 0,5% prèviamente medidos com uma pipeta; marca-se sôbre o papel o nível atingido pela solução (F) (Est. 1, fig. 1); adiciona-se a quantidade de solução que se deseja que o ramo absorva, marcando no tubo o novo nível atingido (I). À medida que o ramo transpira, a solução vai sendo absorvida e descendo do nível inicial (I) ao final (F); quando êste último nível fôr atingido, estará terminado o tratamento. Para contrôle do tratamento, alguns ramos são postos em vidros contendo água simplesmente e para se estabelecer, com bastante aproximação, a quantidade de água ou colchicina realmente absorvida durante o tratamento, estabelecemos um novo contrôle, parafinando a superfície cortada de alguns ramos e colocando-os também dentro de tubos com uma quantidade medida de água. Findo o tratamento, mede-se a água restante nestes tubos; a diferença entre a quantidade inicial e a final indica a perda pela evaporação e pelo umedecimento do ramo, além de uma pequena quantidade que será retida pela parede interna do tubo de vidro.

Os ramos são assim tratados durante 15 a 24 horas, segundo se trate de ramos semi-lenhosos ou verdes, grossos ou finos, com internódios mais longos ou mais curtos. Nas primeiras experiências usávamos deixar intactas as fôlhas; nessas condições, a quantidade de solução absorvida era muito grande (cêrca de 5 cm³ cada ramo) e os resultados nem por isso animadores. Resultados positivos dos tratamentos foram obtidos depois, quando resolvemos eliminar quase que totalmente as fôlhas; neste caso, a solução absor-

(*) Experimentamos a princípio praticar enxertos de encostia, fazendo o garfo absorver colchicina de um tubo de vidro durante os primeiros dias após a enxertia; êste processo não deu resultado, pois que o pegamento dos enxertos é muito pequeno.

vida não se perdia nas fôlhas e o alcalóide se concentrava nos ramos, baixando para cêrca de 0,5 cm³, em cada ramo, a quantidade de líquido absorvido.

Decorrido o tempo necessário ao tratamento, os ramos eram retirados da solução, lavados em água corrente e embrulhados em um pano úmido, onde eram conservados até o momento da enxertia.

Cada ramo tratado dava, em geral, dois ou mais garfos para enxertia (Est. 1, figs. 2 e 3). A enxertia (de garfo) (13) foi sempre empregada, utilizando-se para porta enxertos plantas usualmente de um ano de idade ou pouco mais (Est. 1, figs. 4 e 5). Cada enxêrto recebia um número de identificação.

As observações sôbre o efeito do tratamento eram realizadas logo que se iniciava a brotação. A maioria das gemas reproduzia a folhagem da planta mãe; outras apresentavam-se tardias na brotação, dando afinal algumas fôlhas anormais (mais espêssas ou mais largas, bem menores ou deformadas), logo seguidas de novas fôlhas de tipo normal. Em outros casos, subseqüentemente à formação de algumas fôlhas anormais, desenvolviam-se fôlhas aparentemente provenientes de tecidos "duplicados", pois que eram mais grossas, largas e maiores que as normais, da planta tratada. Em seguida a elas surgia, porém, de novo, uma folhagem normal. Em outros casos ainda, após a formação de vários pares de fôlhas normais, apareciam algumas tipicamente quiméricas, apresentando uma metade normal a partir da nervura mediana do limbo e outra metade mais larga, mais grossa, de um verde escuro mais carregado. Apenas um único caso foi registado, no qual, após a formação de um ramo inteiramente normal na aparência, as novas fôlhas em sua extremidade passaram a acusar indícios típicos de duplicação.

Quando, após a formação de fôlhas anormais, surgia uma folhagem normal, fazíamos uma poda de modo a forçar nova brotação na região das fôlhas anormais. Após sucessivas podas, conseguimos, em vários casos, ramificação apenas provida de fôlhas tipicamente "duplicadas". Ao que se presume, pois, devido ao tratamento, ilhas de tecido "duplicado" se formam a partir de algumas células afetadas e a poda, eliminada a grande massa de tecido normal, força o desenvolvimento de outras gemas a partir do tecido de uma dessas "ilhas".

Dos tratamentos efetuados (cêrca de quinhentos enxertos), obtivemos seis ramos "duplicados".

Alguns floresceram logo a seguir e o exame das flores e do pólen confirmou o sucesso do tratamento. A subseqüente frutificação foi uma prova de que a duplicação dos cromossômios havia sido obtida.

