

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES
DE CITROS MEDIANTE O CULTIVO DE ANTERAS E
ESTUDOS DA MORFOLOGIA FLORAL

KAREN CRISTINA FIALHO DOS SANTOS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

DEZEMBRO – 2020

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES DE CITROS MEDIANTE O CULTIVO DE ANTERAS E ESTUDOS DA MORFOLOGIA FLORAL

KAREN CRISTINA FIALHO DOS SANTOS

Bióloga

Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Coorientadora: Prof. Dra. Delmira da Costa Silva

Coorientador: Dr. Walter dos Santos Soares Filho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

DEZEMBRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Karen Cristina Fialho dos

Estratégias para obtenção de duplo-haploides de citros mediante o cultivo de anteras e estudos da morfologia floral – Cruz das Almas, BA, 2020.

116 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo.

Coorientadora: Prof. Dra. Delmira da Costa Silva.

Coorientador: Dr. Walter dos Santos Soares Filho

Tese (Fitotecnia)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2020.

1. Cultura de tecidos. 2. Fruta cítrica. 3. Calogênese I. Ledo, Carlos Alberto da Silva II. Silva, Delmira da Costa III. Soares Filho. Walter dos Santos Soares VI. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. V. Título.

CDD: 634.304

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES DE
CITROS MEDIANTE O CULTIVO DE ANTERAS E ESTUDOS DA
MORFOLOGIA FLORAL**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE KAREN
CRISTINA FIALHO DOS SANTOS**

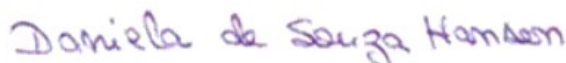
Realizada em 11 de dezembro de 2020




Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Interno (Orientador)



Profa. Dra. Cláudia Elena Carneiro
Universidade Estadual de Feira de Santana
Examinador Externo



Profa. Dra. Daniela de Souza Hansen
Instituto Federal Baiano
Examinador Externo



Profa. Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho
Faculdade Maria Milza
Examinador Externo



Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Faculdade Maria Milza
Examinador Externo

Dedico essa tese a minha avó Geraldina Fialho (in memoriam), por ser exemplo de força, determinação e perseverança. Por ser um espelho para uma vida inteira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar para essa vitória tão almejada na vida.

A minha filha Laura, que me deu mais um sentido para viver. A cada dia que passa, o amor que existe em mim só aumenta. Ver você crescer e florescer é minha maior realização. A partir do seu nascimento eu entendi o amor de mãe, um amor incondicional.

A minha mãe Glauciete, por me entender, me apoiar em todas as decisões tomadas e por simplesmente ser quem é. Ao meu pai Djalma, por todo o suporte necessário.

A minha avó Geraldina (*in memoriam*), por ter sido meu maior exemplo de vida.

A Vinicius, por ser meu companheiro de vida, por estar ao meu lado em todos os momentos e sempre segurar minha mão.

A minha amiga-irmã Andresa, por ser minha apoiadora incondicional, confiante e parceira.

A minha família, de forma geral, por ter me moldado como sou hoje.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial a Honorato, Tania, Manoela, Leila e Marcus Dhilermando, por sempre me auxiliarem em todos os trabalhos possíveis, e a todos os estagiários que direta ou indiretamente fizeram ou fazem parte da minha história nesses 10 anos.

Aos amigos dos campos experimentais, em especial a Santana e Getúlio, por não medirem esforços sempre que precisei de frutos ou flores para a condução do meu trabalho. Sem o empenho de vocês nada disso teria dado certo.

Ao meu amigo-pai Antônio Souza. Faltam palavras pra expressar minha gratidão por tudo. Um exemplo de pessoa e de profissional. É nele que eu me espelho quando imagino a experiência e competência que almejo chegar perto de ter um dia.

A Walter Soares, que juntamente com Antônio me guiaram durante todo o trabalho, desde a ideia original até o resultado final. Por acreditarem que eu poderia fazer, mesmo quando eu pensei que não podia.

Ao meu orientador Carlos Ledo, por aceitar e enfrentar essa jornada comigo.

A Delmira Silva, por me auxiliar em todas as análises histoquímicas, por todo apoio prestado e por assumir este trabalho sem nenhuma hesitação. Sem sua participação, não teria acontecido.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ser minha casa desde 2010, por me dar a oportunidade de ter me tornado a profissional realizada que sou hoje.

Aos amigos do Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-Bahia), em especial a Márcio e Arlene, que tanto me auxiliaram nas análises de microscopia de varredura.

A todos os professores do PPGCA, que contribuíram efetivamente para minha formação profissional.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de concluir mais uma formação acadêmica.

A todos que de alguma forma colaboraram para o encerramento dessa etapa de fundamental importância na minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
ARTIGO 1	
Indução e multiplicação de calos a partir de anteras de citros.....	28
ARTIGO 2	
Potencial regenerativo de calos induzidos em anteras de <i>Citrus medica</i> L.....	69
ARTIGO 3	
Aspectos da morfologia floral, anatomia e histoquímica e anteras de anteras de espécies de citros.....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115

ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES DE CITROS MEDIANTE O CULTIVO DE ANTERAS E ESTUDOS DA MORFOLOGIA FLORAL

Autor: Karen Cristina Fialho dos Santos

Orientador: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: Avanços nos programas de melhoramento genético podem ser alcançados mediante o uso de técnicas biotecnológicas. Uma dessas ferramentas é a produção de indivíduos haploides por meio do cultivo in vitro de anteras, que facilita a análise genética do material e elimina a complexidade do estado heterozigoto, aumentando a eficiência do processo de seleção de novas cultivares. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para geração de linhagens homozigotas a partir de plantas haploides, de modo a eliminar os efeitos da heterozigosidade nos cruzamentos convencionais dos citros. O material vegetativo utilizado foi coletado de espécies com elevada homozigose, utilizadas como porta-enxerto de interesse dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*, do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram instalados experimentos, visando, a princípio, a obtenção de calos por meio do cultivo de anteras, em quatro meios de cultura, nas espécies: cidreira (*C. medica* L.), *C. webberi* Wester, toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.], mexeriqueira (*C. deliciosa* Ten.), tangerineiras ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e ‘Cravo’ (*C. reticulata* Blanco) e *P. trifoliata* (L.) Raf. var. ‘Benecke’. Para *C. medica*, a única espécie que foi responsiva à obtenção e multiplicação dos calos, foram montados oito novos experimentos visando a regeneração de plantas. Além disso, para todas as espécies, foram realizados estudos de microscopia e histoquímica a fim de identificar diferenças e características entre as anteras e grãos de pólen que possam ter interferido no processo regenerativo. Apesar da espécie *C. medica* ter sido responsiva à calogênese e à multiplicação dos calos, não houve regeneração de plantas em nenhum dos meios de cultura estudados. A microscopia e a histoquímica apresentaram diferenças a nível estrutural e bioquímico das anteras e grãos de pólen dos genótipos estudados, evidenciando a diversidade das espécies e possíveis causas que interferiram nas rotas morfogenéticas.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos, Calogênese, *Citrus*, *Poncirus*

STRATEGIES FOR OBTAINING CITRUS DOUBLE-HAPLOIDS THROUGH ANTHER CULTIVATION AND FLORAL MORFOLOGY STUDIES

Author: Karen Cristina Fialho dos Santos

Adviser: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: Advances in genetic improvement programs can be achieved through the use of biotechnological techniques. One of these tools is the production of haploid individuals through the in vitro cultivation of anthers, which facilitates the genetic analysis of the material and eliminates the complexity of the heterozygous state, increasing the efficiency of the selection process for new cultivars. Therefore, the objective of this work was to develop a methodology for generating homozygous strains from haploid plants, in order to eliminate the effects of heterozygosity in conventional citrus crosses. The vegetative material used was collected from species with high homozygosity used as rootstocks of interest of the genus *Citrus* and *Poncirus*, from the Active Germplasm Bank (AGB) of *Citrus* of Embrapa Cassava and Fruits. Experiments were installed, in principle, to obtain calluses by cultivation of anthers, in four different culture media, in the species: citron (*C. medica* L.), *C. webberi* Wester, pomelo [*C. maxima* (Burm.) Merr.], sicilian mandarin (*C. deliciosa* Ten.), 'Cleopatra' mandarin (*C. reshni* hort. ex Tanaka), 'Sunki' mandarin [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], 'Cravo' mandarin (*C. reticulata* Blanco) and *P. trifoliata* (L.) Raf. var. 'Benecke'. For *C. medica*, the only species that was responsive to obtain and multiplying the calluses, eight new experiments were set up aiming the plant regeneration. In addition, for all species, microscopy and histochemical studies were performed to identify differences and characteristics between anthers and pollen grains that may have interfered in the regenerative process. Although *C. medica* was responsive to callogenesis and callus multiplication, there was no plant regeneration in any of the studied media. Microscopy and histochemistry showed differences at the structural and biochemical differences in the anthers and pollen grains of the studied genotypes, showing the diversity of the species and possible causes that interfered in the morphogenetic routes.

Keywords: Tissue Culture, Callogenesis, *Citrus*, *Poncirus*

REFERENCIAL TEÓRICO

A CULTURA DOS CITROS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A cultura de citros, que atualmente é explorada em mais de 140 países, nos mais diversos climas (ZHONG; NICOLOSI, 2020), provavelmente teve sua origem na Ásia e no arquipélago Malaio (WEBBER et al., 1967). São plantas eudicotiledôneas e segundo a APG IV (2016) pertencentes a ordem Sapindales, família Rutaceae e gênero *Citrus*.

O Brasil é o primeiro produtor e exportador de laranjas do mundo, tendo exportado no ciclo 2019-2020 mais de 1 milhão de toneladas de suco processado (USDA, 2020), e, portanto, a importância do bom desenvolvimento da cultura nos pomares do País é irrefutável. Entre os estados brasileiros, na safra de 2020, São Paulo desponta como o primeiro produtor de laranjas com mais de 14 milhões de toneladas, seguido por Minas Gerais (941 mil toneladas), Paraná (804 mil toneladas) e Bahia (633 mil toneladas) (IBGE, 2020). As exportações desse produto se mantiveram firmes ao longo dos anos, mesmo durante o período de crise da década de 1990, onde se obteve uma maior quantidade de suco do que aquela esperada para o processamento (ALMEIDA; PASSOS, 2013), sendo o maior consumidor desse produto, a união europeia (USDA, 2020). A citricultura brasileira tem uma importância direta na abertura de vagas de empregos e geração de renda, por meio da aplicação nas mais diversas indústrias e, portanto, no desenvolvimento regional (ZULIAN et al., 2013).

Entretanto, mesmo com a diversificação do cultivo, a variabilidade genética do gênero *Citrus* vem diminuindo ao longo dos anos nos pomares comerciais, principalmente em relação às variedades locais e parentes silvestres (FERREIRA et al., 2013). Esse ponto ainda é agravado pelo fato dessa cultura ter uma estreita base genética de variedades copa e porta-enxerto (ALMEIDA; PASSOS, 2013). Segundo Curk et al. (2016), a base para a maioria das espécies cítricas é composta pelas espécies *Citrus maxima* (Burm.) Merr., *Citrus medica* L., *Citrus micranta* Wester e *Citrus reticulata* Blanco. Dessa forma, técnicas de melhoramento genético são

essenciais para a ampliação e manutenção da diversidade e da produtividade das cultivares cítricas.

Porém, além da ampliação das cultivares melhoradas por meio dos programas de melhoramento, os trabalhos de extensão rural são fundamentais para sua adaptação, aceitação e implementação pelos pequenos, médios e grandes agricultores.

IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA E COMERCIAL DOS PORTA-ENXERTOS ESTUDADOS

Porta-enxertos têm sido utilizados na cultura dos citros há centenas de anos e fazem parte essencial no sucesso da indústria mundial. Eles são utilizados principalmente objetivando a quebra da juvenilidade presente nas variedades copa cultivadas diretamente de sementes (FORNER-GINER et al., 2020). Essa quebra de juvenilidade é bastante apreciada entre os agricultores tendo em vista a antecipação de uma média de 2-3 anos na obtenção de frutos (BOWMAN; JOUBERT, 2020). Além disso, os porta-enxertos atuam compensação da susceptibilidade e falta de tolerância dessas variedades a diversos fatores bióticos e abióticos, respectivamente (FORNER-GINER et al., 2020). Entre esses fatores podem ser destacados a tolerância à seca, ao alumínio, à salinidade e ao frio, e a resistência à patógenos como vírus e o oomiceto *Phytophthora* spp.. Essas plantas devem ter por característica a produção de sementes com alta taxa de poliembrionia e elevado número de sementes por fruto (CUNHA SOBRINHO et al., 2013). Em algumas espécies de tangerineiras, por exemplo, a obtenção de frutos se dá apenas quando a variedade copa é enxertada, sendo a via de plantio por sementes inviável (BOWMAN; JOUBERT, 2020).

Os porta-enxertos têm forte influência na característica dos frutos, a exemplo do tamanho e qualidade (CUNHA SOBRINHO et al., 2013; FORNER-GINER et al., 2020). Além disso, garantem uma uniformidade nas plantas (FRANZON et al., 2010) e, portanto, na produtividade do pomar. Dessa forma, o conhecimento e a escolha adequada dos genótipos utilizados são fundamentais para o bom desenvolvimento dos plantios comerciais.

Citrus medica L.

Como o próprio nome indica, as cidras são notoriamente reconhecidas por seu valor terapêutico na medicina tradicional. Essa espécie tem sido utilizada tanto na medicina humana quanto na animal como tratamento nas mais diversas áreas, desde dores de estômago a problemas cardíacos e parasitários. Suas folhas podem atuar como um poderoso indutor de sono (KALARIYA et al., 2019) e seus frutos como uma rica fonte de antioxidantes e óleos essenciais (CHHIKARA et al., 2018).

Provavelmente foi a primeira espécie cítrica difundida na Europa (ZHONG; NICOLOSI, 2020), sendo diversificada posteriormente com o surgimento de outras espécies. Segundo Biswas et al. (2020), as cidreiras, juntamente com as tangerineiras e os pomeleiros são as três espécies base, também conhecidas como espécies verdadeiras, as quais são geradoras das demais espécies de citros atualmente conhecidas. Raveh et al. (2020) afirmam ainda que as cidreiras são os parentais masculinos para todos os limoeiros e limeiras.

Miles et al. (2017), em trabalho realizado para detecção de indivíduos resistentes ao *huanglongbing*, encontraram resultados promissores para essa espécie. No trabalho citado, em um campo naturalmente infestado com a doença, as plantas dessa espécie mantiveram um adequado crescimento e a perda de folhas não foi considerada expressiva.

Um estudo realizado por Deng; Ma (2020) revelou a resistência dessa espécie ao cancro cítrico. Em contrapartida, é reconhecida pela alta sensibilidade à salinidade e a baixa tolerância ao frio (LO PIERO, 2020).

As cidreiras possuem uma alta densidade de espinhos no caule (SANTOS, 2014) e frutos típicos ovulares ou oblongos, com ou sem extensões, que se assemelham a dedos. Embora tenham sementes caracteristicamente monoembriônicas, possuem uma elevada homozigidade (ZHONG; NICOLOSI, 2020).

Citrus webberi Wester

É uma espécie pouco conhecida no uso como porta-enxertos, entretanto é bastante utilizada em programas de melhoramento genético dos citros. Alguns trabalhos citam o seu potencial ornamental devido ao porte e à beleza de suas flores, além do aroma marcante (SOARES FILHO et al., 2011; SANTOS, 2014).

Também conhecida como limeira da montanha, possui altura média de 190 cm e uma copa muito densa. Além disso, seus frutos são de tamanho intermediário a grande e possui uma planta sem espinhos (SANTOS, 2014). É uma espécie resistente a *Phytophthora* (TUZCU et al., 1984).

Citrus maxima (Burm.) Merr.

Os pomeleiros têm como provável centro de origem o Sudeste da Ásia (ZHONG; NICOLSI, 2020). Junto com a tangerineira são reconhecidos como os ancestrais das laranjeiras doces e azedas, toranjeiras e de todas as variedades de tangerineiras geradas recentemente (RAVEH et al., 2020).

Os frutos dessa espécie têm como característica seu tamanho, pois são muito grandes em comparação aos frutos das demais espécies do gênero. Os pomelos tem como característica a produção de sementes monoembriônicas (LO PIERO, 2020).

Catara et al. (2020) apontam a resistência da espécie ao vírus da tristeza dos citros, enquanto Lo Piero (2020) ressalta a alta tolerância à salinidade.

Citrus deliciosa Ten.

É uma espécie originada provavelmente da região do Mediterrâneo (PASSOS et al., 2013) e que tradicionalmente é utilizada como variedade copa (SCHÄFER et al., 2001). Entretanto, por ser uma espécie que possui boas características como a tolerância a fatores bióticos e abióticos, vem sendo utilizada também como porta-enxerto.

Oustric et al. (2020) identificaram uma moderada tolerância ao déficit hídrico dessa espécie. Além disso, quando submetida a escassez de água, os frutos da variedade copa enxertada tiveram um aumento em sua qualidade em relação ao

tamanho, acidez e °brix. Ainda em relação a ser utilizada como porta-enxerto, os frutos da variedade copa tendem a ter um peso intermediário, porém com teores de suco relativamente baixos (HUSSAIN et al., 2013). Além disso, a espécie é relativamente tolerante a doença do cancro cítrico (DANÓS et al., 1984).

Citrus reshni hort. ex Tanaka

Também conhecida como tangerineira 'Cleópatra', é a tangerineira mais utilizada como porta-enxerto (CUNHA SOBRINHO et al., 2013; FORNER-GINER et al., 2020). Nos primeiros anos de cultivo, as copas enxertadas não apresentam alto rendimento, porém a tendência é que após o 8º ano de plantio, seja alcançado o auge da produtividade, que perdura por vários anos. É uma espécie resistente ao vírus da tristeza dos citros e tolerante a baixas temperaturas (FORNER-GINER et al., 2020). Constitui-se em um dos porta-enxertos que possuem maior tolerância a salinidade (CUNHA SOBRINHO et al., 2013; BOWMAN; JOUBERT, 2020; LO PIERO, 2020), alta tolerância à seca e intermediária tolerância a altos níveis de pH no solo (BOWMAN; JOUBERT, 2020). Em contrapartida, possui baixa tolerância a solos encharcados e a nematoides (BOWMAN; JOUBERT, 2020).

Os frutos provenientes das copas enxertadas nessa espécie possuem alta qualidade, com alto °brix e podem ser pequenos (BOWMAN; JOUBERT, 2020) e com uma maturação mais lenta, permitindo uma colheita mais tardia (CUNHA SOBRINHO et al., 2013), além de um alto conteúdo de suco (TAZIMA et al., 2013). Entre outras vantagens da espécie, aponta-se o fato de a planta não possuir espinhos (SANTOS, 2014), o que facilita a colheita dos frutos.

Citrus sunki (Hayata) hort. ex Tanaka

De provável origem na China, tem o Brasil como o único País do mundo onde a espécie é utilizada como porta-enxerto de caráter comercial (BOWMAN; JOUBERT, 2020).

