

Núcleo de Produção Cafeeira

Regeneração de plantas duplo-haploides a partir de anteras de *Coffea canephora*

Nathalia Fernanda Menezes Adão¹, Maurício Reginaldo Alves dos Santos², Rodrigo Barros Rocha³, Eveline Teixeira Caixeta Moura⁴, Letícia de Faria Silva⁵

Resumo

A tecnologia de duplo-haploidização oferece a possibilidade de desenvolver genótipos completamente homocigotos a partir de genitores heterocigotos em uma única geração, proporcionando a possibilidade de desenvolver variedades híbridas F1, que poderiam combinar as vantagens de benefício total da heterose e homogeneidade, em um sistema de produção de baixo custo e relativamente rápido. Um protocolo foi desenvolvido para a regeneração de plantas duplo-haploides a partir de anteras de *C. canephora* cv. Robusta e Conilon foi desenvolvido. Para isso, foi realizado o cultivo de anteras em meio de cultura basal com sais e vitaminas de Morel e Wetmore, testando combinações fatoriais de duas auxinas, 2,4-D e ANA, com três citocininas, BAP, 2iP e Kin. A suplementação de 2,0 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D resultou na indução de calos friáveis, seguido por quatro estágios de desenvolvimento do embrião-globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar - com 16,4 e 9,6 embriões cotiledonares por antera das variedades Robusta e Conilon, respectivamente. Esses embriões criaram raízes e foram convertidos em plântulas em um meio sem reguladores de crescimento. A aclimatização dessas mudas foi realizada com 100% de sobrevivência das plantas, todas aparentemente saudáveis. O uso de marcadores microssatélites identificou homocigosidade cromossômica nas plantas, evidenciando que se tratava de plantas duplo-haploides e que houve uma duplicação espontânea do número de cromossomos ao longo de todo o processo.

Palavras-chave: embriogênese, androgênese, café, Robusta, Conilon.

Introdução

As plantas haploides são esporófitas que carregam o número cromossômico gamético (n em vez de $2n$). Podem ocorrer espontaneamente (em baixa frequência) por embriogênese gamética, ou ser induzidas por métodos *in vitro*, entre os quais a cultura de anteras ou micrósporos isolados são os mais eficazes e amplamente utilizados. Quando ocorre a duplicação cromossômica natural ou induzida de um haploide, a planta resultante é chamada de duplo-haploide (DH) (Germanà, 2011).

A tecnologia duplo-haploide é uma ferramenta valiosa nos programas de melhoramento modernos, pois permite a produção de linhagens completamente homocigotas em apenas uma geração e pode fornecer acesso a novas formas recombinantes - as anteras de café têm cerca de 2.000 a 40.000 micrósporos e cada uma delas pode fornecer uma nova combinação durante a meiose (Carneiro, 1999; Würschum et al., 2012).

Em um programa de melhoramento varietal, a cultura de anteras também pode ser usada para identificar e fixar a combinação de genes desejáveis por meio da produção de linhagens homocigóticas. Os indivíduos selecionados são então retrocruzados com variedades comerciais para introduzir plasticidade para desempenho superior (Söndahl; Loh, 1988;

¹ Graduanda em Biologia, Faculdade São Lucas; nathaliafernmenezes@gmail.com

² Biólogo, pesquisador Embrapa Rondônia

³ Biólogo, pesquisador Embrapa Rondônia

⁴ Bióloga, pesquisador Embrapa Café

⁵ Bióloga, Universidade Federal de Viçosa

Carneiro, 1999). Além disso, os DHs facilitam a criação de híbridos e, quando aplicados em estudos de marcadores, aceleram o desenvolvimento de mapeamento de populações e associações marcador/característica (Wedzony et al., 2009).

Em uma cultura diploide autoincompatível com um longo período juvenil como *C. canephora*, apenas os DH podem permitir o desenvolvimento de linhagens consanguíneas, que podem ser usadas como genitores homocigotos na produção de híbridos F1. Este novo tipo de variedade poderia combinar várias vantagens: baixo custo, benefício total da heterose e homogeneidade (Lashermes et al., 1994).

