

Adequação de metodologia para obtenção de indivíduos haploides em *Citrus* e gêneros afins

Manoela Guimarães Ferreira da Paz¹, Karen Cristina Fialho dos Santos², Antônio da Silva Souza²

¹UFRB -Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, manoelagfpaz@gmail.com; ²Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, karen.santos@embrapa.br, antonio.silva-souza@embrapa.br

Visando agilizar o melhoramento genético, diversas técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais têm sido utilizadas, entre elas a androgênese, que consiste na obtenção de haploides mediante a cultura de anteras. A obtenção de indivíduos haploides é de extrema importância, pois pode prever com antecedência o comportamento de um cruzamento de interesse, podendo, desta forma, economizar anos de estudos e de espera. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para a geração de plantas haploides, visando eliminar o efeito da heterozigosidade em cruzamentos convencionais. Botões florais de diferentes tamanhos de oito genótipos: toranjeira [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.], *Citrus webberi* Wester, tangerineira ‘Sunki Comum’ [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], tangerineira ‘Cleopatra’ (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka), tangerineira ‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco), mexeriqueira (*Citrus deliciosa* Ten.), cidra (*Citrus medica* L.) e Poncirus ‘Benecke’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], foram coletados no campo. Cada genótipo gerou um diferente experimento, tendo em vista a diferença de tamanho dos botões florais e da quantidade de anteras em cada botão floral. Para cada experimento, os botões foram medidos em comprimento e diâmetro com o auxílio de um paquímetro digital e separados em grupos de acordo com os diferentes tamanhos. Após a etapa inicial, em câmara de fluxo laminar, todos os botões florais selecionados foram submetidos a um processo de desinfestação, sendo colocados em álcool 70% por 3 minutos, solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % com Tween 20[®] por 20 minutos, seguidos por três lavagens com água destilada autoclavada. A partir daí, uma antera de cada conjunto de botões (tratamento) foi retirada, colocada sobre uma lâmina de vidro, coradas com carmim acético 2%, maceradas, com o auxílio de seringas e levadas ao microscópio estereoscópio para uma pré-visualização. Na microscopia puderam ser identificados os tipos celulares existentes nos diferentes grupos, variando entre células iniciais de formação, tétrades, micrósporos e pólen. Após a identificação dos tipos celulares, as demais anteras foram retiradas dos botões florais e inseridas em placas de Petri, contendo os meios de cultura N6 (1), MT (2), meio proposto por Germanà; Chiancone (3) e o meio de cultura proposto por Cardoso et al. (4). Os meios foram utilizados isoladamente, devido ao insucesso do meio anterior. Em cada placa foram distribuídas 13 anteras, e para cada tratamento 5 repetições (placas de Petri), totalizando 65 anteras por tratamento. Logo após, estas foram incubadas em sala de crescimento na total ausência de luz, em uma temperatura $27^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 15 dias, para os meios 1 e 3, 30 dias para o meio 4 e indefinidamente para o meio 2. Após esse período, as placas dos tratamentos com os meios 1,3 e 4 foram transferidas para uma sala de crescimento com a mesma temperatura, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental empregado em cada experimento foi inteiramente ao acaso, com um tipo de meio de cultura e diferentes estádios dos botões florais, de acordo com o genótipo. Todas as placas dos diversos experimentos foram avaliadas continuamente em relação à oxidação das anteras, número de calos e contaminações fúngicas e bacterianas. Dos oito genótipos introduzidos *in vitro*, até o momento apenas o *Citrus medica* apresentou uma calogênese acentuada em relação a quantidade e tamanho suficientes para prosseguimento ao próximo estágio do experimento. Apenas as anteras com formação de calos foram aproveitadas, sendo as demais descartadas. Em uma segunda etapa, foi realizada uma análise de todos os calos viáveis, em relação à quantidade, tamanho e peso. Os calos com tamanho menor que 2 mm foram transferidos para o meio de cultura MS modificado. Os demais, com tamanho igual ou superior a 2 mm foram pesados, alguns seccionados e também transferidos para o mesmo meio. Após a formação da quantidade de calos necessários, estes passarão por um processo de diferenciação celular em meios de cultura específicos, a fim de gerar plantas, para que ocorra uma análise do nível ploidia, e a confirmação do alcance dos haploides. Dentre os oito genótipos utilizados, apenas o *Citrus medica* se desenvolveu bem nos meios de cultura empregados até o momento, mostrando que ajustes são altamente relevantes e precisam ser efetuados para os próximos trabalhos.

Significado e impacto do trabalho: A obtenção de plantas haploides em citros ainda é um processo difícil de ser alcançado. Diversas pesquisas envolvendo genótipos e meios de cultura devem ser conduzidas a fim de facilitar este processo. Esta obtenção é de extrema importância para o desenvolvimento de variedades mais produtivas e resistentes à pragas e doenças.