São plantas tolerantes à seca (LO PIERO, 2020), resistentes ao cancro cítrico (DENG; MA, 2020), tolerantes à salinidade e moderadamente tolerantes a altos níveis

de pH no solo e ao frio (BOWMAN; JOUBERT, 2020). São altamente susceptíveis à gomose causada pelo oomiceto *Phytophthora* (CATARA et al., 2020). Não possuem espinhos (SANTOS, 2014) e quando utilizados como porta-enxertos geram plantas com largas copas e frutos com ótimas características de peso, altura e diâmetro (TAZIMA et al., 2013).

Citrus reticulata Blanco

As mandarineiras ou tangerineiras comuns possuem frutos que em geral têm tamanho pequeno e são fáceis para descascar. Esses frutos, de forma geral, variam em tamanho, forma e cor. A variedade comercial de maior importância das tangerineiras comuns é a 'Ponkan' ou 'Poncã' que é cultivada principalmente na China, Índia e Brasil (ZHONG; NICOLOSI, 2020).

É, juntamente com a *Citrus clementina*, o segundo grupo mais expressivo em relação ao consumo, ficando atrás apenas das laranjas doces (DEL BOSCO et al., 2020). A espécie é pouco afetada pela doença do cancro cítrico (DENG; MA, 2020) e possui caule sem espinhos (SANTOS, 2014).

Poncirus trifoliata (L.) Raf.

Apesar de não ser do *Citrus* e sim de um gênero afim, a espécie produz frutos considerados como cítricos verdadeiros (CUNHA SOBRINHO et al., 2013). São plantas que possuem a capacidade de cruzamento com os citros, produzindo descendentes férteis. Tem como característica importante a tolerância ao frio e, nesse sentido, compõem um gênero único que possui folhas decíduas e entram em dormência durante o inverno. Essas características fazem parte do processo evolutivo, devido ao seu local de origem, o Nordeste Asiático, possuir invernos rigorosos (LO PIERO, 2020).

Em regiões de clima subtropical, a produção de frutos não é considerada precoce, porém quando cultivada em áreas com climas mais frios já pode ser observada plena produção aos 2 anos de idade (CUNHA SOBRINHO et al., 2013). São plantas altamente produtivas e possuem frutos pequenos com alta qualidade,

além de serem adequadas para utilização em plantios de alta densidade. São adaptadas tanto a solos argilosos como arenosos, desde que ocorra uma boa irrigação, pois apresenta baixa tolerância à deficiência hídrica (FORNER-GINER et al., 2020). Bowman; Joubert (2020) citam a alta tolerância da espécie a solos úmidos e encharcados e a baixa tolerância a solos com alto pH, salinidade e seca.

Trata-se de uma espécie utilizada com frequência em diversos programas de melhoramento genético, pois é resistente ao vírus da tristeza dos citros, à podridão radicular e a nematoides. Além disso, tem o caráter trifoliata dominante sobre os cruzamentos com as espécies de citros, o que facilita a predição nos cruzamentos realizados (FORNER-GINER et al., 2020). As plantas enxertadas no *P. trifoliata* tendem a ter maior diâmetro de frutos, com maior conteúdo de suco e °brix (TAZIMA et al., 2013). Além disso, tem a habilidade de melhorar a qualidade dos frutos das variedades copa enxertadas (BOWMAN; JOUBERT, 2020), o que é de fundamental importância no melhoramento genético.

São plantas altamente resistentes a *Phytophthora* (DALIO et al., 2018). Em contrapartida, são altamente susceptíveis ao cancro cítrico (DENG; MA, 2020) e possuem alta densidade de espinhos no caule (SANTOS, 2014).

MELHORAMENTO GENÉTICO DE CITROS E GÊNEROS AFINS

Pesquisas envolvendo melhoramento e conservação dos citros são realizadas em diversas partes do mundo. Entre as instituições que mantém acessos dessas espécies conservadas na forma de bancos ativos de germoplasma destacam-se o Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops (RRIFSC), localizado em Sochi (Rússia); o Agricultural Research Service (ARS) National Clonal Germplasm Repository for Citrus and Dates (NCGRCD), localizado em Riverside, Califórnia (EUA); Centre international de recherche et d'aide au développement (CIRAD), localizado em Montpellier (França); e a Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia (Brasil).

Dentre todos os grupos de trabalho com o gênero, as pesquisas em melhoramento vegetal do Brasil estão entre as melhores do mundo e têm gerado grandes contribuições, principalmente em relação ao desenvolvimento de porta-

enxertos de citros adaptados às condições tropicais (SANTANA et al., 2018). No entanto, apesar da sua grande relevância, a citricultura brasileira se mostra bastante vulnerável a pragas e doenças devido à baixa quantidade de espécies e de híbridos utilizados comercialmente, que sustentam toda a produção nacional (SOARES FILHO, 1999). Dessa forma, é importante a constante obtenção de genótipos de interesse comercial que sejam resistentes à doenças e tolerantes à fatores abióticos (SANTANA et al., 2018). Como aliada ao melhoramento, o gênero *Citrus* e aqueles afins têm uma variabilidade genética que pode ser altamente explorada e utilizada na obtenção de novas cultivares (CUENCA et al., 2018), principalmente no que diz respeito a porta-enxertos mais adequados à diversas condições ambientais.

Vardi e Galun (1989) citam as peculiaridades para a obtenção de novas cultivares, por conta de diferenças nos mecanismos de reprodução encontrados nos citros. Enquanto os indivíduos monoembriônicos são relativamente fáceis para manipulação nas hibridações sexuais, os poliembriônicos são mais difíceis de serem explorados mediante cruzamentos controlados para gerar novos indivíduos de interesse, como no caso de limoeiros e laranjeiras doces.

O melhoramento genético clássico pode levar décadas para a obtenção de uma planta de interesse comercial, com capacidade de reprodução e aplicação em larga escala na agricultura. Uma das áreas de interesse para suporte ao melhoramento genético é a biotecnologia, que propicia um grande apoio e suporte ao desenvolvimento de novas espécies e variedades.

A BIOTECNOLOGIA COMO ALIADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO

A biotecnologia, por meio da cultura de tecidos, participa com várias técnicas em diversas fases do melhoramento genético, atuando na produção in vitro de organismos de interesse, podendo, inclusive, oferecer soluções únicas. Além disso, essas técnicas podem acelerar algumas fases do melhoramento (SIMÕES, 2018). Os procedimentos biotecnológicos permitem superar algumas das dificuldades enfrentadas pelos programas de melhoramento genético e, em associação com procedimentos tradicionais, constituem vias auxiliares de uma contínua geração de

novas variedades, copas e porta-enxertos, de interesse, como, por exemplo, das espécies cítricas.

Algumas das técnicas utilizadas na cultura de tecidos, como o cultivo de anteras (CARDOSO et al., 2014), a embriogênese somática, com posterior diferenciação de embriões e a organogênese podem auxiliar no processo de melhoramento genético (ANDRADE, 2002) por meio da regeneração *in vitro* de plantas haploides.

Quando obtidas, as plantas haploides promovem o encurtamento do processo de desenvolvimento de linhagens puras e podem facilitar a obtenção de indivíduos superiores (FERREIRA et al., 1998). A haploidização das plantas, representa de forma direta a segregação dos gametas após a fase meiótica de indivíduos híbridos. Ao promover a eliminação da heterozigose, a aleatoriedade da seleção das populações F2 é solucionada. Dessa forma, a obtenção das linhagens puras facilita a obtenção de plantas de interesse (MILANI; CARVALHO, 2005).

OBTENÇÃO DE HAPLOIDES

As plantas de citros têm cromossomos muito pequenos, característica que implica em uma análise de número cromossomal limitada por técnicas convencionais. Dessa forma, a citometria de fluxo tem sido uma grande aliada para a confirmação do nível de ploidia das plantas de citros de interesse. Essa técnica, que não requer uma individualização celular, tem uma preparação de amostra relativamente simples e consegue mensurar rapidamente uma grande população (DOLEZZEL; BARTOS, 2005). Os citros possuem o número de cromossomos em plantas diploides normais igual a 18 ($2n=18$), ou seja, em nível de haploidia o número de cromossomos se resume a 9 ($n=9$) (FROST, 1925).

Tecnologias para a obtenção de haploides são de fundamental importância para o melhoramento genético de culturas perenes de interesse, como é o caso dos citros (OLLITRAULT et al., 2020). A obtenção de haploides por meio da cultura de tecidos pode acontecer por duas vias, a gimnogênica e a androgênica (PEÑALOZA; POZZOBON, 2011).

Pela via gimnogênica, as células haploides dos gametófitos femininos são estimuladas ao desenvolvimento em um processo análogo ao da partenogênese. Elas podem ser obtidas de três formas. A primeira, mediante o desenvolvimento espontâneo pelas plantas, porém como são encontradas com frequência bastante baixa, não é um procedimento explorado rotineiramente. A segunda, conta com a fertilização de óvulos com grãos de pólen esterilizados por irradiação com raios gama de cobalto 60, gerando uma partenogênese induzida que é seguida da cultura de embriões in vitro. Nessa técnica, as diferentes doses de radiação, a otimização do método de polinização e o estágio de desenvolvimento da coleta do material são de fundamental importância. A terceira técnica, também é realizada por partenogênese, e é executada por meio da fertilização do óvulo com pólen de plantas triploides, também seguida pela cultura in vitro de embriões. Este tipo de pólen, bem como os irradiados, induz a germinação, mas não promove a fertilização do óvulo, estimulando, dessa forma, o desenvolvimento dos indivíduos haploides (GERMANÀ, 2009). Os grãos de pólen provenientes das plantas triploides se apresentam enrugados, irregulares e vazios de citoplasma, o que confere a esterilidade celular (MEDINA et al., 1958).

Pela via androgênica, dois tipos de obtenção de haploides podem ser observados. O primeiro e mais utilizado se dá por meio do cultivo in vitro de anteras. Nessa técnica, anteras em estágio de meiócitos ou micrósporos são coletadas ainda em botões florais fechados, passam por uma série de procedimentos para assepsia e, posteriormente, são extraídas e colocadas em meio de cultura específico para a obtenção de calos e regeneração de plantas. Já a técnica de obtenção via cultura de micrósporos isolados é mais específica e tem a vantagem de eliminar os tecidos somáticos da antera, promovendo, dessa forma, um maior controle, porém não é tão utilizada por conta da maior especificidade e do maior aparato tecnológico que precisa estar disponível (GERMANÀ, 2009; OLLITRAULT et al., 2020).

Embora algumas culturas já tenham protocolos estabelecidos para obtenção de haploides in vitro, como o milho (PIERRE et al., 2011), o trigo (GRAUDA et al., 2010) e o arroz (NAIK et al., 2017), o desenvolvimento da embriogênese gamética para a obtenção de haploides de citros é bastante escasso e não tem obtido o sucesso devido, principalmente em razão dos diversos fatores envolvidos para aumento das

taxas de indução de haploidia e de sobrevivência dessas plantas, quando transferidas para as condições *ex vitro* (GERMANÀ, 2006). No caso dos citros, as dificuldades enfrentadas para a obtenção dos haploides se devem ao longo ciclo reprodutivo, alto grau de heterozigosidade e auto-incompatibilidade (GERMANÀ; CHIANCONE, 2003). Contudo, essa técnica é de extrema importância para o melhoramento genético de citros. Segundo Gueye; Ndir (2010), a produção de plantas haploides por meio do cultivo de anteras é uma técnica rápida para alcance da homozigose, que reduz o tempo necessário para o desenvolvimento de novas cultivares. O alcance da homozigose reduz os vários ciclos de cultivos necessários para a obtenção de uma variedade melhorada, aumentando dessa forma a eficiência da seleção e dando maior celeridade aos programas de melhoramento genético (OLLITRAULT et al., 2020).

Para tanto, ajustes de protocolos devem ser realizados a fim de adequar a dosagem de irradiação, o meio de cultura ideal, a temperatura e a luminosidade para aumento do sucesso da obtenção dessas plantas. Também é de fundamental importância a análise e escolha dos genótipos a serem utilizados. Germanà et al. (1994) mencionam a influência de vários fatores, incluindo o genótipo, para o adequado desenvolvimento no cultivo *in vitro* de anteras de *Citrus*. Ollitrault et al. (2020) ressaltam que além dos genótipos estudados, a época de colheita do explante também influencia os experimentos envolvendo a embriogênese em citros. Portanto, novas tecnologias e manejos podem aumentar a taxa de produção de plantas haploides para a efetiva exploração do potencial genético dessa técnica no melhoramento genético dos citros (GERMANÀ, 2006).

Entretanto, apesar de serem vigorosas *in vitro*, em condições de campo as plantas haploides crescem de forma lenta e são frequentemente acometidas por contaminações fúngicas. Provavelmente, isso se deve à expressão de genes recessivos nocivos quando presentes em homozigose (GERMANÀ, 2006). Dessa forma, para ter sucesso na utilização das plantas haploides, é necessária a duplicação do número cromossomal e a obtenção de plantas duplo-haploides, mais estáveis geneticamente.

OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES

As linhagens duplo-haploides têm como principal vantagem a presença de todos os locos em homozigose. Esta é a principal vantagem das linhagens puras em relação à utilização dos cruzamentos com diploides convencionais, pois quando é realizado o melhoramento genético tradicional, após seis a oito gerações de autofecundação, ainda é possível encontrar locos em heterozigose (PIERRE et al., 2011). Com o auxílio de técnicas biotecnológicas, no entanto, esse tempo é reduzido para aproximadamente um ano (HOOGHVORST et al., 2018), quando o protocolo utilizado já está estabelecido, a depender da cultura estudada.

Para a promoção da duplicação cromossômica dos haploides in vitro, uma das alternativas é a utilização de agentes antimitóticos. Os mais comumente empregados são a colchicina (EBRAHIMZADEH et al., 2018; NOORI et al., 2017), a orizalina (CARVALHO et al., 2016; ŠVĚCAROVÁ et al., 2019) e a cafeína (BORGES et al., 2016; BROUGHTON et al., 2020). Porém, para o sucesso na aplicação dos trabalhos, é de fundamental importância o conhecimento da toxicidade que o agente pode causar. Dessa forma, é essencial o conhecimento das doses ideais e do tempo de exposição do agente antimitótico a ser empregado (ALLUM et al., 2007). Carvalho et al. (2016) citam, por exemplo, que a orizalina é menos tóxica para os tecidos vegetais do que a colchicina e ainda tem alta eficiência na poliploidização dos materiais vegetais expostos. Borges et al. (2016) também apontam a alta fitotoxicidade da colchicina e indicam a cafeína como uma alternativa eficaz e menos tóxica para a sua substituição.

Os agentes antimitóticos atuam se ligando às tubulinas, que são as proteínas responsáveis pela formação das fibras do fuso acromático. Dessa forma, ela impede a formação dessas fibras e conseqüentemente a separação dos cromossomos na fase de anáfase, fazendo com que a célula se mantenha duplicada no próximo ciclo celular (ALEZA et al., 2009).

Para auxílio no melhoramento genético, além da obtenção das plantas haploides e duplo-haploides, é necessário também o conhecimento das características florais dos genótipos estudados. Além da morfologia floral, os estudos

anatômicos e microscópicos envolvendo as anteras e os grãos de pólen das espécies são de extrema importância para o entendimento dos diversos processos fisiológicos.

MORFOANATOMIA FLORAL E HISTOQUÍMICA EM ANTERAS DE CITROS

O estudo da morfoanatomia floral pode prever diretamente a produtividade da cultura estudada (SILVA et al., 2005). Esses autores ainda citam que a planta, mediante a presença de patógenos, pode criar barreiras químicas para defesa, como a deposição de lignina e resina, reduzindo dessa forma a produção esperada. Dessa forma, estudos de anatomia aliados à histoquímica podem auxiliar o entendimento dos diferentes processos morfológicos nas espécies de interesse, que podem por sua vez contribuir e acelerar as diversas fases do melhoramento genético vegetal.

Para a obtenção de haploides por meio do cultivo in vitro de anteras, os meiócitos parecem ser o estágio de desenvolvimento mais adequado (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2005), além deles, também são utilizados os micrósporos. Dessa forma, o conhecimento geral da flor e em específico da antera e dos tipos celulares se torna essencial para o entendimento desse tipo de estudo.

Na família Rutaceae existe uma ampla variedade de tipos florais, sendo os estudos morfológicos e anatômicos das flores utilizados diretamente na compreensão da biologia geral das plantas, classificação taxonômica, filogenia e evolução (PIRANI et al., 2010).

Vários autores apontam a importância das observações morfoanatômicas e histoquímicas dos órgãos reprodutivos de plantas para fins de identificação e melhor classificação de gêneros, espécies e genótipos. Entre esses trabalhos estão alguns realizados com as espécies *Citrus aurantifolia* L. (MAHDI; AMAM, 2017) e *Pilocarpus pennatifolius* (SOUZA et al., 2003) pertencentes a Rutaceae, nos gêneros de Moraceae (JACOMASSI et al., 2010) e de Passifloraceae (DETTKE; SANTOS, 2011). No entanto, mesmo diante de toda a importância desse tipo de trabalho para uma melhor identificação de espécies, como é o caso do aprofundamento da anatomia floral, poucos estudos têm sido realizados.

Segundo Judd et al. (2009) na família Rutaceae as flores podem ser unissexuais, com inflorescências determinadas ou reduzidas a uma única flor, contendo estames que podem ser numerosos. Nessa família, as anteras são tetrasporangiadas e em sua maioria contém duas tecas, que possuem deiscência longitudinal; os grãos de pólen são binucleados ou raramente trinucleados (Cronquist, 1981).

Da mesma forma que ocorre nas flores, nos grãos de pólen das diferentes espécies e gêneros de uma mesma família podem ser encontradas diferenças pontuais, que auxiliem na distinção das espécies (INYAMA et al., 2015). A importância da utilização de técnicas como a microscopia, especificamente a de varredura, é irrefutável, principalmente para análise da morfologia dos grãos de pólen e do tipo de abertura dos mesmos, em famílias que têm alguma diversidade do ponto de vista palinológico (DETTKE; SANTOS, 2009).

Como sugerido por Rodrigues et al. (2004), quanto mais abrangentes as técnicas utilizadas no estudo em questão, mais completas serão as informações em relação aos eventos morfogênicos. Ou seja, maior será o entendimento geral sobre um indivíduo ou grupo de indivíduos. Por isso, a união das técnicas de microscopia de varredura e histoquímica parecem ser as mais completas para o estudo das espécies de *Citrus* e gêneros afins, especificamente em relação ao processo androgênico in vitro.

A microscopia de varredura tem como vantagem a possibilidade de uma análise aprofundada das diversas estruturas florais presentes em cada espécie estudada. Dessa forma, se torna uma ferramenta de grande auxílio na diferenciação de genótipos provenientes de determinado gênero ou família (WEI et al., 2015).

Após a aplicação das técnicas de microscopia e anatomia, que permitem uma visão geral dos tecidos analisados e podem identificar estruturas específicas como, por exemplo, estruturas secretoras, os testes histoquímicos vêm como um complemento imprescindível para análise das diversas substâncias secretadas nos diferentes tecidos de um genótipo em particular (PALERMO et al., 2017). Por meio de protocolos específicos, estes testes auxiliam a identificação de compostos secundários presentes na espécie vegetal de interesse (TIAGO et al., 2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1837-1846, 2009.

ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1977–1984, 2007.

ALMEIDA, C. O. de; PASSOS, O. S. A citricultura brasileira: produção, mercado e perspectivas. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 391-399.

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

APG IV (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 181, p. 1-20, 2016.

BISWAS, M. K.; BAGCHI, M.; DENG, X.; CHAI, L. Genetic resources of *Citrus* and related genera. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 23-31.

BORGES, V. P.; MARQUES, T. S.; REIS, A. S.; OLIVEIRA, N. H. C.; JESUS, J. A.; SILVEIRA, D. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA, S. de O. e; LEDO, C. A. da S. Desenvolvimento in vitro de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimetabólitos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 10, p. 1789-1793, 2016.

BOWMAN, K. D.; JOUBERT, J. Citrus rootstocks. In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER JR., F.G. (Ed.). **The genus *Citrus***. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. p. 105-127.

BROUGHTON, S.; CASTELLO, M.; LIU, L.; KILLEN, J.; HEPWORTH, A.; O'LEARY, R. The effect of caffeine and trifluralin on chromosome doubling in wheat anther culture. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 105-119, 2020.

CARDOSO, J. C.; MARTINELLI, A. P.; GERMANA, M. A.; LATADO, R. R. In vitro anther culture of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genotypes and of a *C. clementina* × *C. sinensis* 'Hamlin' hybrid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 455-464, 2014.

CARVALHO, M. de J. da S. de; GOMES, V. B.; SOUZA, A. da S.; AUD, F. F.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; OLIVEIRA E. J. de. Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their in vitro morphophysiological effects. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1-14, 2016.

CATARA, V.; SUMING, D.; SARRIS, P. F. Molecular mechanisms for resistance to biotic stresses. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 281-294.

CHHIKARA, N.; KOUR, R.; JAGLAN, S.; GUPTA, P.; GAT, Y.; PANGHAL, A. *Citrus medica*: nutritional, phytochemical composition and health benefits- a review. **Food & Function**, v. 9, n. 4, p. 1978-1992, 2018.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1.262 p.

CUENCA, J.; GARCIA-LOR, A.; NAVARRO, L.; ALEZA, P. Citrus Genetics and Breeding. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (eds.). **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. Springer, Cham, 2018. p. 403-436.

CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. Cultivares porta-enxerto. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 233-292.

CURK, F.; OLLITRAULT, F.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. **Annals of Botany**, v. 117, p. 565-583, 2016.

DALIO, R. J. D.; MÁXIMO, H. J.; OLIVEIRA, T. S.; AZEVEDO, T. D. M.; FELIZATTI, H. L.; CAMPOS, M. D. A.; MACHADO, M. A. Molecular basis of *Citrus sunki* susceptibility and *Poncirus trifoliata* resistance upon *Phytophthora parasitica* attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 3, p. 386-398, 2018.

DANÓS, E.; BERGER, R. D.; STALL, R. E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology**, v. 74, p. 904-908, 1984.

DEL BOSCO, S. F.; ABBATE, L.; MERCATI, F.; NAPOLI, E.; RUBERTO, G. Essential oils in citrus. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 211-223.

DENG, Z.; MA, X. Genetic basis of resistance to *Citrus* canker disease. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 259-279.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 48-74, 2011.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1119-1128, 2009.

DOLEZZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.

EBRAHIMZADEH, H.; SOLTANLOO, H.; SHARIATPANAHI, M. E.; ESKANDARI, A.; RAMEZANPOUR, S. S. Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, p. 407-417, 2018.

FERREIRA, F. R.; SANTOS, I. R. I.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S. Recursos genéticos. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.;

SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 47-60.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUZZO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 21-43.

FORNER-GINER, M. A.; CONTINELLA, A.; GROSSER, J. W. Citrus rootstock breeding and selection. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 49-74.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. **Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2010. 56p. (EMBRAPA Cerrados. Documentos, 283).

FROST, H. B. Tetraploid in citrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 11, p. 535-537, 1925.

GERMANÀ, M. A. Doubled haploid production in fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 131-146, 2006.

GERMANÀ, M. A. Haploids and doubled haploids in fruit trees. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. Heidelberg: Springer, 2009. p. 241-263.

GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid production and regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 181-187, 2003.

GERMANÀ, M. A.; WANG, Y. Y.; BARBAGALLO, M. G.; IANNOLINO, G.; CRESCIMANNO, F. G. Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, p. 473-480, 1994.

GRAUDA, D.; LEPSE, N.; STRAZDIŅA, V.; KOKINA, I.; LAPIŅA, L.; MIKELSONE, A.; ĻUBINSKIS, L.; RASHAL, I. Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding. **Agronomy Research**, v. 8, n. 3, p. 545-552, 2010.

GUEYE, T.; NDIR, K. N. In vitro production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material. **Scientific Research and Essays**, v. 5, n. 7, p. 709-713, 2010.

HOOGHVORST, I.; RAMOS-FUENTES, E.; LÓPEZ-CRISTOFANNINI, C.; ORTEGA, M.; VIDAL, R.; SERRAT, X.; NOGUÉS, S. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 2, p. 205-215, 2018.

HUSSAIN, S.; CURK, F.; ANJUM, M. A.; PAILLY, O.; TISON, G. Performance evaluation of common clementine on various citrus rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 278-282, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Série histórica da estimativa anual da área plantada, área colhida, produção e rendimento**

médio dos produtos das lavouras. 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>>. Acesso em 18/12/2020.

INYAMA, C. N.; OSUOHA, V. U. N.; MBAGWU, F. N.; DURU, C. M. Systematic Significance of Pollen Morphology of Citrus (Rutaceae) from Owerri. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 191, p. 2167-0412.10001, 2015.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de órgãos reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 115-129, 2010.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** Artmed Editora, Porto Alegre, RS, 2009. 612 p.

KALARIYA, M. V.; PRAJAPATI, R. P.; CHAVDA, J. R. Pharmacological potential of *Citrus medica*: a review. **Pharma Science Monitor**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2019.

LO PIERO, A. R. Abiotic stress resistance. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome.** Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 225-243.

MAHDI, E. F. M.; AMAN, A. M. A. E. Morphological characterization of lime (*Citrus aurantifolia* L.) genotypes grown at Shambat. **II. Floral and fruit characterization.** **University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences**, v. 25, n. 2, p. 224-239, 2017.

MEDINA, D. M.; PRADO, O. T.; MENDES, A. J. T.; ROESSING, C. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem sementes. **Bragantia**, v. 17, n. único, p. 81-100, 1958.

MILANI, M.; CARVALHO, J. M. C. **Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas**. Campina Grande> EMBRAPA Algodão, 2005. 26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 145).

MILES, G. P.; STOVER, E.; RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F. Apparent tolerance to huanglongbing in citrus and citrus-related germplasm. **HortScience**, v. 52, p. 31-39, 2017.

NAIK, N.; ROUT, P.; UMAKANTA, N.; VERMA, R. L.; KATARA, J. L.; SAHOO, K. K.; SINGH, O. N.; SAMANTARAY, S. Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 679-689, 2017.

NOORI, S. A. S.; NOROUZI, M.; KARIMZADEH, G.; SHIRKOOL, K.; NIAZIAN, M. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 543-551, 2017.

OLLITRAULT, P.; GERMANÀ, M. A.; FROELICHER, Y.; CUENCA, J.; ALEZA, P.; MORILLON, R.; GROSSER, J. W.; GUO, W. Ploidy manipulation for citrus breeding, genetics, and genomics. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 75-105.

OUSTRIC, J.; LOURKISTI, R.; HERBETTE, S.; MORILLON, R.; PAOLACCI, G.; GONZALEZ, N.; BERTI, I.; SANTINI, J. Effect of propagation method and ploidy level

of various rootstocks on the response of the common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) to a mild water deficit. **Agriculture**, v. 10, n. 8, p. 321, 2020.

PALERMO, F. H.; DE NICOLAI, J.; SEIXAS, D. P.; DE MELO SILVA, S. C.; RODRIGUES, T. M. Distribuição, morfologia e histoquímica do sistema secretor em raízes de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Holos Environment**, v. 17, n. 1, 2017.

PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; SOARES FILHO, W. dos S. Cultivares copa. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 293-319.

PEÑALOZA, A. D. P. S.; POZZOBON, M. T. Manipulação de ploidia e outros aspectos citogenéticos relevantes para o pré-melhoramento de plantas. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Pré-melhoramento de plantas: Estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 39-58.

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PIRANI, J. R.; EL OTTRA, J. H. L.; MENEZES, N. L. Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea* Aubl. e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 301-318, 2010.

RAVEH, E.; GOLDENBERG, L.; PORAT, R.; CARMÍ, N.; GENTILE, A.; LA MALFA, ST. Conventional breeding of cultivated *Citrus* varieties. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 33-48.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2 n. 3/4, p. 159-167, 2004.

SANTANA, L. G. L.; SOUZA, E. S.; PASSOS, O. S.; GESTEIRA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; SOARES FILHO, W. dos S. Vigor and mortality of citrus progenies with potential use as rootstocks. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 4, p. 339-345, 2018.

SANTOS, A. R. A. **Pré-melhoramento genético de citros para fins ornamentais**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SCHÄFER, G.; PANZENHAGEN, N. V.; SARTORI, I. A.; ACHWARTZ, S. F.; KOLLER, O. C. Produção e desenvolvimento da tangerineira-'Montenegrina' propagada por enxertia e estaquia, no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 668-672, 2001.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 4, p. 675-685, 2005.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SIMÕES, F. **Melhoramento de trigo na era da genômica**. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. Dossier técnico, 2018. 3p.

SOARES FILHO, W. dos S. Variabilidade genética e melhoramento dos citros. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Não paginado.

SOARES FILHO, W. dos S.; SOUZA, F. V. D.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S.; CASTELLEN, M. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. *Citrus* e gêneros afins: Potencial de exploração no melhoramento genético dos citros, in: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.) **Pré-melhoramento de plantas: Estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 401-412.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 175-184, 2003.

ŠVÉCAROVÁ, M.; NAVRÁTILOVÁ, B.; HAŠLER, P.; ONDŘEJ, V. Artificial induction of tetraploidy in *Humulus lupulus* L. using oryzalin. **Acta Agrobotanica**, v. 72, n. 2, p. 1-10, 2019.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P. Performance of 'Okitsu' satsuma mandarin on nine rootstocks. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 6, p. 422-427, 2013.

TIAGO, P. V.; LAROCCA, D.; SILVA, I. V. D.; CARPEJANI, A. A.; TIAGO, A. V.; DARDENGO, J. D. F. E.; ROSSI, A. A. B. Caracterização morfoanatômica, fitoquímica e histoquímica de *Hymenaea courbaril* (Leguminosae), ocorrente na Amazônia Meridional. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

TUZCU, Ö.; ÇINAR, A.; GÖKSEDEF, M. O.; ÖZSAN, M.; BIÇICI, M. Resistance of citrus rootstocks to *Phytophthora citrophthora* during winter dormancy. **Plant Disease**, v. 68, p.502-505, 1984.

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus**: world markets and trade. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov>. Acesso em: 13 set. 2020.

VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of *Citrus* protoplast. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forest**. v. 8: Plant protoplast and genetic engineering I. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p. 147-159.

WEBBER, H. J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v. 1, p. 1-39.

WEI, L.; XIANG, X. G.; WANG, Y. Z.; LI, Z. Y. Phylogenetic relationships and evolution of the androecia in Ruteae (Rutaceae). **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137190, 2015.

ZHONG, G.; NICOLOSI, E. Citrus origin, diffusion, and economic importance. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 5-22.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.

ARTIGO 1

INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE ANTERAS DE CITROS

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Revista Ciência Rural

Indução e multiplicação de calos a partir de anteras de citros

Induction and multiplication of calluses from citrus anthers

RESUMO: Avanços nos programas de melhoramento genético de citros podem ser alcançados mediante a obtenção de indivíduos haploides por meio do cultivo de anteras. Os haploides facilitam a análise genética do material ao eliminar a complexidade do estado heterozigoto, permitindo, dessa forma, uma economia de vários anos de trabalho ao aumentar a eficiência da seleção. Porém, esta técnica não tem possibilitado muitos resultados quando aplicada a espécies de *Citrus* e gêneros afins. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de ajustar protocolos para a obtenção de calos em diferentes espécies de *Citrus* e em uma espécie de *Poncirus*. O material vegetativo utilizado foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, sendo o trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos dessa Instituição. Foram utilizados quatro meios de cultura na fase de indução de calos, sendo cada meio de cultura um fator isolado e aplicado para cada um dos oito genótipos estudados, gerando 32 experimentos. Dentre os genótipos, diferentes experimentos foram originados, tendo em vista a diferença de tamanho dos botões florais. Apenas as anteras extraídas dos botões florais do genótipo *Citrus medica* L. foram responsivas aos tratamentos utilizados na fase de indução. Assim, apenas essa espécie foi submetida à fase de multiplicação de calos, onde dois experimentos foram executados envolvendo dois meios de cultura. Os demais genótipos permanecem sendo estudados para a promoção de ajustes de protocolos que permitam a continuidade dos estudos visando a indução de calos para uma posterior regeneração de plantas.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos, Calogênese, Haploides

ABSTRACT: Advances in citrus breeding programs can be achieved by obtaining haploid individuals through the cultivation of anthers. Haploids facilitate the genetic analysis of the material, eliminates the complexity of the heterozygous state and allows savings of several years of work by simplifying and increasing selection efficiency. However, this technique has not allowed many results when applied to *Citrus* species and related genera. Thus, the objective of this work was to adjust protocols for obtaining calluses in different species of *Citrus* and in a species of *Poncirus*. The vegetative material used was collected at the Active Bank of Citrus Germplasm of Embrapa Cassava and Fruits, and the work was developed at the Tissue Culture Laboratory of that institution. Four culture media were used in the callus induction phase, each culture medium being an isolated and applied factor for each of the eight genotypes studied, generating 32 experiments. Among the genotypes, different experiments were originated, in view of difference in size of flower buds. Only the anthers extracted from buds of the genotype *C. medica* L. were responsive to the treatments used in the induction phase. Thus, only this species was subjected to the callus multiplication phase, where two experiments were carried out involving two culture media. The other genotypes are still being studied in order to promote adjustments to the protocols that allow the continuity of studies aiming at the induction of calluses for later plant regeneration.

Key words: Tissue Culture, Callogenesis, Haploids

INTRODUÇÃO

Os citros (*Citrus* L. e gêneros afins) estão entre as culturas mais importantes a nível mundial. No ciclo 2019-2020, a produção de frutos no Brasil ultrapassou a marca de 15,6 milhões de toneladas, sendo o Brasil o primeiro produtor mundial, seguido pela China e União Europeia (USDA, 2020).

Mesmo com a diversificação de cultivo de plantas cítricas, a variabilidade genética dos citros, especialmente do gênero *Citrus*, vem diminuindo nos pomares comerciais ao longo dos anos, principalmente devido ao desuso de variedades locais e de parentes silvestres (FERREIRA et al., 2013).

Apesar da estreita base genética (ALMEIDA & PASSOS, 2013), o gênero *Citrus* reúne importante variabilidade. Essa variabilidade é passível de ser explorada na obtenção de novas cultivares, principalmente porta-enxertos adaptados a distintas condições ambientais (SANTANA et al., 2018).

Porém, o melhoramento genético clássico pode levar décadas para a obtenção de uma planta de interesse comercial, com capacidade de reprodução e aplicação em larga escala na agricultura. Dessa forma, a obtenção de plantas haploides é uma alternativa viável na redução do tempo de geração de variedades, por possibilitar maior estabilidade e previsibilidade de resultados em diversos cruzamentos. Quando obtidas, essas plantas promovem o encurtamento do processo de desenvolvimento de linhagens puras, podendo facilitar a obtenção de indivíduos superiores (FERREIRA et al., 1998).

Plantas haploides podem ser obtidas por diversas vias. A mais acessível e promissora é a androgênica, baseada no cultivo de anteras. Estudos envolvendo a

obtenção de plantas haploides têm sido relatados para diversas culturas, como o trigo (LANTOS et al., 2018) e o milho (PIERRE et al., 2011). Porém, de forma geral, o desenvolvimento da embriogênese gamética é difícil, principalmente em razão dos diversos fatores envolvidos no aumento das taxas de indução de haploidia e de sobrevivência dessas plantas quando transferidas para condições ex vitro (GERMANÀ, 2006). Além disso, em espécies recalcitrantes, como os citros, é necessário um maior esforço para o ajuste de protocolos indutores da androgênese.

Nesse contexto, além dos protocolos de ajuste na obtenção de calos, para o alcance de um método reprodutível de indução de calogênese a partir de anteras, é necessário o entendimento e conhecimento dos estádios de desenvolvimento dos tipos celulares encontrados nos diferentes tamanhos de botões florais das espécies estudadas (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2005).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi ajustar protocolos para a obtenção de calos a partir de anteras em diferentes espécies de *Citrus* e em uma espécie de *Poncirus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução de calos

Botões florais de diferentes tamanhos de oito genótipos, compreendendo os gêneros *Citrus* (Linnaeus) e *Poncirus* (Rafinesque), toranjeira [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.], *C. webberi* Wester, tangerineiras 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco), mexeriqueira (*C. deliciosa* Ten.), cidreira (*C. medica* L.) e trifoliata 'Benecke' [*Poncirus trifoliata* (L.)

Raf.] (Figura 1), foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Esses genótipos foram escolhidos devido aos seus elevados níveis de homozigose.

Os genótipos originaram diferentes experimentos, tendo em vista a diferença de tamanho dos botões florais (Figura 1). Para cada experimento, os botões foram medidos tanto em comprimento como no diâmetro, com o auxílio de paquímetro digital, e separados em grupos, de acordo com seus tamanhos médios, que variaram para cada genótipo estudado (Tabela 1). Após as medições e a separação em grupos de acordo com o tamanho, os botões florais dos diferentes genótipos foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e, em câmara de fluxo laminar, submetidos a um processo de desinfestação, sendo colocados em álcool 70% por 3 minutos e em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% com 2 gotas de Tween 20[®] por 20 minutos, seguindo-se de três lavagens com água de osmose reversa autoclavada. A partir daí, uma antera de cada conjunto de botões foi separada, colocada sobre uma lâmina de vidro, corada com carmim acético 2%, macerada com o auxílio de pinça histológica e agulha, e levada ao microscópio estereoscópio para uma pré-visualização dos estádios de desenvolvimento celular.

Após a identificação celular, as demais anteras foram retiradas dos botões florais e inseridas em placas de Petri de 60 mm x 15 mm, contendo os meios de cultura N6 (CHU, 1978), MS modificado e proposto por GERMANÀ & CHIANCONE (2003), MS modificado e elaborado por CARDOSO et al. (2014) e o MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969), conforme descrição na Tabela 2. Em cada placa foram inseridas 13 anteras, de forma equidistante para um melhor desenvolvimento, e logo após procedeu-se sua incubação em sala de crescimento na total ausência de luz, em

temperatura de $27^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 15 dias. Após esse período, as placas foram transferidas para sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, com a mesma temperatura anterior. Para cada genótipo, em separado, foram montados experimentos com delineamento inteiramente ao acaso envolvendo um tipo de meio de cultura e os diferentes estádios de desenvolvimento dos botões florais, resultando, para cada espécie, 32 experimentos.

