

## Interação entre meios de cultura e tamanhos de botões florais na indução à calogênese em anteras de *Citrus medica* L. cultivadas in vitro

Marcus Dhilermando Hora de Souza<sup>1</sup>, Leila Vasconcelos Costa Nobre<sup>2</sup>, Karen Cristina Fialho dos Santos<sup>3</sup>, Walter dos Santos Soares Filho<sup>4</sup>, Antônio da Silva Souza<sup>4</sup> e Carlos Alberto da Silva Ledo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, Bolsista FAPESB; <sup>2</sup>Estudante de Licenciatura em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA; <sup>3</sup>Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; <sup>4</sup>Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

O melhoramento genético convencional para espécies cítricas apresenta limitações, tais como elevada heterozigose, dificultando a obtenção e identificação de plantas híbridas de interesse que elevem a qualidade dos pomares. Neste contexto, em associação com os procedimentos clássicos de melhoramento, pode-se utilizar técnicas de cultura de tecidos, como o cultivo in vitro de anteras, para a geração de plantas haploides que, utilizadas como linhagens homocigotas, reduzem a imprevisibilidade em cruzamentos envolvendo plantas em estado heterocigoto. No entanto, um dos problemas da cultura de anteras é a dificuldade em regenerar plantas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes composições de meios nutritivos na indução de calos embriogênicos a partir de anteras de cidreira, coletadas de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. Foram utilizadas anteras do genótipo *Citrus medica* L., coletadas em botões florais fechados de diversos tamanhos e classificadas, por semelhança visual entre si, em oito grupos que abrangiam desde o estágio inicial de desenvolvimento até a pré-antese. Os botões foram imersos em álcool 70% por cinco minutos, em hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos e lavados por três vezes em água de osmose reversa autoclavada. Foram utilizados três meios na indução à calogênese: o meio N6, suplementado com caseína hidrolisada (20 mg L<sup>-1</sup>), prolina (1.381,5 mg L<sup>-1</sup>), cisteína (78,8 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (1,5 mg L<sup>-1</sup>); o meio MS1, modificado com glutamina (500 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (500 mg L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (500 mg L<sup>-1</sup>), lactose (36 g L<sup>-1</sup>), galactose (18 g L<sup>-1</sup>), água de coco (100 mL L<sup>-1</sup>), L-serina (0,1 g L<sup>-1</sup>), 2,4-D (0,5 mg L<sup>-1</sup>), CIN (0,5 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), ZEA (0,5 mg L<sup>-1</sup>), TDZ (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e AG<sub>3</sub> (0,5 mg L<sup>-1</sup>); e o meio MS2, modificado com 2,4-D (2 mg L<sup>-1</sup>) e CIN (0,5 mg L<sup>-1</sup>). As placas de Petri, cada uma com 13 anteras, foram mantidas no escuro por 15 dias, em sala de crescimento sob condições controladas de cultivo, e após esse período, sob iluminação, em fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Aos 30 dias de cultivo, os calos que se desenvolveram foram transferidos para o meio de cultivo MS modificado, contendo 2,4-D (2 mg L<sup>-1</sup>), CIN (0,5 mg L<sup>-1</sup>), BAP (1 mg L<sup>-1</sup>), ZEA (0,5 mg L<sup>-1</sup>), AG<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) e sacarose (30 g L<sup>-1</sup>). Todos os meios de cultura foram gelificados com ágar (8 g L<sup>-1</sup>), tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram autoclavados por 20 minutos a 121°C. Após a transferência, os calos foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente, onde permaneceram por 60 dias. Depois do período de incubação foram analisadas as colorações dos calos obtidos, bem como o aspecto de friabilidade, com a respectiva correlação aos estádios de desenvolvimento dos botões florais. Pôde-se observar a formação de oito tipos de calos: calos oxidados não friáveis, de cor mais escura que os demais; calos marrons friáveis; calos de cor creme friáveis; calos de cor branca friáveis; calos brancos esverdeados não friáveis; calos de cor verde claro não friáveis; calos de cor verde amarronzado não friáveis; e calos de cor verde escuro não friáveis. Visualmente houve maior formação de calos friáveis nas anteras provenientes de botões florais de tamanho intermediário, que apresentavam tétrades ou micrósporos. Os botões florais na pré-antese apresentaram, em sua maioria, calos oxidados. A obtenção de calos embriogênicos por meio do cultivo de anteras, objetivando a regeneração de plantas haploides, ainda apresenta grandes dificuldades devido à forte recalcitrância dos genótipos. Contudo, as anteras de *C. medica* L. mostraram-se responsivas ao meio MS1 utilizado para indução à calogênese. Os demais meios de cultivo não promoveram uma resposta satisfatória.

**Significado e impacto do trabalho:** A cultura de anteras é uma ferramenta bastante utilizada para a obtenção de plantas haploides. Essas plantas homocigotas, em cruzamentos de campo, podem prever com uma maior facilidade o resultado dos híbridos gerados, contribuindo com a redução do tempo necessário para o alcance de uma planta melhorada com interesse comercial.