A autoincompatibilidade de *C. canephora* está ligada a um locus do gene "S" com pelo menos três alelos, S1, S2 e S3, interagindo em um sistema gametofítico monogênico (Ronchi; DaMatta, 2017). Nesse sistema reprodutivo, uma DH pode ter seu ovário fecundado com pólen de qualquer planta diploide - S1S2, S2S3 ou S1S3, já que seu genótipo só pode ser S1S1, S2S2 ou S3S3. O estabelecimento de um sistema eficiente de cultivo de anteras para a produção de plantas DH depende de diversos fatores, tais como estágio de desenvolvimento das anteras, composição do meio, tipo e concentração de reguladores de crescimento no meio, entre outros (Madan et al., 2019).

Objetivos

Considerando as potenciais aplicações de DHs em programas de melhoramento, o presente estudo foi realizado para estabelecer um protocolo eficiente para regeneração de plantas DH pelo cultivo de anteras de dois genótipos elite de *C. canephora*, pertencentes às variedades Robusta e Conilon.

Material e métodos

Plantas de *C. canephora* cv. Robusta e Conilon foram cultivadas em condições de campo no campo experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, Rondônia, Brasil. Os botões florais foram coletados um dia antes da antese e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Os botões foram esterilizados por imersão em etanol 70% por um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 1,25% (v/v) por 15 minutos, sendo posteriormente enxaguados três vezes com água esterilizada. Sob condições assépticas, as anteras foram excisadas e inoculadas individualmente em tubos de ensaio com 10,0 mL de meio de cultura basal com sais e vitaminas de Morel e Wetmore (1951), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar e combinações fatoriais de duas auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido alfa-naftalenoacético (ANA) a 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, com três citocininas: 6-Benzilaminopurina (BAP), 6-(gama, gama-Dimetilalilamino)purina (2iP) e cinetina (Kin) a 0,0, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, resultando em 90 tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Os tratamentos foram arranjados em um delineamento inteiramente casualizado e as anteras foram incubadas em uma câmara de crescimento a 26 ± 1 °C sob luz fornecida por tubos fluorescentes brancos frios (50 µmolm⁻² s⁻¹) 16 horas por dia. Nos 180 dias subsequentes, os estágios de desenvolvimento dos embriões gaméticos globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar foram registrados. Ao final desse período, foi avaliado o número médio de embriões cotiledonares por antera.

Em seguida, esses embriões foram transferidos individualmente para meio fresco sem reguladores de crescimento, onde permaneceram por 60 dias para induzir o enraizamento e posterior conversão em plântulas. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação, onde as mudas foram mantidas por 60 dias em copos plásticos de 400 mL contendo substrato Plantmax®, com sombreamento de 50% e irrigação por aspersão (meia hora, quatro vezes ao dia).

Resultados e Discussão

Nenhuma das combinações fatoriais envolvendo Kin, 2iP ou ANA resultou em embriogênese, assim como o uso de 2,4-D e BAP isoladamente. No entanto, o uso combinado de 2,4-D e BAP induziu a formação abundante de calos e, posteriormente, de embriões. A indução de calos friáveis ocorreu em todos os explantes que foram expostos às combinações de 2,0 mg L⁻¹ BAP e 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D. A indução de calos friáveis foi seguida por quatro estágios de desenvolvimento do embrião-globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 1). A embriogênese também ocorreu nessas combinações, mas foi significativamente maior no tratamento com 2,0 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D, que resultou em 16,4 e 9,6 embriões cotiledonares por anteras das variedades Robusta e Conilon, respectivamente.

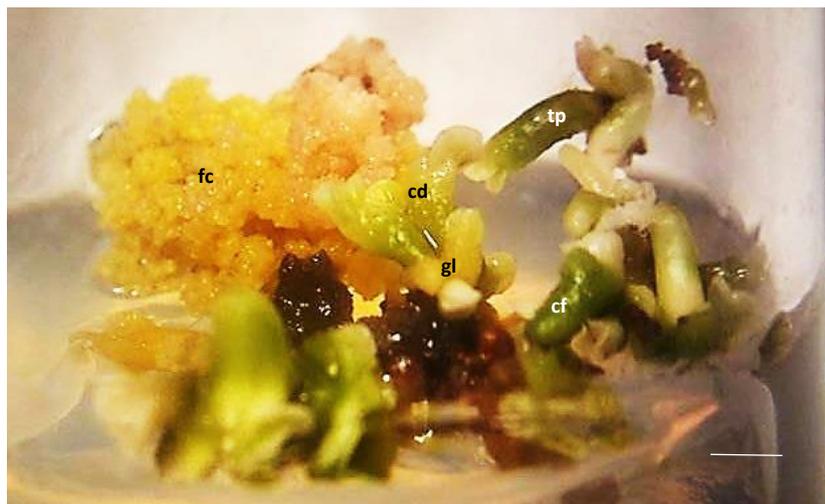


Figura 1. Calo friável (fc), embriões globulares (gl), cordiformes (cf), torpedo (tp) e cotiledonares (cd) de *C. canephora* 120 dias após a inoculação das anteras. Barra = 2 mm.