Os botões florais foram classificados conforme o tamanho, gerando, de acordo com a espécie, 6 a 8 grupos. Cada um desses grupos foi considerado como um tratamento (Figura 1), composto por cinco repetições, cada uma representada por uma placa de Petri contendo 13 anteras. Todas as placas dos diversos experimentos foram avaliadas bimensalmente em relação à oxidação das anteras e número de anteras com calos. Simultaneamente à introdução das anteras em placas de Petri, cada lâmina correspondente aos diferentes estádios dos botões florais foi fotografada em microscópio com câmera acoplada para verificar a referência dos grupos celulares. Estes dados poderão ser utilizados para uma futura correlação do aparecimento das plantas haploides com o estágio de desenvolvimento do botão floral e tipo celular correspondente.

Multiplicação de calos

Após 60 dias do início do desenvolvimento de calogênese, as anteras de *Citrus medica*, único genótipo responsivo, foram transferidas para novas formulações de meios de cultura, objetivando a proliferação dos calos. Como os calos precisavam estar em quantidade e tamanho suficientes para a mudança da fase, foi realizada uma análise daqueles viáveis, em relação à quantidade, o tamanho e o peso. Os calos com

tamanho menor que 2 mm foram colocados nos mesmos meios de cultura da fase de indução, para uma análise posterior de viabilidade. Os demais, com tamanho igual ou superior a 2 mm, foram pesados e transferidos para dois diferentes meios de cultura, separadamente: o primeiro, o MS modificado, baseado nas metodologias de CARDOSO et al. (2014) e GERMANÀ & CHIANCONE (2003), e o segundo, o MS modificado e utilizado para a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004) (Tabela 3), gerando dessa forma dois experimentos. Esses consistiam em uma combinação entre os calos obtidos a partir das anteras provenientes dos diferentes tamanhos de botões florais (Figura 1A) e os meios de cultura utilizados (Tabela 3), sendo um meio de cultura para cada experimento.

Para inserção nos meios de multiplicação, os calos provenientes da fase de indução com tamanho superior a 4 mm foram ainda seccionados em diversas partes com aproximadamente 2 mm de diâmetro, como forma de estímulo à proliferação. Da mesma forma que na primeira, nessa segunda etapa a quantidade de 13 calos por placa foi mantida. Essa segunda etapa se prolongou até a obtenção do número mínimo de 90 calos para os tratamentos estudados. Foram realizados subcultivos aos 60, 120, 180 e 240 dias, computando-se os dados das variáveis peso dos calos (PC, em g), diâmetro dos calos (DC, em mm) e quantidades de divisões em segmentos de aproximadamente 2 mm por calo (QDC). O nível de oxidação dos calos também foi avaliado, em termos percentuais.

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância e para as médias dos tratamentos construídos gráficos de box-plot para avaliação empírica dos

resultados. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2019), utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de calos

Dentre os oito genótipos utilizados no estudo, apenas a espécie *Citrus medica* foi responsiva em relação à formação de calos. As anteras dos demais genótipos oxidaram e não sobreviveram aos tratamentos empregados. LANTOS et al. (2018) citam que pode ocorrer uma dependência de genótipo quando a técnica de cultura de anteras é aplicada na androgênese, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Um estudo envolvendo anatomia das anteras aponta que a espécie *C. medica* possui papilas em sua epiderme, ao contrário dos outros genótipos de citros analisados. Essas papilas podem ser responsáveis por facilitar o processo de absorção dos reagentes utilizados na fase de indução de calos.

Inicialmente foram definidos oito tratamentos de acordo com os diferentes agrupamentos de botões florais (Figura 1A) para o genótipo *C. medica*. Não foi observada diferenciação celular nas anteras extraídas dos botões florais do Tratamento 1, dessa forma, não houve competência para resposta aos estímulos químicos empregados pelos meios de cultura para a indução de calos, motivo pelo qual foi descartado. Assim, são apresentados os resultados dos Tratamentos que vão desde o 2 ao 8.

Na microscopia puderam ser identificados os tipos celulares existentes nos diferentes grupos (células-mãe do andrósporo, tétrades, micrósporos e pólen) nas

espécies estudadas (Tabela 1 e Figura 2). Para *C. medica*, especificamente, a análise de microscopia mostrou que o Tratamento 1 ainda não tinha células diferenciadas; os Tratamentos 2 e 3 continham apenas células-mãe do andrósporo (Figura 2A); o Tratamento 4 apresentava células-mãe do andrósporo, com prevalência de tétrades (Figuras 2A e B); os Tratamentos 5 e 6 mostravam apenas micrósporos (Figura 2C); o Tratamento 7 continha micrósporos, porém com prevalência de grãos de pólen (Figuras 2C e D); e o Tratamento 8 apresentava apenas grãos de pólen (Figura 2D).

O estudo das anteras e dos tipos celulares presentes é de fundamental importância para o conhecimento das espécies, pois torna possível reconhecer os diferentes estádios de desenvolvimento celulares a partir dos distintos tamanhos e desenvolvimento dos botões florais (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2005).

O pollenkit é um material de revestimento do pólen produzido pelo tapete da antera. Neste estudo foi observado tanto em micrósporos quanto em grãos de pólen (Figuras 2C e 2D), é um líquido viscoso que tem como principais funções: a) facilitar a dispersão e a adesão dos grãos de pólen (LIN et al., 2013); b) reter os grãos de pólen dentro da antera até o momento adequado para a dispersão; c) manter os grãos de pólen juntos durante a dispersão; d) evitar autopolinização e; e) facilitar a adesão ao estigma. A substância se apresenta como uma camada de densidade de elétrons variáveis, que é depositada nos grãos de pólen e pode ser ou não homogênea. Além disso, é formada por diversos compostos, a depender da espécie estudada (PACINI & HESSE, 2005). Devido a sua composição lipídica (PACINI & HESSE, 2005), no entanto, o processo de indução de calos pode ser afetado negativamente por essa substância, pois os micrósporos e grãos de pólen acabam revestidos com uma

camada hidrofóbica que impede a penetração dos reagentes necessários ao processo de desdiferenciação celular.

Em relação aos diferentes meios de cultura empregados para a indução da calogênese, somente o proposto por CARDOSO et al. (2014) promoveu a formação de calos viáveis para a continuidade do estudo. Os demais meios de cultura não foram responsivos quanto à formação e posterior proliferação dos calos. Provavelmente, a combinação específica de reguladores de crescimento, associada com maiores concentrações de vitaminas e outros suplementos no meio de cultura citado, foi responsável pelo resultado da formação de calos.

Reguladores de crescimento têm sido bastante utilizados na cultura de tecidos visando à indução do processo de calogênese, inclusive para plantas arbóreas (PEREIRA et al., 2013). O meio de cultura básico é geralmente suplementado com uma combinação de auxina, citocinina e giberelina, em concentrações as mais variadas possíveis. Existem diversas metodologias na literatura que apontam diferentes combinações de reguladores no preparo de meios com o objetivo de induzir a formação de calos. Alguns autores utilizaram citocininas separadamente (ENDO et al., 2002), outros empregaram apenas auxinas (SIWACH et al., 2011; SUNDRAM et al., 2012), enquanto a maioria deles optou pela combinação de auxinas e citocininas (AFSHARI et al., 2011; CHEVALA et al., 2016; GEROLINO et al., 2015; LIMA et al., 2008; ROY et al., 2008).

Multiplicação de calos

Quando se comparou os dois meios de cultura empregados para a promoção da multiplicação dos calos, somente o proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004) se mostrou viável ao longo dos subcultivos (Figura 3). O meio MS modificado

e proposto por GERMANÀ & CHIANCONE (2003) e CARDOSO et al. (2014) foi eficiente apenas no primeiro ciclo de subcultivos. A partir do segundo ciclo não houve mais promoção da proliferação dos calos, os quais, por sua vez, iniciaram um processo de oxidação e se tornaram inviáveis. O processo de multiplicação satisfatório do primeiro subcultivo ocorreu provavelmente devido ao resíduo ao efeito residual dos reguladores de crescimento presentes no meio de introdução de anteras. A partir do momento que essa fonte foi interrompida e o efeito diminuiu, a viabilidade tendeu a desaparecer. Este resultado vai ao encontro do obtido por ZHANG et al. (2019), que observaram um efeito residual do Paclobutrazol® de até 6 meses após aplicação em plantas de *Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker Gawl.

Na Figura 4 podem ser observados os números absolutos de anteras e de segmentos de calos de *C. medica* em relação à introdução e às avaliações realizadas aos 60, 120, 180 e 240 dias após subcultivados.

Os calos oriundos dos Tratamentos de 2 a 5 foram os mais responsivos ao longo dos subcultivos, aumentando progressivamente o crescimento durante as avaliações. O destaque maior relacionou-se ao Tratamento 2, onde o aumento no número de segmentos de calos foi o mais expressivo. Por meio dessas análises, foi possível realizar o descarte dos Tratamentos 6, 7 e 8 após a 4ª avaliação, tendo em vista que não houve desenvolvimento de calos durante os subcultivos.

A Tabela 4 mostra os percentuais de desenvolvimento no número de segmentos de calos a cada avaliação, em comparação com a anterior. Os Tratamentos 6, 7 e 8 mostraram pouco ou nenhum desenvolvimento a partir da avaliação feita aos 120 dias, enquanto em relação aos demais destaca-se o aumento de 260,77% entre o 3º e 4º subcultivos do Tratamento 2. Observou-se que, quanto

mais desenvolvidas as células das anteras menor a quantidade de calos gerados a cada subcultivo. Isso provavelmente ocorreu devido a diferenciação dos tecidos.

Foram identificados diferentes tons de cores nos calos gerados nos tratamentos envolvendo o genótipo *C. medica* (Figura 5). Os calos possuíam uma coloração que variou de amarronzada (oxidados) a esverdeada. Os calos de coloração amarronzada e os mais claros possuíam uma natureza mais friável, enquanto os calos mais esverdeados possuíam uma textura mais endurecida e compacta. As diferentes tonalidades de calos foram encontradas em todos os tratamentos empregados.

Este resultado é semelhante ao encontrado por EL KBIACH et al. (2017), que, ao trabalharem com *Quercus suber* L., observaram a formação de calos marrons com aspecto friável e de calos esverdeados com natureza mais endurecida, a depender da condição de cultivo e dos reguladores de crescimento utilizados. Em contrapartida, HUSSAIN et al. (2016), trabalhando com indução de calos a partir de tecidos nucelares de *Citrus reticulata* L., encontraram calos de coloração creme, com textura compactada.

Na Figura 6 observam-se os gráficos relativos aos percentuais de oxidação dos calos de *C. medica* na segunda (Figura 6A), terceira (Figura 6B) e quarta avaliações (Figura 6C), durante os subcultivos efetuados aos 120, 180 e 240 dias depois da passagem para a fase de proliferação. Como não foi constatada a ocorrência de oxidação na primeira avaliação (60 dias), não foi gerado um gráfico.

Verificou-se que ao longo dos subcultivos houve, de modo geral, certa redução dos percentuais de oxidação dos calos nos Tratamentos de 2 a 5. Em contrapartida, os Tratamentos de 5 a 8 atingiram 100% de oxidação a partir da terceira avaliação.

No processo de indução de calos, devido aos subcultivos e à manipulação, pode ocorrer o escurecimento dos tecidos (PEREIRA et al., 2013). Esse processo de oxidação pode levar à morte das células (ARUNYANART & CHAITRAYAGUN, 2005; LEDO et al., 2018) devido à liberação de fenóis pelos próprios explantes, o que pode ser evitado com a adição de agentes antioxidantes nos meios de cultura (SINGH et al., 2011).

Quanto mais diferenciados, maior a oxidação gerada para a desdiferenciação dos tecidos em calos, o que acaba comprometendo a viabilidade celular. Esse resultado é semelhante ao encontrado por SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ (2005), que ao trabalharem com diferentes tamanhos de anteras de distintos estádios de desenvolvimento de botões florais de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), encontraram os melhores resultados de indução de calos para as fases de meiócitos e tétrades. Além disso, quanto mais diferenciados, maior a presença do conteúdo de pollenkit presente nos tecidos. O pollenkit confere uma camada lipídica ao tecido (PACINI & HESSE, 2005), impedindo a entrada dos reagentes presentes nos meios de cultura, causando dessa forma a oxidação e perda de viabilidade dos tecidos, por meio da oxidação.

A análise de variância para as variáveis peso dos calos (PC), diâmetro dos calos (DC) e quantidade de divisões por calo (QDC) está exposta na Tabela 5. De acordo com a análise apresentada, pode-se observar que as médias relativas às variáveis PC, DC e QDC aumentaram ao longo das avaliações, exceto para a variável QDC no segundo cultivo. Isso demonstra o amadurecimento dos calos ao longo dos subcultivos, indicando que o meio utilizado para sua multiplicação se mostrou adequado e responsivo. Pode ser observado ainda que os graus de liberdade (GL)

foram diferentes para uma das variáveis analisadas (QDC). Isso ocorreu devido ao fato de que nem todos os calos obtidos tinham tamanho suficiente para serem submetidos à série de divisões. Dessa forma, o número amostral se mostrou menor, interferindo na característica estudada.

Em relação aos coeficientes de variação (CV), houve uma diversidade entre e dentro das avaliações, sendo os maiores e menores valores apresentados, respectivamente, para as variáveis PC e DC. Esses CVs variaram entre 26,74% e 113,49%, respectivamente nas variáveis DC e PC na avaliação efetuada aos 240 dias. O único valor de F significativo a 5% de probabilidade encontrado foi o relativo à DC em sua 4ª avaliação.

Em cultura de tecidos, os CVs tendem a variar bastante, pois, apesar dos experimentos serem conduzidos em um ambiente controlado, existe o fator biológico que atua interferindo como fonte de variação. WERNER et al. (2012) citam que ainda não existem estudos adequados para as variáveis mensuradas em experimentos envolvendo cultura de tecidos de plantas e afirmam que a variabilidade genética, o genótipo trabalhado e as condições do local de incubação das amostras pode influenciar bastante o CV.

Para um melhor entendimento dos resultados alcançados, também foram gerados gráficos do tipo box-plot para as variáveis estudadas ao longo das diferentes avaliações (Figura 7). Os dados gerados seguiram três tipos de assimetria : positiva, negativa e distribuição simétrica (normalidade). Os dados contendo assimetria negativa foram, em sua maioria, observados no Tratamento 2. Essa disposição dos dados indica que os valores tenderam a ser mais altos do que os esperados para o Tratamento empregado. Nos demais Tratamentos houve uma predisposição para uma

assimetria positiva, mostrando, ao contrário do observado no Tratamento 2, que os valores tenderam a ser mais baixos do que o esperado para os Tratamentos empregados. Poucos pontos distantes das médias foram identificados, o que indica uma homogeneidade das amostras analisadas. Esses resultados divergem dos encontrados por Digonzelli et al. (2005), que encontraram vários valores distantes da mediana nos gráficos box-plot gerados a partir de um estudo de propagação in vitro de cana-de-açúcar.

CONCLUSÃO

Entre os oito genótipos estudados, apenas o *C. medica* foi responsivo aos tratamentos utilizados para a indução de calos por meio do cultivo in vitro de anteras. Apenas os meios de cultura propostos por CARDOSO et al. (2014) e SANGEETHA & RAMASWAMY (2004) foram adequados para as fases de indução e multiplicação de calos, respectivamente. Quanto menor o grau de diferenciação dos grupos de botões floral utilizados como tratamento, com exceção daquele contendo células não diferenciadas, maior o desenvolvimento e a friabilidade dos calos gerados no estudo.

AGRADECIMENTOS

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses. As agências de fomento não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação dos dados, na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores contribuíram de forma igual à concepção e escrita do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

REFERENCES

AFSHARI, R. T. et al. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus L.*) genotypes. **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 2, p. 60-67, 2011. Available from: <https://www.pomics.com/tavakkol_4_2_2011_60_67.pdf>. Accessed: Dec. 18, 2019.

ALMEIDA, C. O. de; PASSOS, O. S. A citricultura brasileira: produção, mercado e perspectivas. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da. et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap. 14, p. 391-399.

ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae**, v. 105, n. 3, p. 411-420, 2005. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423805000592?via%3Dihub>>. Accessed: Dec. 3, 2019. doi: 10.1016/j.scienta.2005.01.034.

CARDOSO, J. C. et al. In vitro anther culture of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genotypes and of a *C. clementina* x *C. sinensis* 'Hamlin' hybrid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, p. 455-464, 2014. Available from: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11240-014-0456-x.pdf>>. Accessed: Dec. 3, 2019. doi: 10.1007/s11240-014-0456-x.

CHEVALA, N. P. K. et al. In vitro accumulation of polyphenols in tea callus derived from anther. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, Suppl 4, p. S400-S406, 2016. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5068115/>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.4103/0973-1296.191442.

CHU, C. The N6 medium and its applications to another culture of cereal crops. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, 1978, Peking, China. **Anais...** Peking: Science Press, 1978. p. 43-50.

DIGONZELLI, P. et al. Use of PPM (Plant Preservative Mixture) to control bacterial contaminants in the multiplication in vitro of sugarcane. **Revista de la Facultad Agronomía**, v. 22, p. 20-29, 2005. Available from: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000100003&lng=pt&tlng=es>. Accessed: Dec. 13, 2019.

ENDO, T. et al. Modification of limonoid metabolism in suspension cell culture of *Citrus*. **Plant Biotechnology**, v. 19, n.5, p. 397-403, 2002. Available from:

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/19/5/19_5_397/_pdf>.

Accessed: Dec. 18, 2019.

EL KBIACH, M. L. et al. Callogenesis of cork oak (*Quercus suber* L.) through in vitro culture of nodes and internodes. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 1801-1819, 2017. Available from:

<<https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=77448>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.4236/ajps.2017.88123.

FERREIRA, F. R. et al. Recursos genéticos. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap. 3, p. 47-60.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A.. ExpDes: Experimental Designs. 2018. Available from: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/index.htm>>. Accessed: Jun. 05, 2019.

FERREIRA, M. E. et al. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 21-43.

GERMANÀ, M. A. Doubled haploid production in fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 131-146, 2006. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-006-9088-0>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1007/s11240-006-9088-0.

GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid production and regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 181-187, 2003. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-003-0669-7>>. Accessed: Nov. 6, 2019. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1007/s00299-003-0669-7.

GEROLINO, E. F. et al. Evaluation of limonoid production in suspension cell culture of *Citrus sinensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 455-461, 2015. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X1500099X?via%3Dihub>>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1016/j.bjp.2015.05.008.

HUSSAIN, M. et al. Plantlets regeneration via somatic embryogenesis from the nucellus tissues of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* L.). **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, n. 6, p. 798-805, 2016. Available from: <https://www.scirp.org/pdf/AJPS_2016042017091834.pdf>. Accessed: Oct. 03, 2020. doi: 10.4236/ajps.2016.76074.

