

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CITOLÓGICA DE ÁRBOLES DE *Coffea arabica* L., REGENERADOS POR CULTIVO *in vitro* DE POLEN AISLADO

Juan Carlos Herrera P.*; Gloria C. Camayo V.*

RESUMEN

HERRERA P., J.C.; CAMAYO V. G.C. Caracterización morfológica y citológica de árboles de *Coffea arabica* L., regenerados por cultivo *in vitro* de polen aislado. Cenicafé 59(2):143-154.2008

Las plantas haploides son aquellas que presentan igual número de cromosomas que los gametos de su especie. Una vez duplicadas, constituyen una importante herramienta para los mejoradores, ya que facilitan la obtención de genotipos homocigotos, especialmente en especies perennes donde los ciclos vegetativos son muy largos, como es el caso del café. El objetivo del presente estudio fue caracterizar desde el punto de vista morfológico y citológico un grupo de plantas adultas de *C. arabica* provenientes del cultivo *in vitro* de polen aislado. La caracterización se realizó a partir de 20 plantas tomadas al azar de un grupo de 41, las cuales fueron evaluadas en detalle y comparadas contra un grupo testigo constituido por plantas de *C. arabica* de la misma edad, pero derivadas de semilla. De acuerdo con el análisis morfológico, las plantas provenientes del cultivo de polen presentaron una menor altura y un fenotipo más compacto, producto de un mayor número de ramas y la presencia de hojas más alargadas. El análisis citológico incluyó la evaluación del número de estomas por unidad de área, la longitud estomática y el número de cromosomas de cada árbol. Los resultados mostraron que 40 de las 41 plantas estudiadas fueron verdaderos dihaploides (DH), exhibiendo 22 cromosomas somáticos ($2n = 2x$). Solo una planta resultó tetraploide ($2n = 4x$). Todas las plantas DH estudiadas mostraron una esterilidad casi completa, una característica propia de su condición haploide. El presente estudio constituye la primera caracterización morfológica y citológica realizada sobre árboles de café regenerados por cultivo *in vitro* de polen aislado.

Palabras clave: Haploides, haplométodos, dihaploides, cultivo de polen, caracterización fenotípica.

ABSTRACT

Haploid plants are individuals that have the same number of chromosome as the gamets of their species. Once duplicated, haploids make a very important tool for plant breeders since they allow a rapid regeneration of homozygous plants, especially in perennial species like coffee in which the vegetative cycles are very long. The aim of this study was to characterize morphologically and cytologically a group of adult *C. arabica* plants previously regenerated by *in vitro* isolated pollen culture. The characterization was carried out by taking 20 randomly selected plants out of 41, which were evaluated in detail and compared with normal seed-derived *C. arabica* plants of the same age as control. According to the morphological analysis, the pollen-derived plants were shorter exhibiting a more compact phenotype due to a greater number of branches and to the presence of longer leaves. The cytological analysis included the evaluation of the number of stomatal frequency per area unit, the stomatal length and the number of chromosomes in each tree. The results showed that 40 out of the 41 adult plants were true dihaploids (DH) exhibiting 22 somatic chromosomes ($2n = 2x$). Only 1 plant showed to be tetraploid ($2n = 4x$). All of the DH plants exhibited an almost complete sterility, which is in accordance with their haploid condition. This study represents the first morphological and cytological description carried out using coffee plants derived from *in vitro* culture of isolated pollen.

Keywords: Haploids; haplometods; dihaploids; pollen culture; phenotypic characterization.

* Investigador Científico II e Investigadora Asociada. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

El cultivo de tejidos vegetales se remonta a comienzos del siglo pasado cuando los primeros investigadores empezaron a colocar en medios de cultivo, explantes vegetales de diverso origen, con el fin de observar su desarrollo y multiplicación. Sin embargo, en muchas ocasiones los resultados obtenidos no correspondían a los esperados. Este fue el caso de los experimentos realizados por Guha y Maheshwari (12) quienes buscando estudiar el desarrollo normal del polen, cultivaron anteras en medios de cultivo y, en contra de lo esperado, obtuvieron embriones en lugar de granos de polen maduros. Tales embriones resultaron ser haploides, pues presentaban la mitad del número cromosómico normal, debido a que se derivaron de los granos de polen que estaban dentro de las anteras. Estas observaciones abrieron las posibilidades de la obtención de plantas haploides por métodos *in vitro* (13).

Dentro de los múltiples cultivos de importancia para el hombre, aquellos de tipo arbustivo, generalmente perennes (o semiperennes), presentan ciclos vegetativos muy largos y barreras de incompatibilidad que limitan fuertemente las estrategias de mejoramiento. Es en este tipo de cultivos, donde el desarrollo de haplométodos toma mayor importancia en la medida que prometen acortar de manera significativa el número de ciclos de selección necesarios para la obtención de nuevas variedades, permitiendo la fijación rápida de caracteres de interés. La producción de plantas haploides y, en particular, de haploides duplicadas a partir de los llamados haplométodos, ha tenido aplicaciones importantes no sólo en el mejoramiento de cultivos, sino también en el estudio de la biología del desarrollo del grano de polen (10, 26, 28).