3 — RESULTADOS OBTIDOS

Daremos, a seguir, os resultados gerais obtidos nos tratamentos aqui descritos, deixando para uma futura publicação o estudo dos poliplóides em questão.

a) *Coffea arabica*

Das numerosas variedades de *C. arabica* só não têm $2n=44$ cromossômios as variedades *monosperma* com $2n=22$ e *bullata* com formas de 66 e de 88 cromossômios.

As variedades com 44 cromossômios são autoférteis e cruzam-se com bastante facilidade ; a meiose é normal e o número somático de 44 cromossômios se perpetua na descendência. Só muito raramente é que aparecem nas sementeiras de *Coffea arabica* algumas plantas de fôlhas mais finas e estreitas e que, após florescimento normal, produzem poucos frutos de uma única semente arredondada : são estas as plantas "monosperma" e que têm apenas a metade do número normal de cromossômios : $2n=22$. Com a mesma raridade surgem nas sementeiras de *C. arabica* algumas plantas de fôlhas mais largas, mais grossas, e mais coriáceas, caracterizando a variedade *bullata* e nas quais se contam 66 e 88 cromossômios somáticos. A forma com 88 cromossômios da variedade *bullata* surge também, ocasionalmente, através de mutações somáticas em plantas normais das diversas variedades da espécie *C. arabica* (5).

Como se vê, as duas únicas variedades de *C. arabica* que não têm 44 cromossômios originam-se de anomalias citológicas que com raridade se processam nas variedades de $2n=44$. Além disso, essas variedades não se perpetuam através de sua descendência : a meiose em ambas é inteiramente anormal e só são funcionais os gâmetas que trazem $n=\pm 22$; no caso da variedade *bullata* são também funcionais os gâmetas portadores de $n=\pm 33$ e $n=\pm 44$. Como resultado, surgem na descendência das plantas *monosperma* apenas plantas tetraplóides ($2n=44$) e plantas aneuplóides ($2n=\pm 44$) ; na descendência das plantas *bullata* são em maior quantidade os indivíduos com $2n=44$ ou $2n=\pm 44$, aparecendo também outros como $2n=\pm 55$, $2n=\pm 66$ e $2n=\pm 88$.

Disto se conclui que a duplicação do número de cromossômios das variedades de *C. arabica* com 44 cromossômios não tem significação econômica. Tem importância, porém, a duplicação do número de cromossômios da variedade de 22 cromossômios (*monosperma*). Esta, sendo altamente estéril em virtude de possuir apenas um elemento de cada par de cromossômios de *C. arabica*, ou seja apenas a metade do número de cromossômios dessa espécie, tornar-se-à fértil se se conseguir duplicar êsses cromossômios.

Suponhamos que se disponha de um cafeeiro *monosperma* proveniente da variedade *bourbon* de *C. arabica*. A duplicação do número de cromossômios deverá refazer uma planta *bourbon*. O gen Na (3), que ocorre na condição homozigota nesta variedade, e em dose simples na planta *monosperma*, apresentar-se-à em dose dupla Na Na no novo indivíduo ; da mesma forma, qualquer gen recessivo ou dominante existente em dose simples na planta *monosperma* é duplicado ; o novo cafeeiro será, pois, homozigoto para todos os caracteres.

O material tratado nestas experiências pertencia a uma planta *monosperma* encontrada na progênie autofecundada de um indivíduo *bourbon*. O tratamento reproduziu o *bourbon* em tôdas as suas características : fôlhas

largas e onduladas, levemente coriáceas, grandes, frutificação abundante e frutos com duas sementes normais, em contraposição ao *monosperma* que apresenta folhas estreitas, flores pequenas, muito baixa frutificação e frutos providos de uma única semente. O *bourbon* assim sintetizado tem $2n=44$ cromossômios.

b) *Coffea canephora*

Nesta espécie só foram realizados tratamentos de sementes. Como se trata de uma espécie auto-estéril e considerando que essas sementes não provinham de frutos obtidos através de polinização controlada, era de se esperar que as plantas obtidas, com número duplo ou não de cromossômios, não constituíssem um grupo uniforme.