LANTOS, C. et al. Induction of in vitro androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 3, p. 385-393, 2018. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-018-1391-z>>. Accessed: Oct. 03, 2020. doi: 10.1007/s11240-018-1391-z.

LEDO, A. da S. et al. Antioxidants and phenolic secretion in sugarcane genotypes shoots culture. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 5, p. 79-91, 2018. Available from: < <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/73469>>. Accessed: Jan. 10, 2020. doi: 10.5539/jas.v10n5p79.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008. Available from: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542008000100002>. Accessed: Dec. 18, 2019. doi: 10.1590/S1413-70542008000100002.

LIN, H.; GOMEZ, I., MEREDITH, J. C. Pollenkitt wetting mechanism enables specie-specific tunable pollen adhesion. **Langmuir**, v. 29, n. 9, p. 3012-3023, 2013. Available from: <http://meredithgroup.gatech.edu/sites/default/files/images/pk_wetting_mechanism_enables_langmuir.pdf>. Accessed: Dec. 16, 2019. doi: 10.1021/la305144z.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: CHAPMAN, H. D. (Ed.). Proceedings of the first international citrus symposium, 1969, Riverside. **Anais...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1161.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkit – its composition, forms and functions. **Flora**, v. 200, p. 399-451, 2005. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367253005000642?via%3Dihub>>. Accessed: Dec. 16, 2019. doi: 10.1016/j.flora.2005.02.006.

PEREIRA, R. P. W. et al. Callogenesis in stem explants of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) showing resilience in oxide calluses. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 3, p. 407-416, 2013. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-80872013000300014>. Accessed: Jan. 9, 2019. doi: 10.4322/floram.2013.010.

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011. Available from: <<http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/article/view/348>>. Accessed: Oct. 03, 2020. doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v10n1p1-16.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019. Available from: <<https://www.R-project.org/>>.

ROY, A. et al. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2209-2211, 2008. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58953/47268>. Accessed: Nov. 5, 2019.

SANGEETHA, G.; RAMASWAMY, N. M. Anther culture in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: VI International scientific meeting of the cassava biotechnology network,

2004, Cali, Colômbia. **Anais...** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2004. 194 p.

SANTANA, L. G. L. et al. Vigor and mortality of citrus progenies with potential use as rootstocks. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 4, p. 339-345, 2018. Available from: <<https://www.scielo.br/pdf/sa/v75n4/0103-9016-sa-75-04-0339.pdf>>. Accessed: Oct. 02, 2020. doi: 10.1590/1678-992x-2016-0455.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 4, p. 675-685, 2005. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-005-0071-x>>. Accessed: Oct. 02, 2020. doi: 10.1007/s11738-005-0071-x.

SINGH, H. P. et al. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. New Delhi: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB), 2011. 92 p.

SIWACH, P. et al. Effect of season, explants, growth regulators and sugar level on induction and long term maintenance of callus cultures of *Ficus religiosa* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 24, p. 4879-4886, 2011. Available from: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/94165/83565>>. Accessed: Dec. 16, 2019. doi: 10.5897/AJB10.2119

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus**: world markets and trade. Available from: <<https://www.fas.usda.gov>>. Accessed: Sep. 13, 2020.

SUNDRAM, T. C. M. et al. Optimization of culture condition for callus induction from shoot buds for establishment of rapid growing cell suspension cultures of Mango ginger (*Curcuma mangga*). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 7, p. 1139-1146, 2012. Available from: <http://www.cropj.com/sundram_6_7_2012_1139_1146.pdf>. Accessed: Nov. 19, 2019.

WERNER, E. T. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 27-36, 2012. Available from: <<http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/viewFile/61/18>>. Accessed: Jan. 16, 2020.

ZHANG, L. et al. Residue of paclobutrazol and its regulatory effects on the secondary metabolites of *Ophiopogon japonicas*. **Molecules**, v. 24, n. 3504, p. 1-17, 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6804066/>>. Accessed: Jan. 3, 2020. doi: 10.3390/molecules24193504.



Figura 1. Diferentes tratamentos em função dos tamanhos de botões florais selecionados para isolamento e introdução in vitro de anteras dos genótipos A. *Citrus medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Escalas: A-H: 1 cm.

Tabela 1. Comprimento médio, diâmetro médio e tipos celulares encontrados nos diferentes tratamentos provenientes dos diferentes estádios de desenvolvimento dos botões florais dos genótipos *Citrus medica* L., *C. webberi* Wester, *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. deliciosa* Ten., *C. reshni* hort. ex Tanaka, *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, *C. reticulata* Blanco e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

<i>Citrus medica</i> L.			
Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.5	2.5	Sem diferenciação celular
2	3.5	2.5	Células-mãe do andrósporo
3	4.0	4.0	Células-mãe do andrósporo
4	7.5	4.5	Células-mãe do andrósporo, com prevalência de tétrade
5	11.5	5.5	Micrósporos
6	13.0	6.0	Micrósporos
7	15.0	5.5	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
8	18.5	8.0	Grãos de pólen
<i>C. webberi</i> Wester			
Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.42	2.29	Tétrades
2	3.58	3.42	Tétrades
3	4.46	4.24	Micrósporos
4	5.08	4.41	Micrósporos
5	5.72	5.85	Micrósporos
6	6.28	6.46	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
7	7.87	6.40	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
8	10.16	7.20	Grãos de pólen
<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.			
Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.78	2.97	Sem diferenciação celular
2	3.97	4.49	Células-mãe do andrósporo
3	7.82	6.99	Micrósporos
4	11.19	8.09	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
5	11.37	8.59	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
6	16.05	9.66	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
7	21.76	10.59	Grãos de pólen
8	22.15	11.91	Grãos de pólen
<i>C. deliciosa</i> Ten.			

Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.01	2.04	Micrósporo
2	2.76	3.02	Micrósporo
3	3.88	3.56	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
4	4.35	4.00	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
5	5.78	4.01	Grãos de pólen
6	6.46	4.69	Grãos de pólen
7	8.31	4.44	Grãos de pólen
8	11.26	5.49	Grãos de pólen

C. reshni hort. ex Tanaka

Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.92	2.85	Micrósporo
2	3.57	3.65	Micrósporo
3	4.70	3.98	Micrósporo
4	5.47	4.02	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
5	6.92	4.83	Grãos de pólen
6	8.67	5.49	Grãos de pólen

C. sunki (Hayata) hort. ex Tanaka

Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	1.37	1.32	Células-mãe do andrósporo
2	2.13	2.24	Micrósporos
3	2.48	2.37	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
4	3.37	2.67	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
5	4.46	2.88	Grãos de pólen
6	5.60	3.41	Grãos de pólen

C. reticulata Blanco

Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.63	2.55	Tétrade
2	4.12	3.36	Micrósporos
3	5.26	3.89	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
4	6.72	4.58	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
5	8.04	5.11	Grãos de pólen
6	9.83	5.53	Grãos de pólen

Poncirus trifoliata (L.) Raf.

Tratamento	Comprimento médio (mm)	Diâmetro médio (mm)	Tipo celular
1	2.29	2.79	Sem diferenciação celular
2	2.81	3.64	Micrósporos
3	3.43	4.39	Micrósporos
4	4.31	5.49	Micrósporos (maioria) e grãos de pólen
5	4.06	6.97	Micrósporos, com prevalência de grãos de pólen
6	13.07	7.72	Grãos de pólen

Tabela 2. Composição dos meios de cultura N6, MS modificados e propostos por GERMANÀ & CHIANCONE (2003) e CARDOSO et al. (2014) e MT, visando a indução de calos em anteras de genótipos dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*.

Componentes (mg L ⁻¹)		Meios de cultura para indução de calos		
Macronutrientes	N6	Proposto por	Proposto por	MT
		Germanà & Chiancone (2003)	Cardoso et al. (2014)	
NH ₄ NO ₃	-	-	-	1650.0
KNO ₃	2830.0	2830.0	2830.0	1900.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	166.0	166.0	166.0	440.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	185.0	185.0	185.0	370.0
KH ₂ PO ₄	400.0	400.0	400.0	170.0
K ₂ HPO ₄	-	-	-	20.0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	37.3	37.3	37.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	463.0	463.0	463.0	-
Micronutrientes				
KI	0.8	0.8	0.8	0.830
H ₃ BO ₃	1.6	1.6	1.6	6.200
MnSO ₄ .4H ₂ O	3.3	3.3	3.3	16800.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.5	1.5	1.5	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	-	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	0.025
Vitaminas				
Thiamina-HCl	1.0	0.5	5.5	10.0
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	5.5	10.0
Ácido nicotínico	0.5	5.0	5.0	5.0
Glicina	-	2.0	4.0	2.0
Inositol	-	100.0	5100.0	100.0
Ácido fólico	-	0.5	0.5	-
Biotina	-	0.55	0.05	-
Reguladores de crescimento				
ANA	-	0.02	-	-
BAP	-	0.5	0.5	10
AG ₃	-	0.5	0.5	-
Cinetina	-	1.0	0.5	0.1
AIA	-	-	-	1
2,4-D	1.5	0.02	0.5	-
Zeatina	-	0.5	0.5	-
Thidiazuron	-	0.1	0.1	-
Outros suplementos				
Ácido ascórbico	-	500.0	500.0	-
Prolina	1381.5	-	-	-
Cisteína	78.8	-	-	-
Caseína	20.0	500.0	500.0	-

Glutamina	-	200.0	500.0	-
Serina	-	-	100.0	-
Sacarose	20000.0	-	-	25000.0
Ágar	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0
Lactose	-	18000.0	36000.0	-
Galactose	-	9000.0	18000.0	-
Água de coco	-	50.0	100.0	-
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

Tabela 3. Composição dos meios de cultura MS modificados e propostos por GERMANÀ & CHIANCONE (2003) e SANGEETHA & RAMASWAMY (2004), utilizados para a multiplicação de calos de *Citrus medica* L.

Componentes (mg L ⁻¹)	Meios de cultura para multiplicação de calos	
	Germanà & Chiancone (2003)	Sangeetha & Ramaswamy (2004)
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650.0	1650.0
KNO ₃	1900.0	1900.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.0	440.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0	170.0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	37.3
Micronutrientes		
KI	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.8	16.8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Vitaminas		
Thiamina-HCl	0.1	0.1
Piridoxina-HCl	0.5	0.5
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0
Inositol	100.0	100.0
Reguladores de crescimento		
ANA	0.02	-
BAP	-	1.0
AG ₃	-	1.0
Cinetina	-	0.5
2,4-D	-	2.0
Zeatina	-	0.5
Outros suplementos		
Sacarose	50000.0	30000.0
Ágar	8000.0	8000.0
pH	5.8	5.8

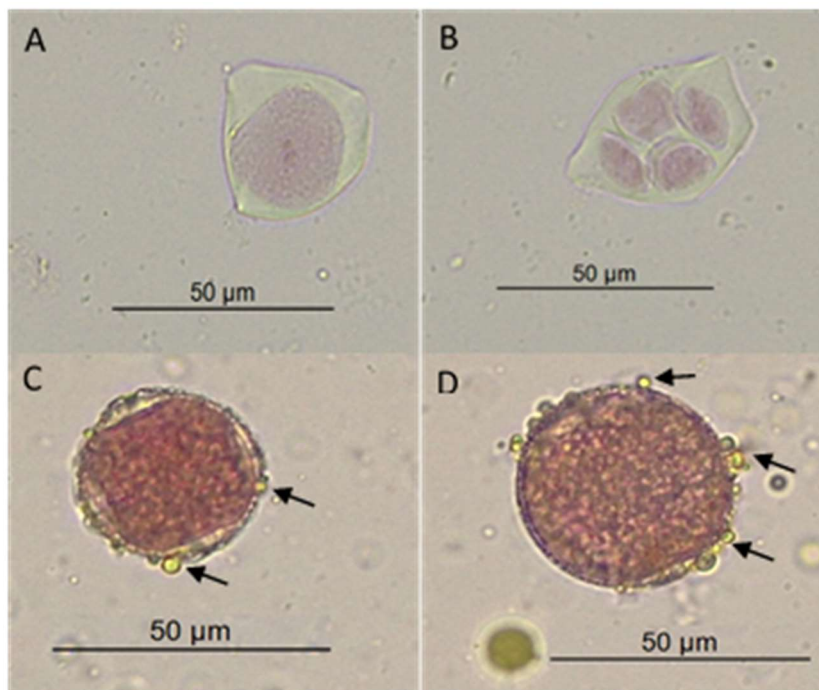


Figura 2. Tipos celulares encontrados nos diferentes estádios de desenvolvimento de 2 a 8 dos botões florais do genótipo *Citrus medica* L. A) Célula-mãe do andrósporo; B) Tétrade; C) Micrósporo; e D) Grão de pólen. Detalhe para o pollenkit nas Figuras C e D (setas).

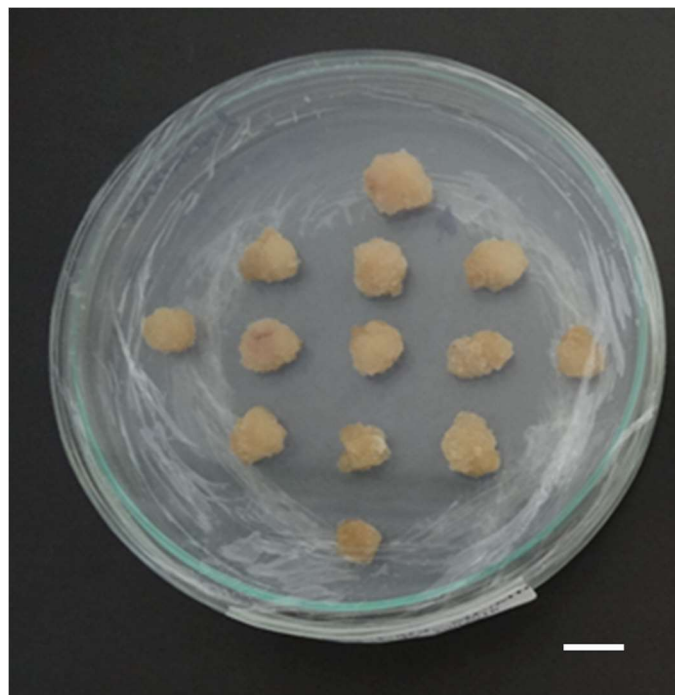


Figura 3. Calos friáveis e viáveis da espécie *Citrus medica* L., multiplicados no meio de cultura MS modificado e proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004). Escala: 1 cm.

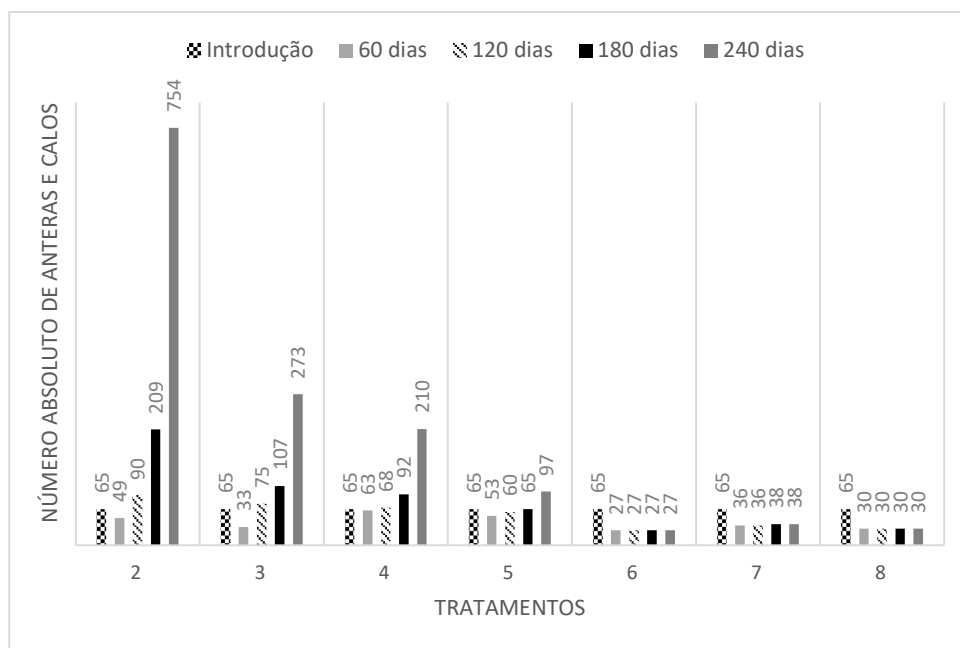


Figura 4. Número inicial de calos de *Citrus medica* L. e de segmentos com aproximadamente 2 mm de tamanho nos diferentes tratamentos após 60, 120, 180 e 240 dias da transferência para o meio de cultura proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004).

Tabela 4. Percentuais de desenvolvimento no número de segmentos de calos de *Citrus medica* L. a cada avaliação efetuada nos tratamentos envolvendo diferentes tamanhos de botões florais, nos subcultivos realizados aos 60, 120, 180 e 240 dias no meio de cultura proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004).

Tratamento	Avaliação (dias)			
	60	120	180	240
2	-24.62	83.67	132.22	260.77
3	-49.23	127.27	42.67	155.14
4	-3.08	7.94	35.29	128.26
5	-18.46	13.21	8.33	49.23
6	-58.46	0.00	0.00	0.00
7	-44.62	0.00	5.56	0.00
8	-53.85	0.00	0.00	0.00

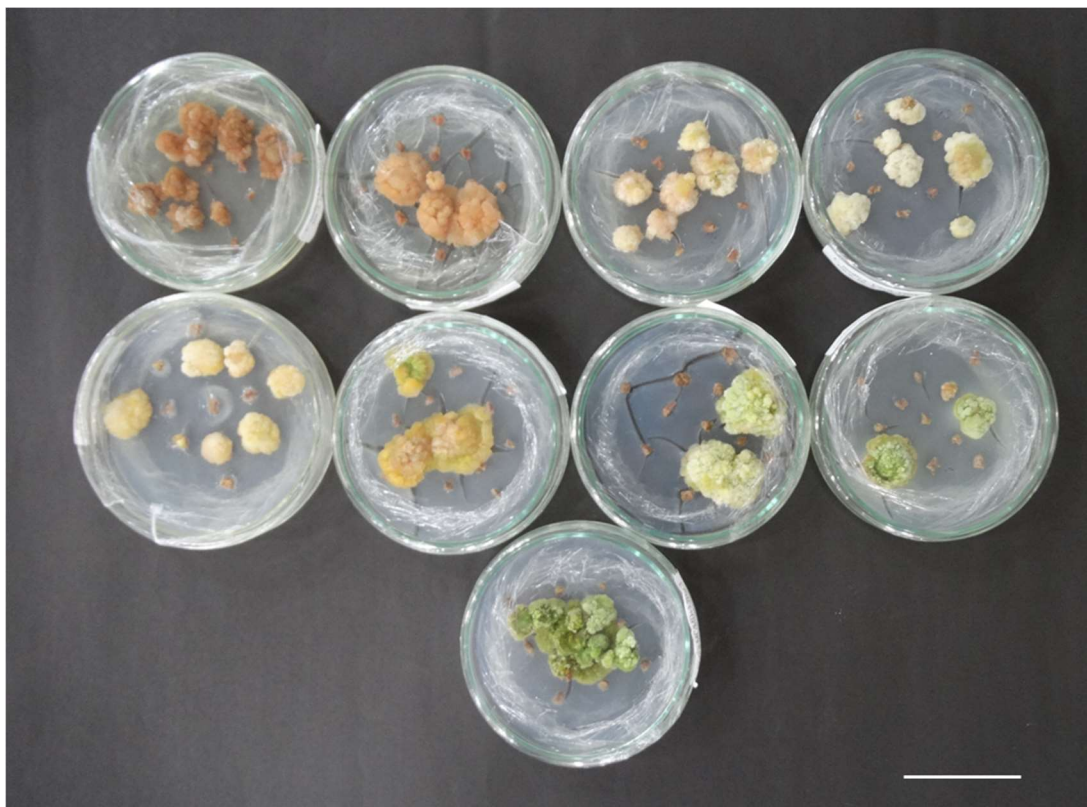


Figura 5. Diferentes gradientes de coloração de calos de *C. medica* L. obtidos a partir do cultivo in vitro de anteras no meio de multiplicação de calos proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004). Escala: 5 cm.