Los haploides pueden originarse por diferentes métodos tales como: el rescate de embriones derivados de poliembrionía, la

inducción de monoploides por eliminación de cromosomas o el cultivo *in vitro* de tejidos gaméticos (óvulos, polen). En el caso del café, se han explorado diferentes métodos para la obtención de plantas haploides tanto en las especies diploides como en *Coffea arabica*. Los primeros haploides de café fueron obtenidos en la especie diploide *C. canephora*, por la vía del rescate de embriones provenientes de poliembrionía. Con este método, Couturon (7) obtuvo un número relativamente elevado de embriones haploides, a partir de un amplio rango de genotipos. Si bien estas plantas haploides de *C. canephora* una vez duplicadas muestran un bajo vigor y una fertilidad muy reducida (18), tales plantas fueron utilizadas exitosamente para la construcción del primer mapa genético de café (19).

La obtención de haploides espontáneos en la especie *C. arabica*, por la vía de poliembrionía, fue explorada por Dublin y Parvais (9). La principal limitación de este método es, sin duda, la baja frecuencia de plantas haploides (aproximadamente 1 haploide por cada 100 plantas), lo que hace difícil una utilización práctica en estrategias de mejoramiento. Por esta razón, diferentes investigadores han explorado otros métodos para obtener haploides en café, entre los cuales están el cultivo de anteras y el cultivo de polen aislado (1, 3, 4, 5, 23, 25). Aunque se obtuvieron progresos, los resultados registrados en estas investigaciones no fueron muy alentadores, debido a problemas de reproducibilidad y falta de seguimiento de las plantas regeneradas. El principal problema del cultivo de anteras en café es que existe una competencia importante entre el tejido somático y los granos de polen presentes en los sacos de la antera, lo cual limita la posibilidad de androgénesis (14).

En el año 2002, en Cenicafé se logró por primera vez la regeneración directa de

plantas de *C. arabica* mediante el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas por inducción con colchicina (16). En ese trabajo, la inducción con colchicina hizo posible la obtención de embriones y posteriormente, plantas de café con la mitad del número de cromosomas. Si bien estas plantas, llamadas “dihaploides” por provenir de una especie tetraploide como *C. arabica*, aún se conservan en un campo experimental, hasta hoy ellas no han sido objeto de una caracterización fenotípica detallada. En consecuencia, dado su origen particular, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar tanto fenotípica como citológicamente las plantas dihaploides obtenidas por cultivo *in vitro* de microsporas aisladas, y discutir su valor potencial dentro del esquema de mejoramiento genético que sigue Cenicafé.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El material vegetal estudiado corresponde a un grupo de 41 plantas regeneradas a partir del cultivo de microsporas aisladas provenientes de dos genotipos de *C. arabica*: variedades Caturra y Colombia (16). Actualmente estas plantas se encuentran en la Estación Central Naranjal de Cenicafé, localizada a 1.400 m de altitud, con una temperatura promedio de 26,8°C, precipitación anual de 2.700 mm y brillo solar aproximado de 1.866 h.año⁻¹. Las plantas, con un promedio de 7 años, se sembraron en enero del 2000, a una distancia de 1 m entre árboles y 2 m entre surcos. Las condiciones de siembra y manejo de las plantas dihaploides, fueron las mismas ofrecidas a los materiales sembrados en los demás campos experimentales.

Evaluación fenotípica. La evaluación fenotípica de los árboles dihaploides se realizó tanto a nivel morfológico como citológico. A continuación se describen los métodos utilizados en cada caso:

Análisis morfológico: Para la evaluación morfológica se seleccionaron aleatoriamente 20 plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de polen aislado y cinco plantas testigo (Var. Colombia) de la misma edad, a las cuales se les registró: el área foliar (ARFOL), la altura (ALTUR), el número de cruces (NCRUC) y el diámetro del tallo (DTALL).

El área foliar se midió sobre diez hojas maduras por árbol, tomadas a partir del segundo nudo, en diferentes ramas del estrato medio. Las mediciones se realizaron utilizando un aparato de medición de área (Delta-T Devices®). Adicionalmente, y con el fin de cuantificar la variación al interior de cada árbol, se tomaron cuatro individuos DH y un testigo, a los cuales se les midió un total de 30 hojas maduras provenientes de cada uno de los tres estratos del árbol: alto (EA), medio (EM) y bajo (EB).

La variable altura se midió en centímetros, desde la base de la planta hasta su ápice, utilizando una regla de 3 m. El número total de cruces se contó desde la base del tronco hasta el ápice, mientras que el diámetro del tallo se midió en centímetros con la ayuda de un nonio, que fue colocado a la altura del pecho.

Adicionalmente, se midió el número de nudos por rama (NNUDO) y la longitud de las ramas (LNRAM), con el fin de precisar la arquitectura de las plantas. Estas evaluaciones se realizaron en seis plantas DH tomadas al azar, en las cuales se evaluaron seis ramas, dos por cada uno de los estratos del árbol (EA, EM, EB). La longitud de las ramas se midió en centímetros.

