

Meios de cultura e tamanhos de botões florais na indução à calogênese em anteras de *Citrus webberi* Wester cultivadas in vitro

Marcus Dhilermando Hora de Souza¹, Denise dos Santos Vila Verde², Deise Antero da Paixão³, Camila Rodrigues Pinto³, Jorge Eduardo dos Santos Melo³, Bruna Nunes das Virgens⁴, Antônio da Silva Souza⁵, Walter dos Santos Soares Filho⁵ e Karen Cristina Fialho dos Santos⁶

¹Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, estagiário da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bolsista FAPESB, Cruz das Almas, BA; ²Doutoranda em Produção Vegetal da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA; ³Estudante de Licenciatura em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA; ⁴Estudante de Engenharia agrônoma da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA; ⁵Engenheiro agrônomo, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; ⁶Bióloga, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução: Plantas do gênero *Citrus* apresentam um longo período juvenil, sendo esse um fator de grande dificuldade para os programas de melhoramento genético na obtenção de linhagens inteiramente homocigotas. Contudo, o período de obtenção de linhagens puras pode ser encurtado com a geração de plantas haploides, otimizando a eficiência dos programas de melhoramento e poupando décadas de trabalho. Entretanto, diversos fatores influenciam nesse processo, como a recalcitrância do genótipo à indução de calos e a dificuldade de ajuste de meios de cultura.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi testar diferentes composições de meios de cultura na indução de calos a partir de anteras de *Citrus webberi* Wester.

Material e Métodos: Para isso, como explantes, foram utilizadas anteras do genótipo *C. webberi*, coletadas ainda fechadas de botões florais, em sete classes de diâmetro e comprimento (1- Ø= 3,1 mm e C= 2,86 mm; 2- Ø= 4,22 mm e C= 3,86 mm; 3- Ø= 4,25 mm e C= 4,17 mm; 4- Ø= 5,12 mm e C= 5,07 mm; 5- Ø= 5,34 mm e C= 5,34 mm; 6- Ø= 5,85 mm e C= 6,81 mm; e 7- Ø= 6,46 mm e C= 7,77 mm) que abrangiam desde o estágio inicial de desenvolvimento do botão até a pré-antese. Os botões foram assepsiados em solução de álcool 70% por 3 minutos e hipoclorito de sódio a 0,5%, com 3 gotas de Tween 20[®] por 20 minutos, seguindo-se por três lavagens com água de osmose reversa autoclavada. Foram utilizados dois meios de cultura, sendo eles: o nomeado como M1 que tem por base o meio N6 com a adição de 40 g L⁻¹ de sacarose, 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 200 mg L⁻¹ de L-glutamina e 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico; e o nomeado como M2 que tem a composição de 1/2 da concentração do meio MT, 25 g L⁻¹ de sacarose e 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Ambos tiveram o pH ajustado para 5,8, foram solidificados com 9 g L⁻¹ de ágar e autoclavados por 20 minutos a 121 °C. As placas de Petri, cada uma com 13 anteras, foram mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27±1 °C. Aos 45 dias, o experimento foi avaliado considerando-se o percentual de formação de calos, a oxidação das anteras e a presença de contaminações.

Resultados: Para o M1, apenas as anteras dos botões de tamanho 1, que apresentavam estágio de micrósporo, geraram calos, que ocorreram em 9% delas. As anteras coletadas nos botões dessa mesma classe apresentaram a taxa de oxidação mais baixa (53%), que foi crescente até atingir 100% a partir a classe do tamanho 4. De forma geral, as anteras cultivadas nesse meio mostraram 2,85% de contaminação. Já o M2 não favoreceu a formação de calos nas anteras de todos os estádios trabalhados, entretanto naquelas dos botões do tamanho 1 se atingiu a menor porcentagem de oxidação (3%) e nas oriundas dos botões do tamanho 4, a maior taxa (98%). As anteras originadas de todas as classes dos botões apresentaram, de forma geral, 11,42% de contaminação. Com isso, pode-se concluir que a obtenção de calos pela cultura de anteras para *C. webberi* ainda apresenta grandes barreiras, especialmente pela forte resistência do genótipo à formação de calos.

Significado e impacto do trabalho: A cultura de anteras é uma técnica valiosa na obtenção de plantas haploides, uma vez que possibilita economizar décadas de trabalho com a geração de plantas homocigotas, permitindo que elas possam ser obtidas em um ciclo de cultivo. Essas linhagens puras podem ser utilizadas para estudos de mapeamento genético e em cruzamentos de campo, melhorando a previsibilidade dos resultados, o que, ao fim, otimizará o alcance de variedades com características agrônomicas de interesse.