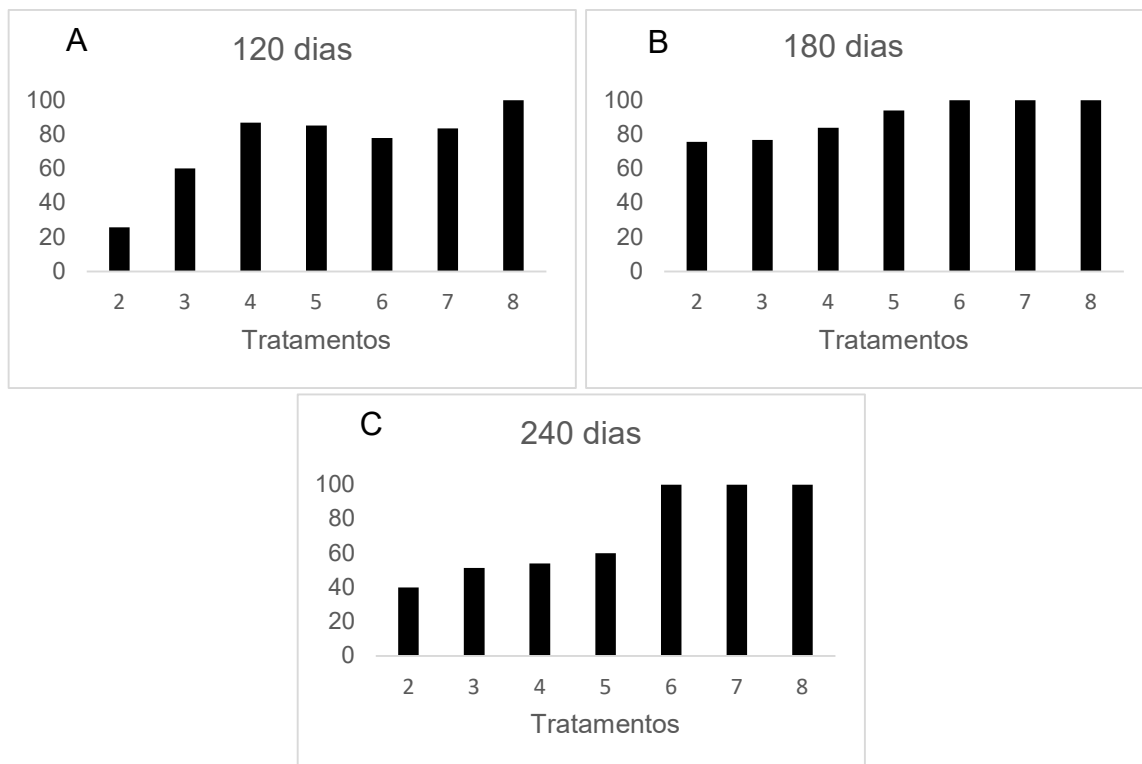


Figura 6. Percentuais de oxidação de calos de *Citrus medica* L. observados nos subcultivos realizados nos diferentes tratamentos, relativos aos tamanhos de botões florais aos 120 dias (A), 180 dias (B) e 240 dias (C) após a transferência das anteras com os calos para o meio de multiplicação de calos proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004).

Tabela 5. Resumo da análise de variância aplicada às variáveis peso dos calos (PC; g), diâmetro dos calos (DC; mm) e quantidade de divisões por calo (QDC), a partir de anteras de *Citrus medica* L. e multiplicados no meio de cultura proposto por SANGEETHA & RAMASWAMY (2004).

Avaliação aos 60 dias				
QM				
FV	GL	PC	DC	QDC¹
Tratamentos	6 (3 ¹)	0.01 ^{ns}	1.99 ^{ns}	0.30 ^{ns}
Erro	17 (6 ¹)	0.01	1.21	1.18
Média		0.02	2.93	2.85
CV (%)		86.15	37.57	38.10

Avaliação aos 120 dias				
QM				
FV	GL	PC	DC	QDC¹
Tratamentos	6 (4 ¹)	0.01 ^{ns}	3.62 ^{ns}	1.18 ^{ns}
Erro	18 (13 ¹)	0.01	1.51	2.17

Média	0.03	3.31	2.82
CV (%)	110.83	37.13	52.21

Avaliação aos 180 dias

QM

FV	GL	PC	DC	QDC¹
Tratamentos	6 (3 ¹)	0.01 ^{ns}	8.28 ^{ns}	7.97 ^{ns}
Erro	35 (19 ¹)	0.01	4.74	11.67
Média		0.08	4.43	6.05
CV (%)		111.15	49.17	56.45

Avaliação aos 240 dias

QM

FV	GL	PC	DC	QDC¹
Tratamentos	3	0.05 ^{ns}	26.22*	12.31 ^{ns}
Erro	81 (73 ¹)	0.19	8.81	70.53
Média		0.38	11.10	9.73

CV (%)	113.49	26.74	86.31
--------	--------	-------	-------

FV= Fonte de Variação; GL = Graus de Liberdade; GL¹ = Grau de Liberdade diferenciado devido à quantidade menor de parcelas analisadas para a variável QDC; QM = Quadrado Médio; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo; * = significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F da ANAVA.

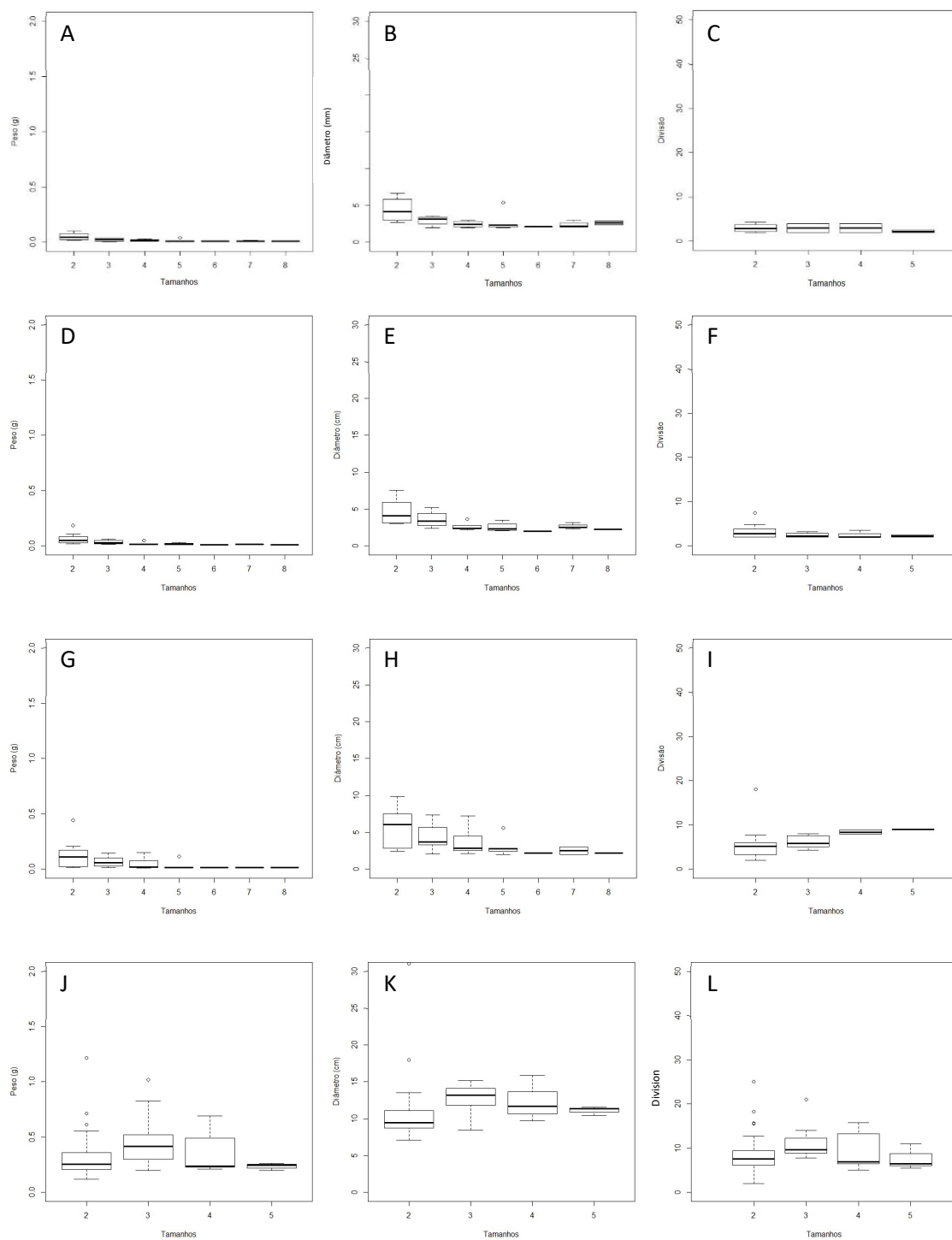


Figura 7. Gráficos box-plot para as variáveis peso dos calos (PC; g), diâmetro dos calos (DC; mm) e quantidade de divisões por calo (QDC), a partir de anteras de *Citrus medica* L. Variáveis PC, DC e QDC representadas pelas

letras A, B e C; D, E e F; G, H e I; e J, K e L, respectivamente nas avaliações efetuadas aos 60, 120, 180 e 240 dias.

ARTIGO 2

POTENCIAL REGENERATIVO DE CALOS INDUZIDOS EM ANTERAS DE *CITRUS MEDICA L.*

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira

Potencial regenerativo de calos induzidos em anteras de *Citrus medica* L.

Resumo: A espécie *Citrus medica* L. foi estudada visando a regeneração de plantas a partir de calos induzidos por meio de anteras. Foram montados experimentos envolvendo calos provenientes de anteras extraídas de quatro diferentes tamanhos de botões florais da cidreira, sendo eles: 1- C= 3.5 mm e Ø= 2.5 mm; 2- C= 4.0 mm e Ø= 4.0 mm; 3- C= 7.5 mm e Ø= 4.5 mm; 4- C= 11.5 mm e Ø= 5.5 mm e oito meios de cultura, sendo eles: o ME1500, MSB modificado, RM1, M7, WPM, MT e os propostos por AL-Hussaini et al. (2015) e Singh et al. (2011), a fim de obter embriões e gemas para posterior regeneração e cultivo das plantas obtidas. Entretanto, não houve competência por parte das células dos calos provenientes dos diferentes tratamentos e, portanto, não houve resposta dos tratamentos empregados aos calos estudados. Esse trabalho aponta, dessa forma, que estudos mais aprofundados precisam ser realizados a fim de identificar prováveis causas inerentes ao material vegetal e meios de cultura adequados, bem como os tipos de reguladores de crescimento vegetais e seu balanço para a regeneração in vitro de plantas de citros a partir de calos de anteras.

Palavras chave: calogênese, regeneração in vitro, cidreira.

Abstract: The species *Citrus medica* L. was studied aiming at the regeneration of plants from calluses induced by anthers. Experiments involving calluses from anthers extracted from four different sizes of citrus flower buds were set up, namely: 1- C = 3.5 mm and Ø = 2.5 mm; 2- C = 4.0 mm and Ø = 4.0 mm; 3- C = 7.5 mm and Ø = 4.5 mm; 4- C = 11.5 mm and Ø = 5.5 mm and eight culture media, namely: ME1500, modified MSB, RM1, M7, WPM, MT and those proposed by AL-Hussaini et al. (2015) and Singh et al. (2011), in order to obtain embryos and buds for later regeneration and cultivation of the obtained plants. However, there was no competence on the part of the callus cells from the different treatments and, therefore, there was no response from the treatments used to the studied calluses. This work points out, therefore, that more in-depth studies need to be carried out in order to identify probable causes inherent in

the plant material and suitable culture media, as well as the types of plant growth regulators and their balance for the in vitro regeneration of plants of citrus from anther calluses.

Keywords: callogenesis, in vitro regeneration, citron.

Introdução

A indústria mundial dos citros é de fundamental importância entre as fruteiras e sua influência provê empregos a milhões de pessoas ao redor do mundo. No Brasil, entretanto, mesmo sendo uma das atividades econômicas agrícolas mais rentáveis, o cultivo dos cítricos tem como base um pequeno número de variedades nos pomares comerciais (Machado et al., 2011). O País é o maior produtor mundial de suco de laranja concentrado, tendo alcançado em 2019 a produção de 870 mil toneladas (Anuário, 2019).

Comercialmente, diversas espécies são importantes dentro do gênero *Citrus*, entre elas a cidreira (*C. medica* L.) (Zhong & Nicolosi, 2020). Essa espécie é uma das três espécies base dos citros (Biswas et al., 2020), sendo provavelmente os parentais masculinos para todos os limoeiros e limeiras (Raveh et al., 2020).

As cidras têm importância mundial por serem utilizadas na medicina tradicional, sendo empregadas no tratamento de diversas doenças humanas e animais (Kalariya et al, 2019), além de serem exploradas como plantas ornamentais e para o consumo humano nas formas fresca e processada (Karp & Hu, 2018).

Para o alcance de uma planta melhorada de interesse comercial com aplicação na agricultura, estudos envolvendo o melhoramento genético podem levar décadas. No caso da espécie *C. medica*, é interessante que haja uma celeridade no melhoramento genético, por se tratar de uma importante espécie utilizada como porta-enxerto, pois entre outras características possui resistência ao cancro cítrico (Deng & Ma, 2020) e ao *huanglongbing* (Miles et al., 2017).

Nesse sentido, a obtenção de plantas haploides se torna uma alternativa viável no processo do melhoramento genético, devido a maior estabilidade e previsibilidade nos cruzamentos programados. Quando obtidas, essas plantas reduzem consideravelmente o tempo para geração de linhagens puras e facilitam a obtenção de linhagens superiores (Ferreira et al., 1998).

Na geração de plantas haploides, uma das técnicas utilizadas é o cultivo de anteras (Peñaloza & Pozzobon, 2011) para a indução de calos e posterior regeneração dos indivíduos haploides. Os calos têm por base uma massa de proliferação celular, que é induzida em um explante inicial por meio da adição de reguladores vegetais, como auxinas e citocininas, que promovem uma desdiferenciação dos tecidos vegetais (Sugimoto et al., 2011).

A regeneração de plantas in vitro pode acontecer por uma variedade de formas, entre elas a partir de uma única célula somática (Sugimoto et al., 2011). Da mesma forma que na indução de calos, para ocorrer a regeneração em plantas é necessário o correto equilíbrio dos reguladores vegetais nos meios de cultura, sendo primordial a relação ideal entre auxinas e citocininas (Skoog & Miller, 1957).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi ajustar um protocolo para a regeneração de plantas de *Citrus medica* L. a partir de calos provenientes de anteras.

Material e Métodos

Botões florais de diferentes tamanhos da cidreira (*C. medica* L.), que variaram entre 3.5 e 11.5 mm de comprimento, foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Após a desinfestação dos botões florais em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 3 minutos e em hipoclorito de sódio a 0,5% contendo duas gotas de Tween 20[®] durante 20 minutos, seguindo-se de três lavagens com água de osmose reversa autoclavada, as anteras foram retiradas e submetidas ao meio de cultura MS modificado e proposto por Cardoso et al. (2014) para indução de calos. Após essa indução e quatro subcultivos no meio de cultura MS modificado e proposto por Sangeetha & Ramaswamy (2004),

Reguladores de crescimento								
ANA	-	0.05	-	0.1	-	-	0.03	-
BAP	-	0.5	-	3.0	-	10.0	3.0	3.0
AG ₃	-	-	-	0.5	-	-	0.5	-
Cinetina	-	-	2.0	-	-	0.1	-	-
AIA	-	-	0.5	-	-	1.0	-	-
Outros suplementos								
Sulfato de adenina	-	-	-	100.0	-	-	-	-
Extrato de malte	1.5	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	50000.0	20000.0	20000.0	30000.0	20000.0	25000.0	20000.0	30000.0
Ágar	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0	8000.0
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

Cada experimento foi instalado com um dos oito meios de cultura, onde se dispôs quatro tratamentos, compostos por calos obtidos a partir de anteras coletadas de botões florais agrupados por tamanho na etapa de introdução in vitro. As médias dos tamanhos dos botões florais coletados foram: 1- C= 3.5 mm e Ø= 2.5 mm; 2- C= 4.0 mm e Ø= 4.0 mm; 3- C= 7.5 mm e Ø= 4.5 mm; 4- C= 11.5 mm e Ø= 5.5 mm. Em relação aos tipos celulares de cada tratamento, os tratamentos 1 e 2 continham apenas células-mãe do andrósporo, o tratamento 3 continha células-mãe do andrósporo com prevalência de tétrades e o tratamento 4 continha apenas micrósporos. Para cada tratamento, dentro dos oito meios nutritivos, foram cultivadas cinco placas de Petri, cada uma com 13 calos. Após a inserção nas placas, os calos foram incubados em sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, em uma temperatura de 27 °C.

O delineamento empregado em cada experimento foi inteiramente ao acaso, considerando-se um meio de cultura, empregado a cada tratamento dos calos oriundos de anteras extraídas de botões florais, dos quatro diferentes tamanhos. As placas dos diversos experimentos foram avaliadas semanalmente em relação à presença de embriões somáticos e gemas.

Resultados e Discussão

Todos os experimentos geraram calos friáveis, compactos e oxidados (Figura 1). Porém, nenhum calo apresentou embriões ou gemas para a regeneração de plantas.