Como complemento a estas observaciones, en todos los árboles DH se registró el color del cogollo (verde claro, verde oscuro, bronce), la forma de la copa (plana, redondeada, cónica), y la presencia o no, de flores y/o frutos.

Análisis citológico: Comprendió el estudio de las siguientes variables: densidad de los estomas (DESTM), longitud de células guarda (LNCEL) y número de cromosomas (NCROM). La densidad estomática se midió como el número de estomas por milímetro cuadrado (mm²). La evaluación se hizo sobre tres hojas por árbol y se consideraron cinco campos por hoja. Cada campo correspondió al área cubierta por un objetivo de 10x, a través de un ocular de 10x (100 aumentos). Por su parte, la longitud de las células guardas de los estomas (expresada en micrómetros), se midió para cinco células guarda por hoja, en tres hojas diferentes, utilizando un aumento de 400x. Tanto el conteo de estomas como la medición de las células guardas, se hicieron sobre una impresión de la superficie de la hoja, obtenida al aplicar una fina capa de esmalte incoloro sobre el envés de cada hoja. Una vez seca la película de esmalte, ésta se desprendió delicadamente y se colocó sobre una lámina porta-objetos, y se analizó bajo el microscopio de luz.

Finalmente, se contó el número de cromosomas de cada planta, a partir de extendidos de cromosomas metafásicos. La preparación de los extendidos se hizo partiendo de tejidos meristemáticos de hojas muy jóvenes, de cada una de las 41 plantas DH. Los tejidos fueron inicialmente pretratados por 4 h con una solución de α -hidroxiquinolina (0,05%), para sincronizar los estados de la división celular. Posteriormente, las pequeñas hojas se lavaron y se fijaron en solución de Carnoy (mezcla 3:1 de etanol y ácido acético glacial) hasta su utilización. La preparación de extendidos cromosómicos se inició con una doble digestión (ácida y enzimática). La doble digestión incluyó un tratamiento de HCl (0,1 N) a temperatura ambiente durante 15 min., seguido de una incubación con una mezcla enzimática (celulasa SIGMA C1184, 4%; celulasa Onozuka R-10, 1%; pectoliasa SIGMA P3026, 1% y pectinasa

SIGMA P4716, 3 % en buffer citrato) a 40°C durante 45 a 60 min. El objetivo final de la doble digestión fue degradar las paredes celulares y eliminar el máximo contenido de citoplasma. El tejido digerido se lavó con agua y posteriormente se tiñó, con unas gotas de carmín acético, e inmediatamente, el tejido se fragmentó y extendió sobre una lámina porta-objetos, con ayuda de unas pinzas de punta fina. Luego de cubrir los preparados con una laminilla, éstos fueron observados mediante contraste de fases, en un microscopio Nikon 90i. Las fotos de los cromosomas fueron tomadas con una cámara monocromática digital (VDS 1300B, Vosskühler®) acoplada al microscopio. Para obtener el número cromosómico de cada individuo, se analizaron por lo menos, diez metafases por planta.

Análisis de datos. Para cada grupo (DH y testigos) se realizó el análisis de estadística descriptiva de cada variable, como: promedio, desviación estándar y límites de confianza ($p=0,05$), respectivos. Las diferencias entre los dos grupos con respecto a cada una de las variables medidas se determinaron mediante la prueba t al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas y arquitecturales de las plantas DH

El análisis de las variables morfológicas mostró importantes diferencias entre los árboles DH, derivados del cultivo de microsporas aisladas, y los árboles testigo obtenidos por semilla. En forma general, las plantas DH presentan diferencias significativas ($p<0,01$) en el área foliar, la altura y el número de cruces, respecto a las plantas testigo (Figura 1). Estas diferencias se explican en buena parte por el desequilibrio cromosómico de las plantas DH, el cual determina la presencia de

hojas más angostas y alargadas, acompañada de un crecimiento, por lo general, más lento (Figura 2). Características fenotípicas similares habían sido descritas por Carvalho (6) y Vishveshwara (29), al estudiar varios individuos haploides naturales de *C. arabica*. En un estudio posterior Berthaud (2), analizó la morfología y el comportamiento meiótico de un haploide silvestre de *C. arabica*, encontrado en la región de origen del café. Según la descripción original del autor “la planta haploide de *C. arabica* silvestre se caracterizaba por presentar ramas finas y hojas sensiblemente más estrechas que su gemelo con 44 cromosomas”. Las observaciones realizadas en otras especies muestran que los haploides comparten este tipo de características comunes. En el pepino (*Cucumber* sp.) y los cítricos (*Citrus* sp.), por ejemplo, las plantas haploides presentan igualmente diferencias marcadas con sus respectivos dihaploides en cuanto a la altura, las ramas laterales, la longitud de los entrenudos y la estructura

floral (8, 11, 30). En tabaco por su parte, se ha encontrado que la presencia de hojas estrechas y alargadas en plantas haploides derivadas de cruces interespecíficos parecen tener relación con una elevada actividad endógena de giberelinas (31).