Esses estágios de desenvolvimento ocorreram dinamicamente e simultaneamente com vários deles. Aos 45 dias após a inoculação todos os explantes encontravam-se no estágio globular; aos 90 dias, a maioria deles estava nos estágios globular e cordiforme; no 135º dia, prevaleceu a fase de torpedo; e no 180º dia, quase 80% dos explantes estavam na fase cotiledonar (Figura 2).

Os embriões cotiledonares foram enraizados e convertidos em plântulas em um meio sem reguladores de crescimento. A aclimatização dessas plântulas foi realizada com 100% de sobrevivência de plantas aparentemente saudáveis (Figura 3).

O uso de marcadores microssatélites identificou homologia cromossômica nas plantas aclimatizadas, evidenciando que se tratava de plantas DH e que houve uma duplicação espontânea do número de cromossomos ao longo de todo o processo.

Até o momento, a regeneração de plantas DH de café com o uso de cultura de anteras só havia sido obtida em *C. arabica*. A primeira tentativa foi feita por Sharp et al. (1973), que usaram níveis relativamente altos de 2,4-D (4,0 e 8,0 mg L⁻¹) para induzir calos com número haploide ou duplo-haploide de cromossomos. No entanto, as tentativas de iniciar clones duplo-haploides não tiveram sucesso, pois apenas 1 em 100 culturas formou um clone de crescimento rápido.

Ascanio e Arcia (1994) utilizaram 2,0 mg L⁻¹ AIB (ácido indol-3-butírico) + 8,0 mg L⁻¹ BAP para induzir calos embriogênicos; 0,5 mg L⁻¹ AIA (ácido indol-3-acético) + 1,0 mg L⁻¹ 2iP para induzir embriões; e 3,0 mg L⁻¹ de BAP para regenerar plantas haploides, que tiveram seu número cromossômico duplicado com colchicina. A indução de DH em *C. arabica* foi posteriormente relatada por Carneiro (1999), via cultura de anteras ou micrósporos isolados em meio líquido e agarificado.

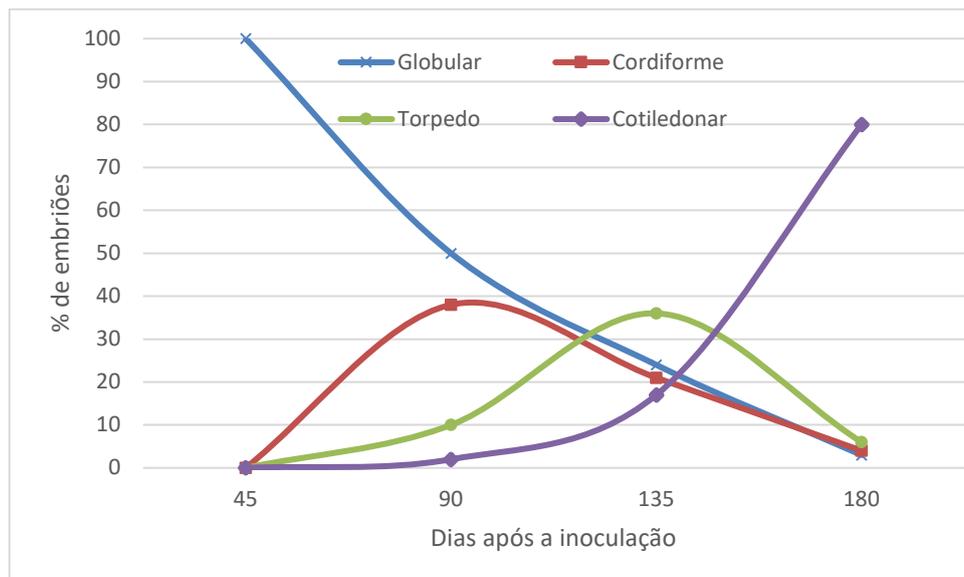


Figura 2. Percentuais médios de embriões de *C. canephora* em cada estágio de desenvolvimento, durante 180 dias de cultivo após a inoculação das anteras.