Tendo sido eliminadas as plantas não afetadas pelo tratamento, acham-se agora em estudo algumas plantas que apresentaram raízes com $2n=44$ cromossômios e que têm folhas muito mais espessas que as das plantas diplóides. Constituem um grupo desuniforme quanto à forma do arbusto, ramificação e côr da folhagem. As flores são menores que as das plantas com $2n=22$, porém as pétalas são mais espessas. Florescem abundantemente, mas a frutificação é pequena, talvez pela ausência de plantas de cruzamento compatível com elas; o pólen é aparentemente normal; são auto-estéreis, não tendo a duplicação modificado este característico da forma diplóide.

c) *Coffea Dewevrei*

Como na espécie *C. canephora*, só se trataram sementes desta espécie. Algumas plantas obtidas, aparentemente "duplicadas" pelas folhas grandes e coriáceas, revelaram depois serem diplóides. Uma única planta foi obtida com $2n=44$ cromossômios; apresenta folhas largas e coriáceas, e floresce muito pouco; nenhum fruto foi ainda obtido. Há em observação outra planta de folhas muito mais largas e coriáceas, de desenvolvimento ainda mais lento e que ainda não floresceu, a qual talvez seja também tetraplóide ou mesmo octoplóide.

d) Híbridos interespecíficos

De alguns híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora* tratamos ramos pelo processo aqui descrito. Esses híbridos são triplóides ($2n=33$) e através do tratamento obtivemos uma planta com $2n=66$ cromossômios, e, portanto, um aloploplóide que encerra os 22 cromossômios somáticos de *C. canephora* e os 44 cromossômios somáticos de *C. arabica*.

As folhas da planta assim obtida são de um verde muito mais intenso que as do híbrido triplóide e também mais largas e coriáceas. As flores são menores, porém as pétalas são mais espessas e largas. Floresce e frutifica abundantemente, ao passo que no híbrido triplóide, após um florescimento normal, se nota quase que completa esterilidade.

4 — CONCLUSÕES

O tratamento de sementes de café por soluções de colchicina apresenta certa dificuldade pelo fato de estar o embrião embutido em um endosperma córneo. Desde que se tratem sementes já em processo de germinação, torna-se possível fazer a solução do alcalóide atuar sobre o embrião e assim obter plantas com número duplicado de cromossômios.

Este processo, entretanto, não pode ser aplicado nos casos em que se pretende duplicar os cromossômios de plantas de natureza haplóide ou triplóide, pois que as raras sementes que se colhem de tais plantas, sendo produto da união de gâmetas com número de cromossômios variável, não têm a mesma constituição citológica dessas plantas.

O método de tratamento pela colchicina aqui descrito se aplica em tais casos com resultados positivos e se recomenda não só para cafeeiro como também para outras plantas, nas quais é possível a enxertia.

SUMÁRIO

O tratamento de sementes de *Coffea canephora* ($2n=22$), *C. Dewevrei* ($2n=22$) e *C. arabica* ($2n=44$), por soluções de colchicina de 0,15% a 0,60% produziu plantas com número duplo de cromossômios ($2n=44$ em *C. canephora* e *C. Dewevrei* e $2n=88$ em *C. arabica*).

O tratamento de gemas foliares por pasta de lanolina contendo 0,10 a 0,60% de colchicina não produziu resultado nessas mesmas 3 espécies.

Elaborou-se um novo método de tratamento de ramos que pode ser aplicado para os casos em que a planta que se deseja "duplicar" seja estéril. É o caso dos híbridos entre *C. canephora* e *C. arabica* ($2n=33$) e da forma di-haplóide (**monosperma**) de *C. arabica* ($2n=22$), os quais não produzem sementes, ou, melhor, cujas raras sementes têm em geral um embrião com número variado de cromossômios.

O método consiste em fazer com que ramos levados ao laboratório absorvam uma solução de colchicina pela sua parte cortada e em seguida sejam enxertados de forma usual. Através deste método conseguiu-se obter uma planta com $2n=66$ cromossômios a partir do **híbrido triplóide**; conseguiu-se ainda obter uma planta com $2n=44$ cromossômios a partir do **monosperma** ($2n=22$). No primeiro caso eliminou-se a esterilidade quase completamente; no segundo caso obteve-se uma transformação completa de esterilidade em fertilidade.

Este método aplica-se a outras plantas nas quais não é possível o tratamento de sementes e que facilmente se pode multiplicar pela enxertia.