En la Figura 2 se observan otras características particulares de los árboles DH, entre las cuales se destaca el crecimiento profuso de ramas secundarias y la presencia de nudos dispuestos de manera irregular a lo largo del tronco. El análisis de la arquitectura del árbol con base en la longitud y el número de nudos presentes en cada uno de los tres estratos de la planta, muestra que los árboles DH son en promedio más bajos y presentan un fenotipo más compacto respecto a sus pares derivados de semilla. Este fenotipo compacto es el resultado de la presencia de una mayor cantidad de ramas (en promedio más cortas en las plantas DH) y de nudos por estrato (Figura 3).

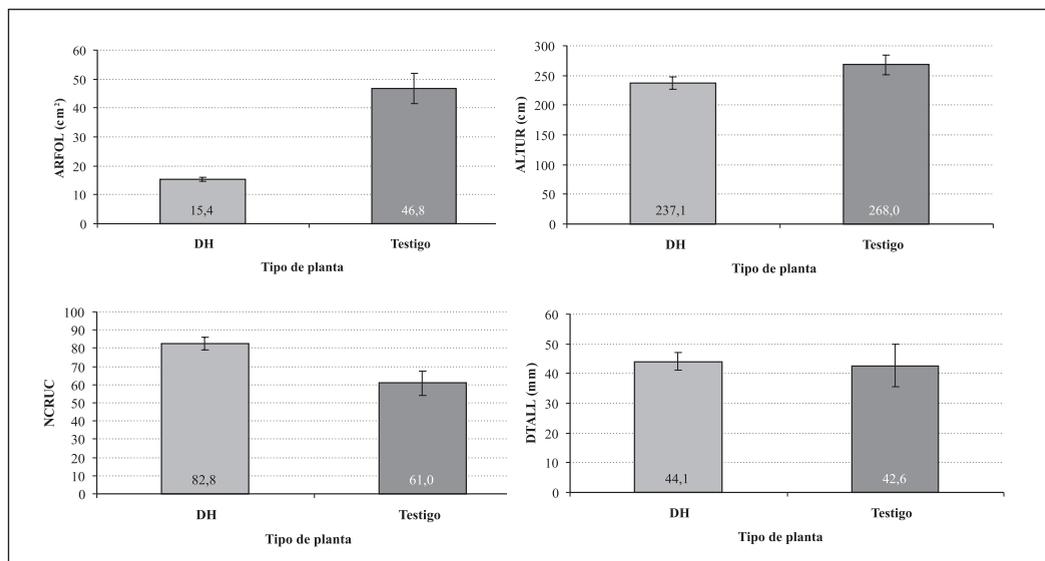


Figura 1. Comparación de diferentes variables morfológicas entre la población de individuos DH (obtenidos por cultivo *in vitro* de polen) y la población testigo (variedad Colombia, derivada de semilla). ARFOL, área foliar; ALTUR, altura; NCRUC, número de cruces; DTALL, diámetro del tallo.

Igualmente, el comportamiento reproductivo de los árboles DH fue objeto de análisis durante diferentes épocas. Como era de esperarse, las plantas DH mostraron un elevado grado de esterilidad. Si bien, se observó la formación de yemas florales y de algunos botones florales en las plantas DH, éstos raramente llegaron a término (Figura 4a). Durante una época de floración importante, sólo se lograron recolectar seis frutos de los 41 árboles estudiados. Estos frutos se

caracterizaron por tener una forma ovalada, la cual es propia de frutos con desarrollo desigual de los cotiledones (Figura 4b). Dada su condición anormal, estos frutos fueron llevados al laboratorio para tratar de regenerar plántulas mediante el rescate *in vitro* de los embriones. En su trabajo, Berthaud (2) encontró tres frutos en un árbol haploide espontáneo de *C. arabica*, los cuales se fecundaron en un ambiente donde prevaleció polen de plantas normales de *C. arabica*.