Figura 3. Aspecto geral de plantas DH aclimatizadas de *C. canephora* Robusta (à esquerda) e Conilon (à direita).

O desenvolvimento espontâneo de embriões haploides em *C. canephora* foi relatado pela primeira vez por Dublin e Parvais (1975), com remoção de embriões haploides de sementes poliembriônicas. Couturon (1982) descreveu um método de enxerto desses embriões haploides em plantas diploides jovens para regenerar plantas haploides. De acordo com Lashermes et al. (1994), o número de cromossomos dessas plantas pode ser dobrado pelo tratamento com colchicina para produzir plantas DH.

Desde então, as plantas DH de *C. canephora* foram avaliadas em relação à capacidade de combinação e conseqüentes aplicações no melhoramento de *C. canephora* (Lashermes et al., 1994), utilizadas para elucidar o controle genético da autoincompatibilidade em genótipos de alelo S (Lashermes et al., 1996), para a construção de um mapa de ligação molecular (Paillard et al., 1996), e para acessar a regulação do metabolismo da cafeína (Perrois et al., 2015). No entanto, o uso desses embriões haploides espontâneos para regenerar plantas DH é trabalhoso e demorado, pois a ocorrência de poliembrião é um evento raro e nem todas as sementes poliembriônicas originam plantas DH.

Lashermes et al. (1994) avaliaram mais de um milhão de sementes, das quais 6.555 eram poliembrionadas e deram origem a apenas 446 plantas DH. Por outro lado, no presente estudo foi evidenciado que a partir de uma única antera é possível regenerar em média 16,4 e 9,6 plantas DH das cultivares Robusta e Conilon, respectivamente.

A androgênese é uma técnica extremamente útil para a produção de haploides duplicados em lavouras cultivadas (El-Hennawy et al., 2011), principalmente devido ao enorme número de micrósporos potencialmente indutíveis nas anteras de uma única flor, o que torna a cultura de anteras uma poderosa ferramenta para acelerar o lançamento de novas variedades híbridas de forma mais barata e sustentável (Asadi et al., 2018).

No presente trabalho, os efeitos de noventa combinações de reguladores de crescimento foram testados em relação à indução de calo e posterior formação de embriões, com resposta positiva para ambos os aspectos apenas nas combinações da auxina 2,4-D e da citocinina BAP. Esses reguladores de crescimento são os mais amplamente usados na androgênese (Esteves et al., 2014).

O pré-requisito mais importante para uma androgênese eficaz é a homeostase de reguladores de crescimento específicos, com o equilíbrio entre hormônios endógenos e reguladores de crescimento sendo essencial para a indução de calos, formação de embriões, desenvolvimento e regeneração de plantas. O alto nível hormonal endógeno juntamente com reguladores exógenos suplementados ao meio de cultura suprimem a regeneração da planta, enquanto a remoção de todos os reguladores exógenos do meio de indução pode bloquear completamente a formação de embriões (Zur et al., 2015).

O uso de 2,4-D e BA, em combinação ou não, para induzir calogênese e embriogênese em anteras tem sido amplamente relatado: *Cicer arietinum* (Abdollahi; Rashidi, 2018), *Cucurbita maxima* e *C. moschata* (Kurtar et al., 2016), *Primula forbesii* (Jia et al., 2014), *Eustoma grandiflorum* (Xuhong et al., 2014), *Oryza sativa* (Rahman et al., 2021), *Manihot esculenta* (Dissanayake et al., 2020), *Vasoncella pubescens* (Chong-Pérez et al., 2018), *Curcuma attenuata* (Kou et al., 2013).

Todo o processo de obtenção das plantas DH, a partir de anteras de *C. canephora*, levou 300 dias e envolveu a indução de calos friáveis, seguidos da formação de embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares, que foram enraizados e convertidos em plântulas e, após aclimação, em plantas DH. Esses estágios são os mesmos que ocorrem naturalmente na embriogênese zigótica (Armenta-Medina et al., 2021) e também são observados na embriogênese somática (Santos; Silva, 2020).

O desenvolvimento do embrião zigótico de *C. canephora*, da antese à maturação do fruto, leva de 216 a 315 dias (Ronchi; DaMatta, 2017), em comparação ao desenvolvimento do embrião gamético avaliado na presente pesquisa, que levou 180 dias desde a inoculação de anteras até a formação de embriões cotiledonares. Teoricamente, os micrósporos contêm apenas metade do número de cromossomos dos tecidos somáticos e, portanto, as plântulas derivadas de um micrósporo são consideradas haploides.