SUMMARY

Colchicine treated seeds of *Coffea canephora* ($2n=22$), *C. Dewevrei* ($2n=22$) and *C. arabica* ($2n=44$) produced plants with doubled chromosome numbers ($2n=44$ in the first two and $2n=88$ in the last mentioned species). The strength of the solutions varied from 0,15 to 0,60%; the treatment was given when the seeds were already germinating. The immersion of seeds in the solution even for many days did not affect the embryo.

Colchicine in lanolin (0,10 to 0,60%) did not produce doubling of chromosomes when applied to buds of the same three species.

A new method has been devised for the treatment of sterile plants. This is the case of the triploid ($2n=33$) hybrids between *Coffea arabica* and *C. canephora* and of the di-haploid ($2n=22$) form of *Coffea arabica* known as the *monosperma* variety: both are highly sterile producing only a few round seeds whose embryos are of varied chromosome numbers. The method is the following: twigs of the plants are taken to the laboratory where they are placed in individual vials containing a solution of colchicine; after having absorbed a certain amount of the liquid, they are grafted. In the case of *Coffea* the strength of the solution was of 0,25 and 0,50%. Through this method, 66 - chromosome branches have been obtained on these grafts by treating original triploid ($2n=33$) tissue. Many 44 - chromosome branches were also obtained from a di-haploid ($2n=22$) variety. In the first case the sterility was almost entirely eliminated; in the second case a complete change from sterility to fertility has occurred.

This method is also applicable to other plants, when the treatment of seeds is not possible and grafting is an usual means of propagation.

LITERATURA CITADA

1. Homeyer, H. Zur Zytologie der Rubiaceen (Vorläufige Mitteilung). *Planta* 18: 640. 1933.
2. Krug, C. A. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. Inst. Agrônomico de Campinas. Bol. Técn. n.º 11. 8 págs. 9 figs. 1934.
3. Krug, C. A. Genética de *Coffea*. Plano de estudos em execução no Departamento de Genética do Instituto Agrônomico. Inst. Agrônomico de Campinas. Bol. Técn. n.º 26. 40 págs. 16 figs. 1936.
4. Krug, C. A. Observações citológicas em *Coffea*. III. Inst. Agrônomico de Campinas. Bol. Técn. n.º 27. 19 págs. 14 figs. 1937.
5. Krug, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica* L. Rev. de Agricultura, Piracicaba 12 (3-4): 1937.
6. Krug, C. A. e A. J. T. Mendes. Observações citológicas em *Coffea*. IV. *Bragantia* 1 (6): 467-482. 1941.
7. Krug, C. A. e A. J. T. Mendes. Conhecimentos gerais sobre a Genética e a Citologia do gênero *Coffea*. Revista de Agricultura, Piracicaba 18: 399-408. 1943.
8. Krug, C. A., J. E. T. Mendes e Alcides Carvalho. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Inst. Agrônomico do Estado em Campinas. Bol. Técn. n.º 62. 57 págs. 122 figs. 1938.
9. Mendes, A. J. T. Duplicação do número de cromossômios em Café, Algodão e Fumo, pela ação da Colchicina. Inst. Agron. do Estado em Campinas. Bol. Técn. n.º 57. 21 págs. 17 figs. 1939.
10. Mendes, A. J. T. Observações Citológicas em *Coffea*. VI — Desenvolvimento do Embrião e do Endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 2: 115-125. figs. 1-18. 1942.
11. Mendes, A. J. T. e Osvaldo Bacchi. Observações citológicas em *Coffea*. V — Uma variedade haplóide ("di-haplóide") de *C. arabica* L. *Jornal de Agronomia* 3 (3): 183-206. 1940.
12. Mendes, A. J. T. e O. Bacchi. Os grãos "moca" de café. Rev. do Inst. de Café 27 (161): 996-999. 4 figs. 1940.
13. Mendes, J. E. Teixeira. A enxertia do cafeeiro — I. Instituto Agrônomico de Campinas. Bol. Técn. n.º 39. 18 págs. 6 figs. 1938.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS DA ESTAMPA I

- Fig. 1 — Um ramo de cafeeiro, despido de suas fôlhas, absorvendo uma solução de colchicina pela parte em que foi seccionado. I — nível inicial da solução; F — nível final.
- Figs. 2 e 3 — O mesmo ramo, após o tratamento, dividido em duas partes que fornecerão dois enxertos.
- Fig. 4 — Um "cavalo" pronto para receber a enxertia.
- Fig. 5 — Um dos ramos tratados e já enxertados.

Est. 1