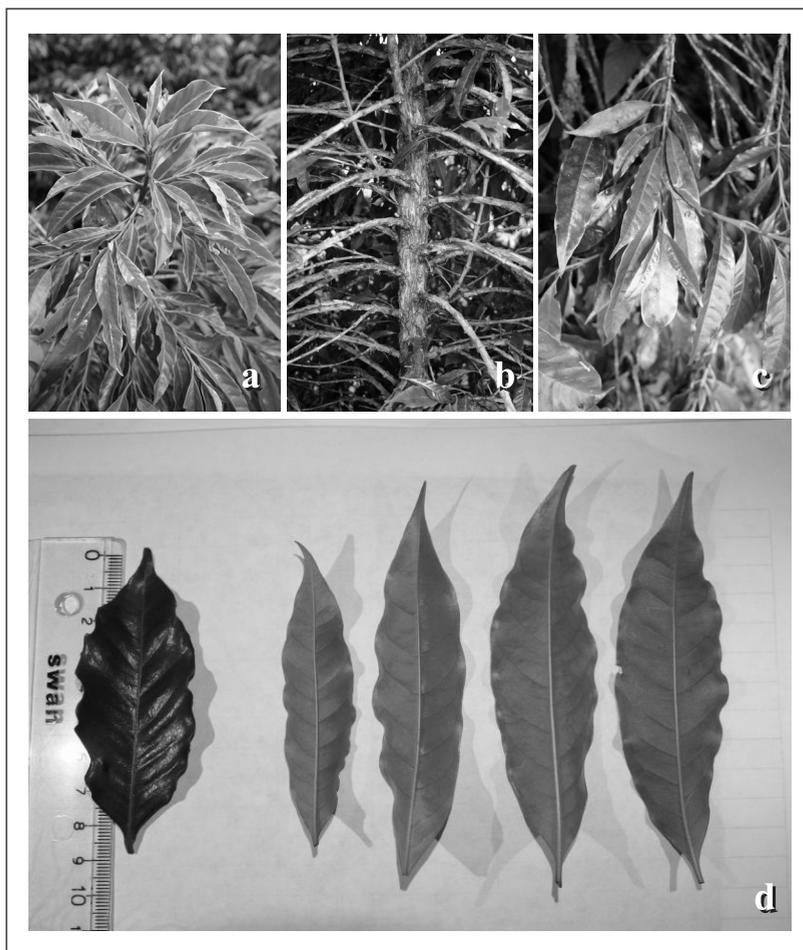


Figura 2. Algunas características fenotípicas propias de las plantas dihaploides. **a.** brotes; **b.** detalle de la disposición de las ramas en el tronco; **c.** Detalle de una rama terminal; **d.** Comparación de la forma y el tamaño de una hoja adulta de una planta normal (izquierda) respecto a las hojas de una planta DH (derecha).

Al respecto, Berthaud anota: *...las semillas encontradas eran de tipo caracol. Una de ellas no presentaba embrión; la segunda germinó muy lentamente, mientras que la tercera dio origen a una plántula cuyo número cromosómico fue de $2n = 44$* . Las semillas denominadas caracol se originan cuando uno de los óvulos aborta tempranamente, con atrofia de la cavidad locular; como consecuencia de esto, la semilla del otro lóculo se desarrolla libremente tomando la forma redondeada del fruto.

Según los estudios citológicos realizados sobre algunos haploides espontáneos de *C. arabica*, la proporción de polen viable en estas plantas generalmente no supera el 2% (2). La esterilidad de los dihaploides estudiados es un fenómeno corrientemente observado en plantas de este tipo y está directamente relacionada con su meiosis anormal. Este fenómeno es consecuencia de un desequilibrio cromosómico derivado de una repartición irregular de los cromosomas durante los estados finales de la meiosis (2, 17, 20, 29).

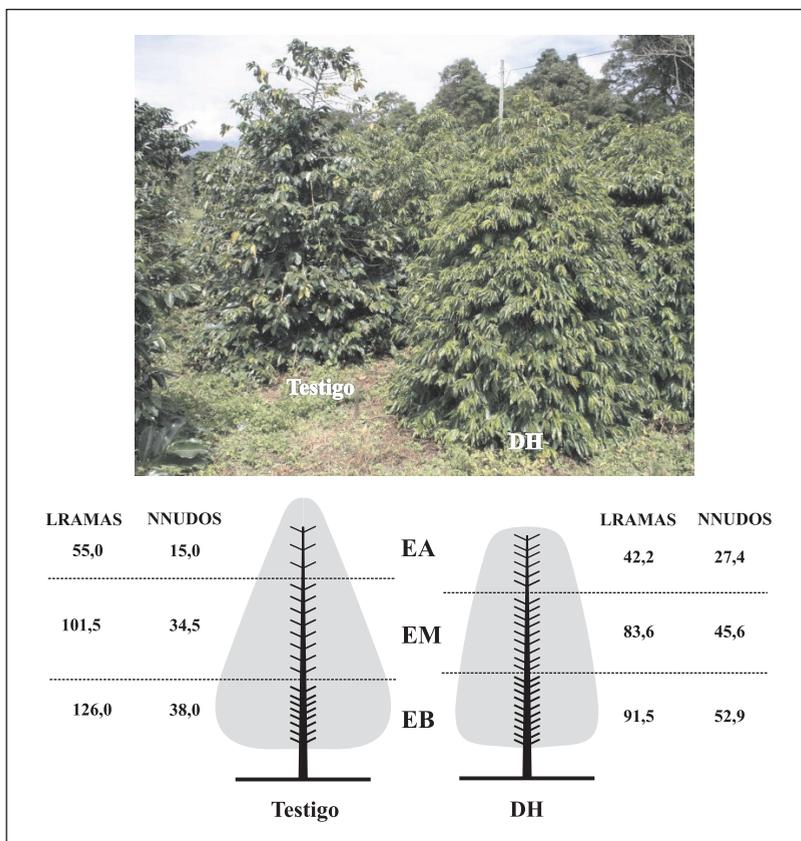


Figura 3. Comparación entre el fenotipo de las plantas dihaploides (DH) respecto a las plantas de var. Colombia (testigo). Arriba se muestra el aspecto general de los dos tipos de árboles en el campo. Abajo se presenta un esquema del fenotipo de cada tipo de árbol, basado en las mediciones de longitud de ramas (LRAMAS) y número de nudos (NNUDOS). Estas variables se midieron en cada uno de los tres estratos de la planta: alto (EA), medio (EM) y bajo (EB).