No entanto, em alguns casos, os haploides regenerados podem dobrar espontaneamente seu número de cromossomos durante os estágios iniciais da embriogênese, o que é chamado de "duplicação espontânea do genoma haploide (SHGD)", dando origem a DHs, triploides, tetraploides ou, até mesmo, a níveis de ploidia ainda mais elevados. Este fenômeno é uma tendência inerente a muitas espécies vegetais e há muito tempo é considerado uma ferramenta importante para os melhoristas, reduzindo o tempo e o custo da produção de DH (Ahmadi; Ebrahimzadeh, 2020).

Endomitose e fusão nuclear são as principais causas da duplicação espontânea. Durante a mitose, geralmente ocorre a multiplicação dos cromossomos e a separação das células. Em vez disso, na endomitose, a multiplicação ocorre, mas a célula não consegue se dividir e um núcleo com dois conjuntos de cromossomos restaurados. Durante a fusão nuclear, dois ou mais núcleos sincronizados se dividem e desenvolvem um fuso comum (Hooghvorst; Nogués, 2021). Se a duplicação espontânea não ocorrer, o uso de agentes antimitóticos é obrigatório. Eles

interrompem o ciclo celular da planta, inibindo a metáfase, quando dímeros de tubulina estão formando o fuso, o que é essencial para a migração polar dos cromossomos.

Se separações de cromossomos são interferidas por agentes antimitóticos, a célula fica com um complemento cromossômico haploide dobrado (Hooghvorst et al., 2020). Alternativamente, alguns embriões podem vir da proliferação de tecidos da parede da antera (células somáticas), dando origem a plantas diploides (Asadi et al., 2018).

No presente trabalho, com a utilização de marcadores microssatélites, foi possível mensurar a homoziguidade de *locos* maternos heterozigotos, identificando-se homoziguidade cromossômica nas plantas, evidenciando que se tratava de plantas DH e também que houve uma duplicação espontânea do número de cromossomos ao longo do processo de propagação. Em geral, a duplicação ocorre durante as primeiras divisões do micrósporo embriogênico e por meio de um mecanismo de fusão nuclear (Germanà, 2011), tornando desnecessária a aplicação de antimitóticos.

Conclusões

A regeneração *in vitro* de plantas DH a partir de anteras de *C. canephora* cvs. Robusta e Conilon pode ser obtida utilizando uma combinação de reguladores de crescimento no meio de cultura. Durante o processo de regeneração da planta, a duplicação dos cromossomos ocorre espontaneamente, produzindo indivíduos DH. O processo envolve a indução de calos friáveis, formação de embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares, conversão em plântulas e plantas DH. O estabelecimento de um protocolo para produção de plantas DH em *C. canephora* cria novas alternativas para o melhoramento genético.

Apoio Financeiro: Os autores agradecem à FAPERO pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa PIBIC.

Referências

- ABDOLLAHI, M. R.; RASHIDI, S. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 1, p. 39-49, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1367-4>.
- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. In vitro androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 299-316, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>.
- ARMENTA-MEDINA, A.; GILLMOR, C. S.; GAO, P.; MORA-MACIAS, J.; KOCHIAN, L. V.; XIANG, D.; DATLA, R. Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. **Plant Communications**, v. 2, n. 1, 100136, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100136>.
- ASADI, A.; ZEBARJADI, A.; ABDOLLAHI, M. R.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, v. 214, article 216, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x>.
- ASCANIO, C. E.; ARCIA, M. 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**, v. 38, n. 2, p. 75-80, 1994.
- CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgBiotechNet**, v. 1, ABN 006, Jan. 1999.

CHONG-PÉREZ, B.; CARRASCO, B.; SILVA, H.; HERRERA, F.; QUIROZ, K.; GARCIA-GONZALES, R. Regeneration of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) from anther culture. **Applications in Plant Sciences**, v. 6, n. 9, e1182, Sept. 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1002%2Faps3.1182>.

COUTURON, E. Obtention d'haploïdes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. **Café Cacao Thé**, v. 26, n. 3, p. 155-160, 1982.

DISSANAYAKE, L.; PERERA, P.; ATTANAYAKA, T.; HEBERLE, E.; JAYAWARDHANA, M. Early development of direct embryos in the cultured anthers of *Manihot esculenta* Crantz. **Plants**, v. 9, n. 10, 1315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9101315>.