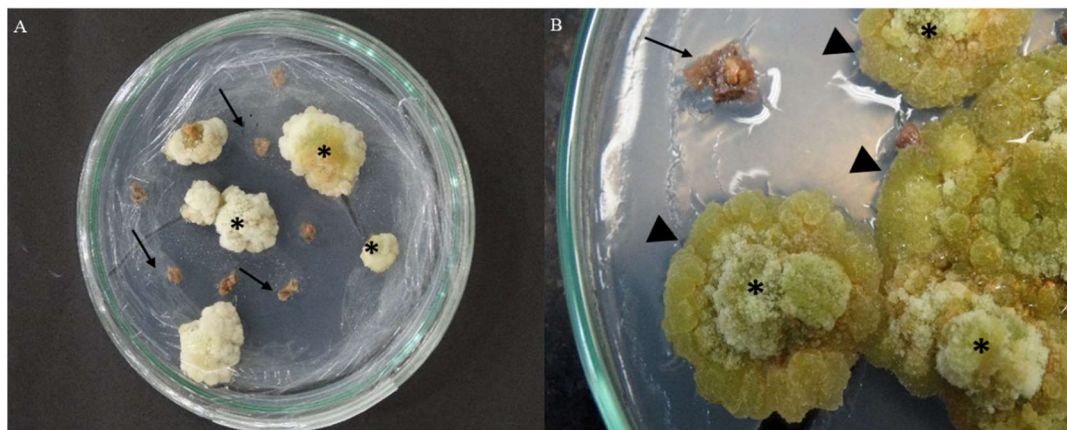


Figura 1. Calogênese em *Citrus medica* L. mostrando A) calos friáveis e calos oxidados, e B) calos com porções friáveis e compactas, e calo oxidado. Legendas: calos friáveis (*), calos compactos (pontas de setas), calos oxidados (setas).

Os meios de cultura utilizados no estudo divergiram entre si principalmente em relação aos reguladores de crescimento, que foram diferentes em sua diversidade e nas concentrações utilizadas (Tabela 1). Porém, mesmo utilizando diferentes meios e distintas concentrações de reguladores de crescimento não foi possível o ajuste de protocolo que atendesse às condições básicas para a regeneração de plantas de *C. medica* L..

Germanà & Chiancone (2003) citam que o gênero *Citrus* é bastante recalcitrante à androgênese e à regeneração de plantas. Srivastava & Chaturvedi (2008), ao estudar diversas espécies recalcitrantes para a indução de calos e regeneração de plantas haploides e duplo-haploides in vitro, aponta os citros como um dos exemplos. Os autores citam ainda que há sucesso em poucas espécies cítricas estudadas, corroborando, dessa forma, que a calogênese e a regeneração de plantas depende totalmente do genótipo estudado.

Segundo Su & Zhang (2014), três fases podem ser reconhecidas na regeneração de plantas a partir de calos. Na primeira, células somáticas provenientes dos tecidos dos explantes respondem a sinais hormonais e, dessa forma, se

comportam como células meristemáticas em um processo conhecido como desdiferenciação. Na segunda fase, as células competentes dos calos são reprogramadas para a formação específica de determinado órgão, de acordo com o balanço hormonal. A terceira fase, a morfogênese, é dependente de hormônios exógenos suplementares, que, portanto, têm ação direta nas primeiras fases da regeneração *in vitro*. Dessa forma, os tipos e as concentrações de reguladores vegetais são críticos para a determinação da regeneração celular *in vitro*. Por isso, de acordo com a cultura estudada, podem ser utilizados diferentes tipos e balanços de hormônios para o sucesso dos estudos.

Esses autores destacam ainda a importância da competência organogênica das células dos calos na regeneração de plantas. Os genes da espécie estudada podem ser ativados pela presença de auxinas e citocininas, induzindo o desenvolvimento da embriogênese somática a partir de calos embriogênicos. Nesse sentido, Ikeuchi et al. (2013) evidenciam que quando presente no calo, uma única célula totipotente tem a capacidade de regenerar uma planta completa.

Segundo Sugimoto et al. (2011), para que ocorra o processo de regeneração de plantas a partir de calos, células especiais análogas a células tronco devem operar como gatilho inicial da regeneração celular em plantas. Provavelmente, neste estudo, o gatilho para a diferenciação celular não foi acionado, seja ele pela ativação dos genes responsáveis pela diferenciação celular ou pela falta de células competentes para dar início ao processo.

Tao et al. (2002) ressaltam a importância do balanço hormonal do meio de cultura utilizado na indução de calos em resposta à regeneração *in vitro*. Em estudo com a espécie *Citrus grandis* Osb., somente quando utilizado o reagente 2,4-D durante a indução de calos houve um resultado satisfatório na regeneração de plantas, sendo inviáveis as outras auxinas estudadas. Dessa forma, além de adequações no protocolo de regeneração de plantas, podem ser necessários ajustes dos meios de cultura da fase de indução de calos a partir de anteras, a fim de promover um melhor desenvolvimento e regeneração de plantas.

Conclusões

Os meios de cultura empregados no estudo não promoveram êxito na regeneração de plantas de *Citrus medica* L. a partir de calos oriundos de anteras. Novos estudos envolvendo características do material vegetal, aplicação de novos meios de cultura e ajustes de concentrações de reguladores de crescimento devem ser realizados para viabilizar a regeneração de plantas a partir de calos de cidreira.

Referências

AL-HUSSAINI, Z. A.; YOUSIF, SH. A.; AL-AJEELY, S. A. Effect of different medium on callus induction and regeneration in potato cultivars. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 856-865, 2015.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI 2019: Brazilian Horti & Fruti Yearbook. Editora Gazeta, Santa Cruz do Sul, 2019. 96p. il. Disponível em: http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti_2019_DUPLA.pdf. Acessado em 15 de setembro de 2020.

BISWAS, M. K. et al. Genetic resources of *Citrus* and related genera. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 23-31.

CANADA, D. S.; BECK, E. Embryogenic callus induction on the scutellum and regeneration of plants as basis for genetic transformation of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Argentina. **Journal of Basic & Applied Genetics**, v. 24, n. 2, p. 55-66, 2013.

CARDOSO, J. C. et al. In vitro anther culture of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genotypes and of a *C. clementina* x *C. sinensis* 'Hamlin' hybrid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, p. 455-464, 2014.

DENG, Z.; MA, X. Genetic basis of resistance to Citrus canker disease. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 259-279.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUZZO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 21-43.

GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid production and regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 181-187, 2003. DOI: 10.1007/s00299-003-0669-7

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159-3173, 2013. DOI: 10.1105/tpc.113.116053

KALARIYA, M. V.; PRAJAPATI, R. P.; CHAVDA, J. R. Pharmacological potential of *Citrus medica*: a review. **Pharma Science Monitor**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2019.

KARP, D.; HU, X. The Citrus (*Citrus medica* L.) in China. **Horticultural Reviews**, v. 45, p. 143-196, 2018.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron spp.* **Horticultural Science**, v. 15, p. 416-417, 1980.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 158-172, 2011.

MILES, G. P. et al. Apparent tolerance to huanglongbing in citrus and citrus-related germplasm. **HortScience**, v. 52, p. 31-39, 2017.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1161.

NIRWAN, R. S.; KOTHARI, S. L. High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.). Moench. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p.161-164, 2003.

OLIVARES, O. **Hibridación somática de cítricos**. 1998. 202 f. Tesis Doctoral (Doctorado en Ciencias Biológicas) - Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, España.

PEÑALOZA, A. D. P. S.; POZZOBON, M. T. Manipulação de ploidia e outros aspectos citogenéticos relevantes para o pré-melhoramento de plantas. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Pré-melhoramento de plantas: Estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 39-58.

RAVEH, E. et al. Conventional breeding of cultivated *Citrus* varieties. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 33-48.

SAMANTARAY, S.; BISHOYI, A. K.; MAITI, S. Plant regeneration from callus cultures of *Vitex trifolia* (Lamiales: Lamiaceae): a potential medicinal plant. **Revista de Biologia Tropical**. v. 61, n. 3., p. 1083-1094, 2013.

SANGEETHA, G.; RAMASWAMY, N. M. Anther culture in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 6., 2004, Cali, Colômbia. **Anais...** Cali: CIAT, 2004. p. 208.

SINGH, B.; VIRK, G. S.; NAGPAL, A. K. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 161-169, 2011.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 54, p. 118-130, 1957.

SRIVASTAVA, P.; CHATURVEDI, R. In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 482-491, 2008.

SU, Y. H.; ZHANG, X. S. The hormonal control of regeneration in plants. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 108, p. 35-69, 2014.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 42, p. 212-218, 2011.

TAO, H.; SHAOLIN, P.; GAOFENG, D.; LANYING, Z.; GENGGUANG, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 141–146, 2002.

ZHONG, G.; NICOLOSI, E. Citrus origin, diffusion, and economic importance. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (Ed.). **The citrus genome**. Compendium of plant genomes. Cham: Springer, 2020. p. 5-22.

ARTIGO 3

Aspectos da morfologia floral, anatomia e histoquímica e anteras de anteras de espécies de citros

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Flora

Aspectos da morfologia floral, anatomia e histoquímica e anteras de anteras de espécies de citros

RESUMO

Para o sucesso do melhoramento de plantas, é de fundamental importância o conhecimento da biologia floral das espécies trabalhadas. Os citros são caracterizados pela diversidade de fenótipos cultivados. Por isso, o estudo da morfologia floral, de forma geral, e mais especificamente de anteras e grãos de pólen, pode elucidar de forma significativa o mecanismo de polinização e também auxiliar a caracterização e o agrupamento filogenético das espécies. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar estudos morfológicos, anatômicos e histoquímicos da flor e mais especificamente da antera de diferentes genótipos de *Citrus* e *Poncirus*, a fim de identificar características que possam auxiliar na caracterização de espécies do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura e também no entendimento de eventos morfogenéticos advindos do cultivo in vitro de anteras. As espécies *Citrus medica* L., *C. webberi* Wester, *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. deliciosa* Ten., *C. reshni* hort. ex Tanaka, *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], *C. reticulata* Blanco e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., foram estudadas. Flores dos oito genótipos foram coletadas após a antese para análise da morfologia floral. Botões florais das mesmas espécies também foram coletados em fase de pré-antese para retirada das anteras frescas e fixação em Carnoy (álcool etílico e ácido acético - 3:1). As observações e análises foram realizadas sob estereomicroscópio, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Diferentes características na corola, androceu e gineceu foram encontradas nas diferentes espécies estudadas. Além disso, distintos tamanhos e padrões de ornamentação da superfície das anteras foram observados. Tamanho, ornamentação e quantidade de colpos dos grãos de pólen mostraram-se semelhantes em alguns genótipos, evidenciando que mesmo sendo de espécies diferentes, existe uma base bastante estreita entre os genótipos cítricos utilizados neste estudo.

Palavras-chave: Ornamentação, microscopia de varredura, citros, anatomia vegetal, biologia floral

ABSTRACT

For the success of plant breeding, knowledge of the floral biology of the species studied is of fundamental importance. Citrus is characterized by the diversity of cultivated phenotypes. Therefore, the study of floral morphology, in general, and more specifically of anthers and pollen grains, can significantly elucidate the mechanism of pollination and also assist in the characterization and phylogenetic grouping of species. Thus, the objective of this work was to carry out morphological, anatomical and histochemical studies of the flower and more specifically of the anther of different genotypes of Citrus and Poncirus, in order to identify characteristics that may assist in the characterization of species of the Active Bank of Citrus Germplasm of Embrapa Cassava and Fruit and also in the understanding of morphogenetic events arising from the in vitro cultivation of anthers. The species *Citrus medica* L., *C. webberi* Wester, *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. deliciosa* Ten., *C. reshni* hort. ex Tanaka, *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], *C. reticulata* Blanco and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., were studied. Flowers of the eight genotypes were collected after anthesis for analysis of floral morphology. Flower buds of the same species were also collected in the pre-anthesis phase for removal of fresh anthers and fixation in Carnoy (ethyl alcohol and acetic acid - 3: 1). Observations and analyzes were performed under stereomicroscope, light microscopy and scanning electron microscopy. Different characteristics in the corolla, androceu and gynecium were found in the different species studied. In addition, different sizes and patterns of ornamentation of the anther surface were observed. Size, ornamentation and quantity of pollen grains colpos proved to be similar in some genotypes, showing that even though they are of different species, there is a very narrow base among the citrus genotypes used in this study.

Keywords: Ornamentation, scanning microscopy, citrus, plant anatomy, floral biology

Introdução

Para o alcance do sucesso de um programa de melhoramento é importante que a cultura trabalhada tenha uma ampla variabilidade genética. No caso dos citros e gêneros afins, essa significativa diversidade é de fundamental valor para obtenção de indivíduos adaptados a ambientes com fatores destoantes, sejam eles bióticos ou

abióticos. Os citros se apresentam como um grupo bastante heterogêneo, que contempla uma complexa variedade de plantas, principalmente em relação à diversidade de fenótipos (Soares Filho et al., 2011).

Embora o gênero *Citrus* conte com uma expressiva variabilidade, apenas um número limitado de cultivares é utilizado como porta-enxerto (Curk et al., 2016). Por isso, técnicas de melhoramento genético são essenciais para a ampliação e preservação da diversidade já existente e manutenção da produtividade das cultivares. Porém, para uma boa resposta a um programa de melhoramento genético, é de fundamental importância o conhecimento das macro e microestruturas florais dos genótipos trabalhados (Chagas et al., 2010; Konarska, 2017), tendo em vista que essa compreensão auxilia o entendimento da biologia floral (Konarska, 2017), pode elucidar o processo da polinização e, com isso, prever o mecanismo de produção dos frutos (López e Galetto, 2002). Segundo Pirani et al. (2010), os citros apresentam uma vasta diversidade de tipos florais. Essas flores, por meio de investigações morfológicas e anatômicas, podem ajudar a compreensão de diversas áreas, como a classificação taxonômica, filogenia e evolução.

Vários autores apontam a importância dos estudos morfoanatômicos e histoquímicos dos órgãos reprodutivos de plantas para fins de identificação e melhor classificação de gêneros, espécies e genótipos. Entre esses trabalhos estão os estudos feitos em gêneros de Moraceae (Jacomassi et al., 2010), Passifloraceae (Dettke e Santos, 2011) e Solanaceae (Zambon e Agostini, 2017). No entanto, mesmo diante da importância desse tipo de trabalho para os citros, poucos estudos têm sido realizados. Alguns desses estudos contemplam espécies pertencentes a família Rutaceae (Buriel et al., 2014; Souza et al., 2003; Souza et al., 2004), porém, para os porta-enxertos de importância dos citros, utilizados no melhoramento genético, há uma carência de informações nesse sentido.

O gênero *Citrus* está incluído na família Rutaceae (NCBI, 2017) e segundo Swingle (1967), pode apresentar flores únicas que partem da região axilar das folhas ou em racemos pequenos e axilares, e podem ser perfeitas ou estaminadas. Possuem entre 4 e 8 pétalas e os estames normalmente são quatro vezes mais numerosos do que a quantidade de pétalas encontradas, podendo chegar a dez vezes mais numerosos. Segundo Judd et al. (2009), a família apresenta estames que variam em

quantidade e possuem grãos de pólen que mostram entre 3 e 6 colpos. De acordo com Cronquist (1981), as anteras dessa família são tetrasporangiadas e em sua maioria contêm duas tecas, que possuem deiscência longitudinal; os grãos de pólen são binucleados ou raramente trinucleados.

Assim como há uma gama de variedades para os tipos florais, existem diferenças pontuais entre os grãos de pólen para os gêneros pertencentes à família Rutaceae. Estudos têm mostrado a importância da utilização de técnicas como a microscopia, especificamente a microscopia de varredura, para análise da morfologia dos grãos de pólen (Zubaidah et al., 2018) e também para o tipo de abertura dos mesmos, principalmente em famílias que têm alguma diversidade do ponto de vista palinológico (Dettke e Santos, 2009).

Como sugerido por Rodrigues et al. (2004), quanto mais abrangentes as técnicas utilizadas no estudo em questão mais completas serão as informações em relação aos eventos morfogênicos, ou seja, melhor será o entendimento geral sobre um indivíduo ou grupo de indivíduos. Por isso, a união das técnicas de microscopia de varredura e histoquímica parece ser a mais completa para o estudo da biologia reprodutiva das espécies de *Citrus* e gêneros afins.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi de realizar estudos morfológicos, anatômicos e histoquímicos da flor e mais especificamente da antera de diferentes genótipos de *Citrus* e *Poncirus*, a fim de identificar características que possam auxiliar na caracterização de espécies do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura e também no entendimento de eventos morfogenéticos advindos do cultivo in vitro de anteras.

Material e Métodos

Morfologia e descrição floral

Foi realizada a coleta de flores abertas das espécies dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*: toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.], *C. webberi* Wester, tangerineiras 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco), mexeriqueira (*C. deliciosa* Ten.), cidreira (*C. medica* L.)

e trifoliata 'Benecke' [*P. trifoliata* (L.) Raf.] para procedimento da descrição floral. As coletas foram realizadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros, localizado no campo da Embrapa Mandioca e Fruticultura, município de Cruz das Almas, Bahia.

A descrição floral se baseou no tipo de inflorescência, tipo de inserção da flor no caule, simetria floral, tipo de cálice e corola, número e coloração de pétala, número de estames em relação ao número de pétalas, disposição dos estames, orientação e soldadura das anteras, soldadura dos filetes, disposição dos estames em relação à corola, união do filete à antera, placentação e número de lóculos do gineceu (Cortez et al., 2016; Judd et al., 2009).

Para as análises de estames e pistilo, dimensões de anteras, quantificação de anteras e estimativa polínica por flor foram coletadas dez flores, sendo cinco de cada uma das duas plantas de cada espécie estudada. De cada flor foram escolhidas aleatoriamente cinco anteras para fotografia e medições de diâmetro e comprimento com auxílio do software ImageJ (Schneider et al., 2012), totalizando 50 registros de cada medição por genótipo.

Para a estimativa polínica, posteriormente às fotografias, as cinco anteras foram somadas às demais de cada flor coletada, contabilizadas e separadas da união com o filete mediante o uso de pinças. O total de anteras de cada flor foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL, adicionando-se, posteriormente, 1 mL de ácido láctico. O material foi deixado em repouso por 2 horas e, em seguida, procedeu-se sua maceração para garantir a liberação máxima dos grãos de pólen na solução. Imediatamente antes da análise, a solução foi misturada com um agitador tipo vórtex para garantir a homogeneização da suspensão celular e o volume necessário retirado e inserido na canaleta da câmara de Neubauer, previamente coberta com a lamínula específica. A contagem foi realizada nos oito campos A e a média calculada, com elevação a 10^4 (Silva et al., 2017 – adaptada). Para a observação do número de lóculos e o tipo de placentação, seccionou-se o estilete longitudinalmente e o ovário, transversalmente (Cortez et al., 2016).

Análises de microscopia de varredura

Botões florais dos mesmos genótipos também foram coletados no BAG de citros em fase de pré-antese. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário,

no final da tarde, e os botões mantidos fechados para evitar a exposição e consequente desidratação das anteras. Para as análises foram utilizadas amostras fixadas na solução contendo álcool etílico e ácido acético - 3:1 (Carnoy).

Para a microscopia eletrônica de varredura, botões florais de cada genótipo, previamente fixados, foram abertos com auxílio de pinça e lâmina de bisturi, retirando-se as anteras para processamento de duas formas: inteiras e cortadas transversalmente na região mediana. Em seguida, foram desidratadas em série de álcool (70%, 90% e absoluto) e submetidas a secagem com CO₂ em ponto crítico (CPD-030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras secas foram aderidas a suportes metálicos com fita dupla face, cobertas com fina camada de ouro, sob condição de vácuo (Denton Vacuum Desk IV, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e observadas sob microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6390LV0). Todos os processamentos e análises foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-Bahia), em Salvador.