Figura 4. a. detalle del tipo de botones florales observados en la región reproductiva de ramas de árboles DH. b. aspecto de los frutos recolectados en los árboles DH.

Características citológicas asociadas al número cromosómico

La caracterización citológica de las plantas DH se inició con el conteo de cromosomas de las 41 plantas estudiadas. Como lo reportado por Herrera *et al.* (16), todas las plantas presentaron 22 cromosomas (Figura 5), con excepción de la planta DH02, la cual resultó ser tetraploide, con 44 cromosomas (Figura 5b). El carácter tetraploide de esta planta, sugiere la posibilidad de que se haya originado de una duplicación *in vitro* espontánea, durante el proceso de regeneración, en cuyo caso se trataría de una planta dihaploide duplicada. Las demás características morfológicas estudiadas para la planta DH02, muestran que ésta se comporta como las plantas testigo. Igual comportamiento se observa con respecto a su fertilidad, la cual es aparentemente normal. La utilización de marcadores moleculares tipo microsatélites podría permitir resolver el origen de esta planta.

Al examinar las características estomáticas relacionadas con el número cromosómico (Figura 6), se observó que las plantas DH

presentaban en promedio una mayor densidad estomática ($255,4$ estomas/ mm^2) y una menor longitud de sus células guardas ($17,1$ μm) con relación a las plantas testigo ($123,3$ estomas/ mm^2 y $20,2$ μm , respectivamente). Es importante notar que la planta DH02 presentó valores que fueron más próximos a los de las plantas testigo ($143,8$ estomas/ mm^2 y $23,4$ μm , respectivamente), lo que confirma su carácter tetraploide. Este tipo de variables indirectas han mostrado ser útiles para predecir el nivel de ploidía en plantas y, particularmente, en el caso del café. Si bien diferentes autores han discutido la relación de estas variables con el número cromosómico en el café, todos concuerdan en afirmar que éstas son predictores confiables que encuentran una utilidad evidente, cuando se requiere evaluar un número elevado de plantas con ploidía desconocida, lo cual ocurre en progenies derivadas de cruzamientos interespecíficos (15, 21, 24, 27).

Adicionalmente, durante la evaluación de las características relacionadas con los estomas, se pudo observar la presencia de células estomáticas fusionadas (Figura 6c).

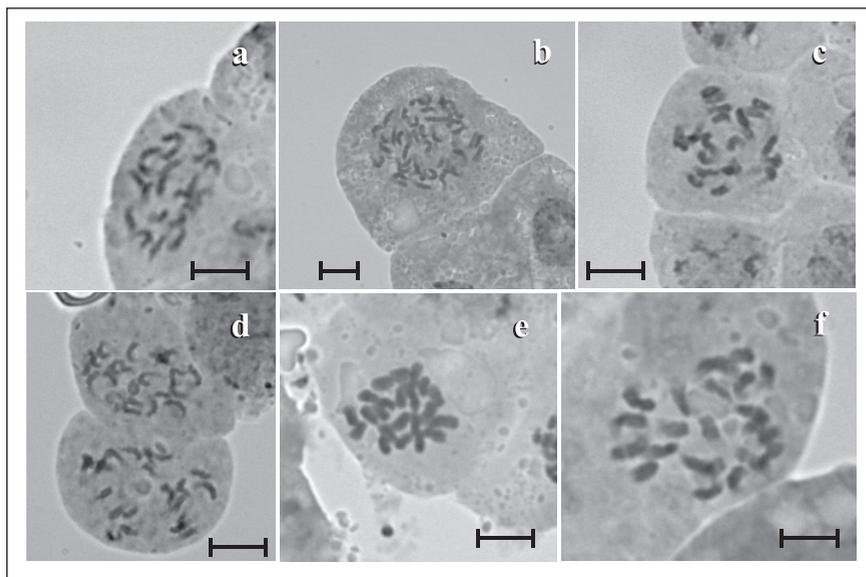


Figura 5. Microfotografías de los cromosomas somáticos de algunas de las plantas dihaploides regeneradas por cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de café. **a.** DH01; **b.** DH02; **c.** DH09; **d.** DH17; **e.** DH21; **f.** DH 27. Obsérvese que a diferencia de las demás, la planta DH02 (foto b) presenta 44 cromosomas en lugar de 22. Barra = 5 micrómetros.