DUBLIN, P.; PARVAIS, J. P. Note sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. Robusta. **Café Cacao Thé**, v. 19, n. 3, p. 191-196, 1975.

EL-HENNAWY, M. A.; ABDALLA, A. F.; SHAFEY, S. A.; AL-ASHKAR, I. M. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, n. 2, p. 63-72, Dec. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2011.05.008>.

ESTEVEZ, P.; CLERMONT, I.; MARCHAND, S.; BELZILE, F. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 6, p. 871-879, June 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1563-1>.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 283-300, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>.

HOOGHVORST, I.; NOGUÉS, S. Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 2, p. 255-270, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02605-0>.

HOOGHVORST, I.; RIBAS, P.; NOGUÉS, S. Chromosome doubling of androgenic haploid plantlets of rice (*Oryza sativa*) using antimetabolic compounds. **Plant Breeding**, v. 139, n. 4, p. 754-761, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbr.12824>.

JIA, Y.; QI-XIANG, Z.; HUI-TANG, P.; SHI-QIN, W.; QING-LIN, L.; LING-XIA, S. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 273-281, Sept. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.018>.

KOU, Y.; MA, G.; SILVA, J. A. T. da; LIU, N. Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, p. 1-7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0205-y>.

KURTAR, E. S.; BALKAYA, A.; KANDEMIR, D. Evaluation of haploidization efficiency in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) through anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 2, p. 497-511, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1074-6>.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; CHARRIER, A. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. **Euphytica**, v. 74, p. 149-157, 1994.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAUS, N.; PAILLARD, M.; LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 3, p. 458-462, Aug. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00223190>.

MADAN, N. S.; SAVARIMUTHU AROCKIASAMY, S.; NARASIMHAM, J. V.; PATIL, M.; YEPURI, V.; SARKAR, P. Anther culture for the production of haploid and doubled haploids in *Jatropha curcas* L. and its hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, p. 181-192, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01616-4>.

MOREL, G.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 141-143, Feb. 1951. DOI: <https://doi.org/10.2307/2437837>.

PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1-2, p. 41-47, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00225725>.

PERROIS, C.; STRICKLER, S. R.; MATHIEU, G.; LEPELLEY, M.; BEDON, L.; MICHAUX, S.; HUSSON, J.; MUELLER, L.; PRIVAT, I. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, v. 241, n. 1, p. 179-191, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2170-7>.

RAHMAN, Z. A.; SEMAN, Z. A.; OTHMAN, A. N.; AB GHAFAR, M. B.; AB ZARAK, S.; YUSOF, M. F. M.; NASIR, K. H.; AHMAD, K.; LITCHOW, Y.; SUBRAMANIAM, S. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, 101865, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101865>.

RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. Aspectos fisiológicos do café Conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. de (ed.). **Café Conilon**. 2. ed. atual. e ampl. Vitória, ES: Incaper, 2017. p. 103-130.

SANTOS, M. R. A.; SILVA, A. C. S. In vitro vegetative propagation of *Coffea canephora* hybrids by somatic embryogenesis. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 7, n. 1, p. 155-162, 2020.

SHARP, W. R.; CALDAS, L.; CROCOMO, O. J.; MÔNACO, L. C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, v. 31, p. 67-74, 1973.

SÖNDAHL, M. R.; LOH, W. H. T. Coffee Biotechnology. In: CLARKE, R. J. **Coffee**. London, UK: Elsevier Applied Science, 1988. V. 4: Agronomy, p. 235-262.

WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E.; GOTĘBIEWSKA, G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. **Advances in haploid production in higher plants**. Viena: Springer, 2009. p. 1-33.

WÜRSCHUM, T.; TUCKER, M. R.; REIF, J. C.; MAURER, H. P. Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by in vitro chromosome doubling. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 109, p. 1-7, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-109>.

XUHONG, Z.; XIJUN, M.; SUPING, Q.; MIN, T.; XUEWEI, W.; MIN, W.; JINZE, L.; YING, L.; JIHUA, W.; MIN, G. Comparison of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivars based on the selected regeneration media using anther culture. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, 55:125-128, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0013-x>.

ZUR, I.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; WALIGÓRSKI, P.; DZIURKA, M.; JANOWIAK, F. Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticale (\times *Triticosecale* Wittm.) anther cultures. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 1, p. 47-62, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1686-4>.