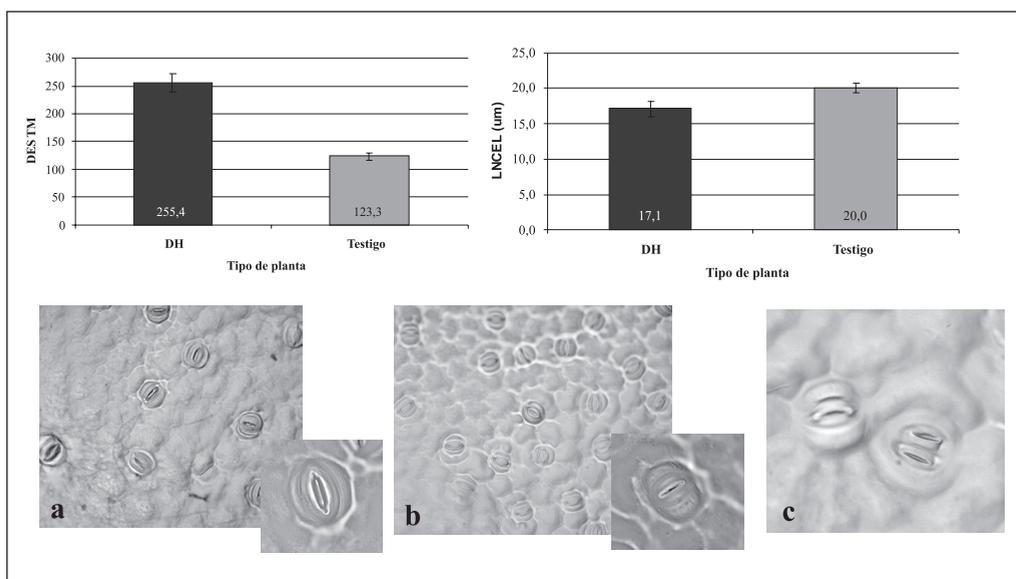


Figura 6. Resultados del análisis citológico de los árboles dihaploides (DH) y las plantas testigo derivadas de semilla. Las características medidas incluyen la densidad de estomas por mm^2 (DESTM) y la longitud de las células guardas de los estomas (LNCEL). Abajo se muestran microfotografías de los estomas de plantas testigo (**a**) y de plantas dihaploides (**b**). En **c** se presentan dos grupos de estomas fusionados, un fenómeno frecuentemente observado en la superficie abaxial de las plantas DH.

Este fenómeno, que no había sido reportado, fue bastante frecuente en el grupo de plantas DH, lo cual sugiere que podría tratarse de otra consecuencia del desequilibrio cromosómico que sufren los dihaploides de café.

Como conclusión de este trabajo se puede afirmar que las plantas dihaploides de *C. arabica* obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de microsporas aisladas, presentan una morfología muy particular, caracterizada por un fenotipo compacto, producto de la presencia de un mayor número de ramas y entrenudos en los diferentes estratos. Las hojas son angostas, alargadas y de color verde más claro, que el observado en plantas normales derivadas de semilla. Estos cambios morfológicos van acompañados de una esterilidad casi total.

Mas allá del puro interés académico, estas primeras plantas dihaploides tienen un potencial interés para el programa de Mejoramiento Genético de Cenicafé. Gracias a la presencia del cogollo bronce en algunas plantas DH, se pudo establecer que provenían de microsporas de líneas de variedad Colombia, una variedad multilínea caracterizada por su resistencia genética completa a la roya del café (22). En consecuencia, es de esperar que tales plantas posean una dosis simple de alelos de genes de resistencia a la roya (y muy posiblemente, de otros genes de resistencia). Una duplicación de tales plantas permitiría entonces obtener individuos homocigotos para este tipo de genes. Actualmente, Cenicafé trabaja en la optimización de métodos de duplicación *in vitro* de embriones somáticos derivados de tales plantas. Igualmente se trabaja en la obtención de dihaploides a partir de diferentes plantas de origen híbrido con un interés particular para el programa de Mejoramiento Genético.

Otra aplicación de la tecnología de los haploides en café, es la obtención de

plantas homocigotas a partir de las especies diploides de café, las cuales se caracterizan por la presencia de diferentes alelos de auto-incompatibilidad que dificultan los programas de hibridación intra-específica. La posibilidad de obtener plantas homocigotas para este tipo de alelos, facilitaría mucho la planeación y el éxito de cruzamientos entre individuos de interés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos al señor Enrique Chanchí por el cuidado de las plantas en el campo. Este trabajo fue realizado en parte, a través del proyecto del Genoma del Café soportado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

LITERATURA CITADA

1. ASCANIO E., C.E.; ARCIAM., A.A. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. *Café, Cacao Thé* 38 (2): 75-80. 1994.
2. BERTHAUD, J. Étude cytogénétique d'un haploïde de *Coffea arabica* L. *Café, Cacao Thé* 20 (2): 91-96. 1976.
3. CARNEIRO, M.F. In vitro induction of embryogenesis on pollen grains of *Coffea arabica* cv. Catuai. In: International Congress Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá, 1987. Proceedings. Santafé de Bogotá, Caja Agraria-FNC-Colciencias, 1987.
4. CARNEIRO, M.F. Induction of doubled haploids via anther or isolated microspore culture. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 15. Montpellier, Juin 6-11, 1993. Paris, ASIC, 1993. p. 133.
5. CARNEIRO, M.F.; ANTÃO DA SILVA, C.M. Androgenesis in different progenies of catimor. XVI Colloque ASIC. Paris, Francia. PA.741.1999.
6. CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L.: VI. Caracteres morfológicos dos haploides. *Bragantia* 12 (4-6): 201-212. 1952.

7. COUTURON, E. Obtention d'haploïdes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par utilisation du greffage d'embryons. Café, Cacao Thé 26 (3): 155-160. 1982.
8. ÇAGLAR G.; ABAK, K. *In situ* development of *in vitro* derived haploid and doubled haploid cucumber plants. International Symposium on Cucurbits. Proceedings. Işhs. Adana, Turkia. 1999. Acta Hort: 492:311-316.
9. DUBLIN, P.; PARVAIS, J.P. Sur la recherche des haploïdes issus de polyembryons chez le *C. arabica*. In: Colloque Scientifique International sur le Café. 7. Hamburgo, Juin 9-14, 1975. Paris, ASIC, 1975. p. 501-511.
10. FIEDRICH, C.; LONGIN, H.; FRIEDRICH, H.; ALBRECHT, U.T.Z.; MELCHINGER, E.; JOCHEN, C.R. Hybrid maize breeding with doubled haploids: II. Optimum type and number of testers in two-stage selection for general combining ability. Theoretical and Applied Genetics 114: 393-402. 2007.
11. GERMANÀ, M.A. Doubled haploid production in fruit crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86: 131-146. 2000.
12. GUHA, S.; MAHESHWARI S.C. *In vitro* production of embryos from anthers in *Datura*. Nature 204: 497. 1964.
13. HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. Theoretical and Applied Genetics 71: 361-374. 1985.
14. HERRERA P., J.C. El cultivo de anteras, una alternativa de propagación de café vía embriogenesis somática: ontogenesis del tejido desarrollado a partir de anteras. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos, 6. Villavicencio, Julio 14-16, 1999. Memorias. Villavicencio, Universidad de los Llanos, 1995. p. 35.
15. HERRERA P., J.C.; MORENO R., L.G.; CHAVES C., B. Discriminación de grupos de ploidía en café mediante el análisis multivariado de algunos indicadores morfológicos indirectos. Cenicafé 51 (3): 207-215. 2000.
16. HERRERA P., J.C.; MORENO R., L.G.; ACUÑA Z., J.R.; PACHECO DE P., M. ; OSORIO V., D.L. Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71 (1): 89-92. 2002.
17. KA MMACHER, P. Sur le comportement méiotique des dihaploïdes de *Coffea arabica* L. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 9. Londres , Juin 16-20, 1980. Paris, ASIC, 1980. p. 717-723.
18. LASHERMES, P.; COUTURON, E.; CHARRIER, A. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. Euphytica 74: 149-157. 1994.
19. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; PRAKASH, N.S.; TROUSLOT, P.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meiosis. Genome 44: 589-596. 2001.
20. MENDES, A.J.T.; BACCHI, O. Observações citológicas em *Coffea* V. Uma variedade haploide ("Dihaploide") de *C. arabica* L. Jornal de Agronomia 3 (3): 183-206. 1940.
21. MISHRA, M.K.; PRAKASH, N.S.; SREENIVASAN M.S. Relationship of stomatal length and frequency to ploidy level in *Coffea* L. Journal of Coffee Research 21 (1): 32-41. 1991.
22. MORENO R., L.G.; CASTILLO Z., J. La variedad Colombia. Una variedad de café con resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.). Boletín Técnico Cenicafé No. 9:1-25. 1984.
23. NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. Increased frequency of dividing microspores and improved maintenance of multicellular microspores of *Coffea arabica* in medium with coconut milk. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40: 49-54. 1995.
24. OROZCO, F.J.; CASSALETT, C. Relación entre las características estomáticas y el número cromosómico de un híbrido interespecífico en café. Cenicafé 25 (2): 33-50. 1974.
25. SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. Phyton 31: 67-74. 1973.
26. SIEBEL J.; PAULS K.P. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics 78: 473-479. 1989.
27. SREENIVASAN, M.S.; PRAKASH, N.S.; MISHRA, M.K. Evaluation of some indirect ploidy indicators in *Coffea* L. Café, Cacao Thé 36 (3): 199- 205. 1992.

28. TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* 200: 144-152. 1996.
29. VISHVESHWARA, S. Occurrence of haploid in *Coffea arabica* L. cultivar "Kents". *Indian Coffee* 24: 123-124. 1960.
30. YAHATA, M.; HARUSAKI, S.; KOMATSU, H.; TAKAMI, K.; KUNITAKE, H.; YABUYA, T.; YAMASHITA, K.; TOOLAPONG, P. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(1): 34-40. 2005.
31. ZEPPERLICK, B.; SCHÄFER, F.; PAASCH, K.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; H. NEUMANN, K. Studies on the relationship between ploidy level, morphology, the concentration of some phytohormones and the nicotine concentration of haploid and doubled haploid tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and NICA plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 38: 135-141. 1994.