Análises anatômicas e histoquímicas

Para a análise anatômica e realização dos testes histoquímicos foram utilizados botões florais dos mesmos grupos, fixados e armazenados conforme previamente descrito. Após a fixação, as anteras individualizadas foram desidratadas em série etanólica e incluídas em resina metacrilato (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes transversais e longitudinais, com espessura de 5 µm e 10 µm, foram efetuadas com auxílio do micrótomo rotativo (RM 2235, Leica Microsystems, Deerfiel, IL, USA). As seções obtidas foram coradas com azul de toluidina (C.I. 52040) a 1% e pH 7,2 (O'Brien e McCully, 1981).

Para detecção dos principais grupos de metabólitos secundários, os cortes das anteras incluídas em metacrilato foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos: ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) para identificação de carboidratos totais (McManus, 1948); Xylidine de Ponceau para proteínas totais (Vidal, 1970), IKI (solução de lugol) para amido e cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940).

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz (DM250 Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipado com câmera digital (DFC 295 Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Para análise da birrefringência da parede celular e de cristais, foi utilizado um filtro polarizador no mesmo microscópio.

Todas as análises anatômicas e histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus, Bahia.

Caracterização dos grãos de pólen

A descrição dos grãos de pólen das espécies estudadas foi realizada seguindo a metodologia empregada por Dutra e Gasparino (2018), de forma adaptada.

Para dimensões dos grãos de pólen, 25 grãos foram escolhidos aleatoriamente e medidos nos eixos polar e equatorial, para cada espécie estudada, com auxílio do software ImageJ (Schneider et al., 2012), totalizando 50 registros de cada espécie.

Resultados

Morfologia floral

No município de Cruz das Almas, Bahia, a floração dos citros ocorre tradicionalmente nos meses de fevereiro, março e setembro, porém é possível encontrar floradas esporádicas de algumas espécies em outros meses do ano.

As flores coletadas das oito espécies variaram de tamanho entre os genótipos (Figura 1) e tinham em comum um aroma marcante e agradável, característico das espécies cítricas. Todas as pétalas estavam abertas na antese como forma de facilitação da liberação dos grãos de pólen.

De modo geral, as espécies foram caracterizadas contendo inflorescências terminais tipo racemo ou reduzida a uma única flor. Flores bissexuais ou unissexuais masculinas, pedunculadas ou sésseis, com simetria radial. Diclâmideas variando entre 4-5 pétalas. Cálice gamossépalo e dialissépalo, com coloração verde e roxa. Corola dialipétala, com unha reduzida ou sem unha e coloração variando entre branca e rosada. Androceu polistêmone, com médias que variaram entre 18-41 anteras em

média (Tabela 1), heterodínamo. Filete gamostêmone ou dialistêmone, com anteras livres, introrsas, dorsifixas ou basifixas. Flores brevistilas ou longistilas. Gineceu com ovário súpero, estilete com inserção terminal, pistilo pluricarpelar, lóculos que variaram entre 6-16, com placentação axilar. Todas as espécies apresentaram disco nectarífero intraestaminal.



Figura 1. Flores das espécies A. *Citrus medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Escalas: A-H: 1 cm.

Entre as características estudadas, as principais diferenças notadas são em relação ao genótipo *P. trifoliata* em relação aos demais estudados. Este foi o único descrito como tendo flores sésses, com cálice dialissépalo e contendo unha nas pétalas. As espécies *C. medica* e *C. webberi* também se diferenciaram em relação a coloração das pétalas. Enquanto os demais genótipos tinham apenas a coloração branca na estrutura, estes mostravam uma coloração rosada na face externa. O genótipo *C. medica* foi o único a apresentar flores bissexuais e unissexuais masculinas, enquanto os demais genótipos apresentaram apenas flores bissexuais. As espécies *C. webberi* e *C. maxima* também se diferenciaram por apresentar flores tetrâmeras e pentâmeras, enquanto as demais espécies apresentaram apenas flores pentâmeras.

Descrição detalhada das flores

Espécie	Tipo da inflorescência terminal	Sexo da flor	Tipo de inserção da flor no caule	Simetria floral	Número de pétalas	Verticilos florais	Tipo de cálice	Coloração das sépalas	Tipo de corola	Coloração de pétalas
<i>C. medica</i>	Racemo	Bissexual ou unissexual masculina	Pedunculada	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Roxas	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca na fase interna e rosada na face externa
<i>C. webberi</i>	Racemo	Bissexual	Pedunculada	Radial	Tetrâmera ou pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Roxas	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca na fase interna e rosada na face externa
<i>C. maxima</i>	Racemo	Bissexual	Pedunculada	Radial	Tetrâmera ou pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Verde	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca
<i>C. deliciosa</i>	Flor única	Bissexual	Pedunculada	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Verde	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca
<i>C. reshni</i>	Flor única	Bissexual	Pedunculada	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Verde	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca
<i>C. sunki</i>	Racemo	Bissexual	Pedunculada	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Verde	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca
<i>C. reticulata</i>	Flor única	Bissexual	Pedunculada	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Gamossépalo (levemente conado basalente)	Verde	Dialipétala, actinomorfa, sem unha	Branca
<i>P. trifoliata</i>	Flor única	Bissexual	Séssil	Radial	Pentâmera	Diclamídea	Dialissépalo	Verde	Dialipétala, actinomorfa, unha reduzida	Branca

continuação

Espécie	Número de estames em relação ao número de pétalas	Tamanho dos estames	Soldadura dos filetes	Soldadura das anteras	Orientação das anteras	União do filete à antera	Alturas de estames e estilete
<i>C. medica</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Basifixas	Brevistila
<i>C. webberi</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Dialistêmone	Livre	Introrsa	Dorsifixas	Longistila
<i>C. maxima</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Basifixas	Longistila
<i>C. deliciosa</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Dorsifixas	Brevistila
<i>C. reshni</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Dorsifixas	Brevistila
<i>C. sunki</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Dorsifixas	Brevistila
<i>C. reticulata</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Dorsifixas	Longistila
<i>P. trifoliata</i>	Polistêmone	Heterodínamo	Gamostêmone, poliadelfo	Livre	Introrsa	Basifixas	Brevistila

continuação

Espécie	Ovário	Inserção do estilete	Placentação	Pistilo	Número de lóculos do gineceu	Presença de disco nectarífero intraestaminal
<i>C. medica</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	11	Sim
<i>C. webberi</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	12	Sim
<i>C. maxima</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	16	Sim
<i>C. deliciosa</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	10	Sim
<i>C. reshni</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	10	Sim
<i>C. sunki</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	8	Sim
<i>C. reticulata</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	12	Sim
<i>P. trifoliata</i>	Súpero	Terminal	Axilar	Pluricarpelar	6	Sim

Tabela 1. Medidas do diâmetro, comprimento e quantificação de anteras e grãos de pólen por flor dos genótipos *Citrus medica* L., *C. webberi* Wester, *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. deliciosa* Ten., *C. reshni* hort. ex Tanaka, *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e *C. reticulata* Blanco, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Genótipo	Anteras						Quantificação dos grãos de pólen por flor
	Diâmetro		Comprimento		Quantificação por flor		
	FV (μm)	$\bar{x} \pm s_x$ (μm)	FV (μm)	$\bar{x} \pm s_x$ (μm)	FV	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
<i>C. medica</i>	0,66-1,52	1,10 \pm 0,17	5,32-7,3	6,27 \pm 0,46	32-60	41,5 \pm 8,14	38,69 \pm 20,56 x 10 ⁴
<i>C. webberi</i>	0,72-1,44	1,18 \pm 0,11	2,85-4,05	3,49 \pm 0,26	31-36	32,9 \pm 1,79	87,95 \pm 10,26 x 10 ⁴
<i>C. maxima</i>	0,9-1,99	1,48 \pm 0,31	3,46-6,22	5,26 \pm 0,77	37-43	40,2 \pm 2,20	88,46 \pm 10,56 x 10 ⁴
<i>C. deliciosa</i>	0,81-1,14	0,88 \pm 0,07	1,77-2,8	2,17 \pm 0,33	20-22	21,3 \pm 1,15	11,12 \pm 4,01 x 10 ⁴
<i>C. reshni</i>	0,84-1,29	0,98 \pm 0,11	1,52-1,95	1,72 \pm 0,10	19-23	20,3 \pm 1,42	12,87 \pm 2,78 x 10 ⁴
<i>C. sunki</i>	0,73-1,19	0,98 \pm 0,11	1,15-1,77	1,50 \pm 0,12	16-20	17,9 \pm 1,37	10,01 \pm 3,27 x 10 ⁴
<i>C. reticulata</i>	0,90-1,28	1,05 \pm 0,06	1,69-2,25	1,99 \pm 0,13	19-22	20,6 \pm 0,97	19,89 \pm 1,65 x 10 ⁴
<i>P. trifoliata</i>	0,99-1,47	1,16 \pm 0,12	1,9-3,29	2,69 \pm 0,33	21-23	22 \pm 0,94	30,31 \pm 5,82 x 10 ⁴

Abreviaturas: FV, faixa de variação; \bar{x} , média aritmética; s_x , desvio padrão da média.

Anteras – análises visuais, em estereomicroscópio, em microscopia de varredura e análises histoquímicas

Em relação as espécies estudadas, *Citrus maxima* e *C. medica* possuem as anteras de maior tamanho na fase de antese. Em contrapartida, os genótipos *C. reshni* e *C. sunki* possuem as menores anteras estudadas. A quantidade de anteras variou bastante entre as espécies, sendo que quanto menores as flores menores as anteras e em menor número (Tabela 1). Todas as espécies possuem a porção dorsal mais larga que a ventral (Figura 2).

As anteras nas flores em botão e durante a fase de antese estão posicionadas paralelamente em relação ao ovário, com os microsporângios voltados para o centro (anteras introrsas).

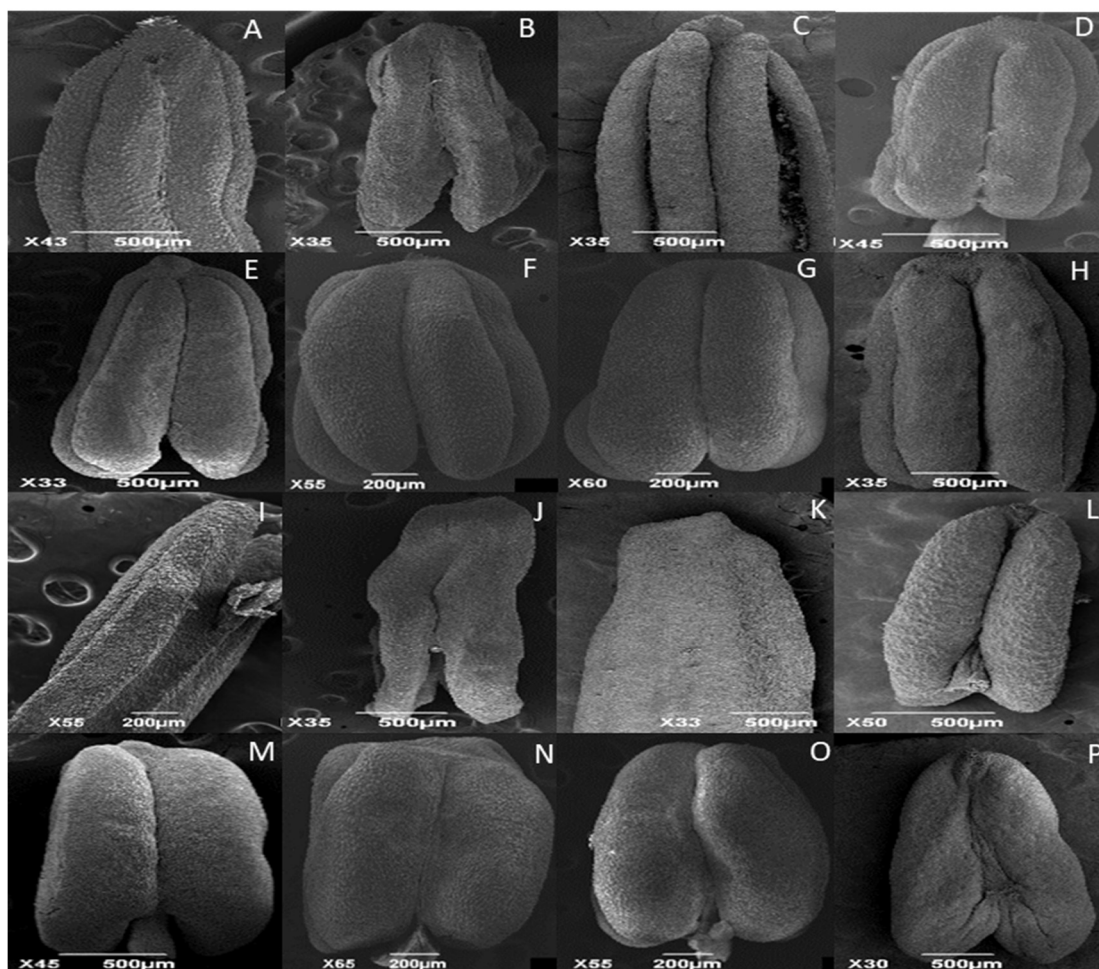


Figura 2. Morfologia externa de anteras em vista dorsal (A-H) e ventral (I-P), sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). A e I. *Citrus medica* L., B e J. *C. webberi* Wester., C e K. *C. maxima* (Burm.) Merr., D e L. *C. deliciosa* Ten., E e M. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., F e N. *C. reshni* hort. ex Tanaka, G e O. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka e H e P. *C. reticulata* Blanco.

A morfologia geral das anteras não diferiu entre as oito espécies, que se apresentaram tetrásporangeadas, bilobadas, deiscências por duas fendas longitudinais (Figuras 2 e 3).

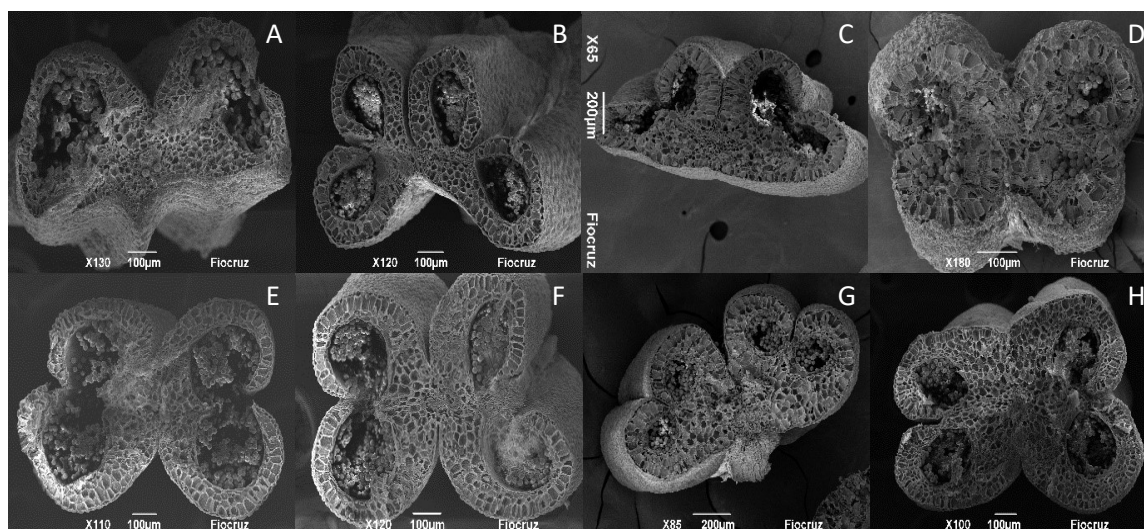


Figura 3. Seções transversais de anteras, sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). A. *Citrus medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

O ápice das anteras se apresentou como pronunciado ou truncado (Figura 4). Os genótipos *C. medica* (Figura 4A), *C. webberi* (Figura 4B), *C. maxima* (Figura 4C), *C. deliciosa* (Figura 4D) e *P. trifoliata* (Figura 4H) apresentaram anteras com ápice pronunciado, enquanto os genótipos *C. reshni* (Figura 4E), *C. sunki* (Figura 4F) e *C. reticulada* (Figura 4G) apresentaram um ápice truncado. Papilas epidérmicas foram notadas na extremidade das anteras de *C. webberi*, *C. reticulada*, *C. sunki*, *C. deliciosa* e *C. medica*, sendo acentuadamente pronunciadas nessa última espécie (Figura 4A). A base das anteras se apresentou dividida com formação de quatro lobos em todos os genótipos.

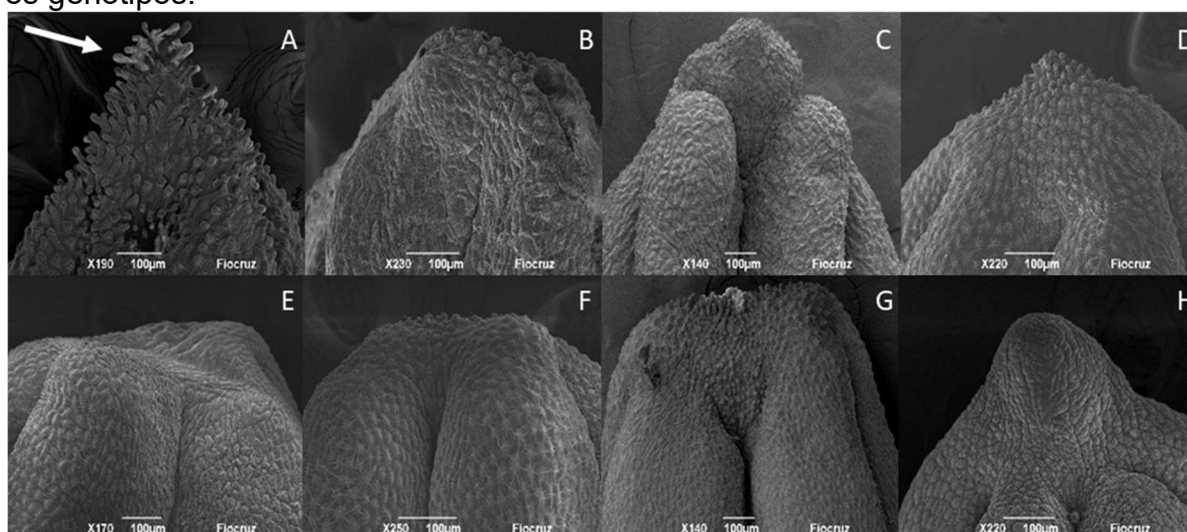


Figura 4. Detalhes da porção apical, em vista ventral, de anteras em MEV das espécies A. *Citrus medica* L. (detalhe da seta branca para as papilas epidérmicas pronunciadas), B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

A análise microscópica da superfície das anteras mostrou que a epiderme se encontra coberta por uma cutícula estriada nas regiões dorsal e ventral, em todos os genótipos (Figura 5).

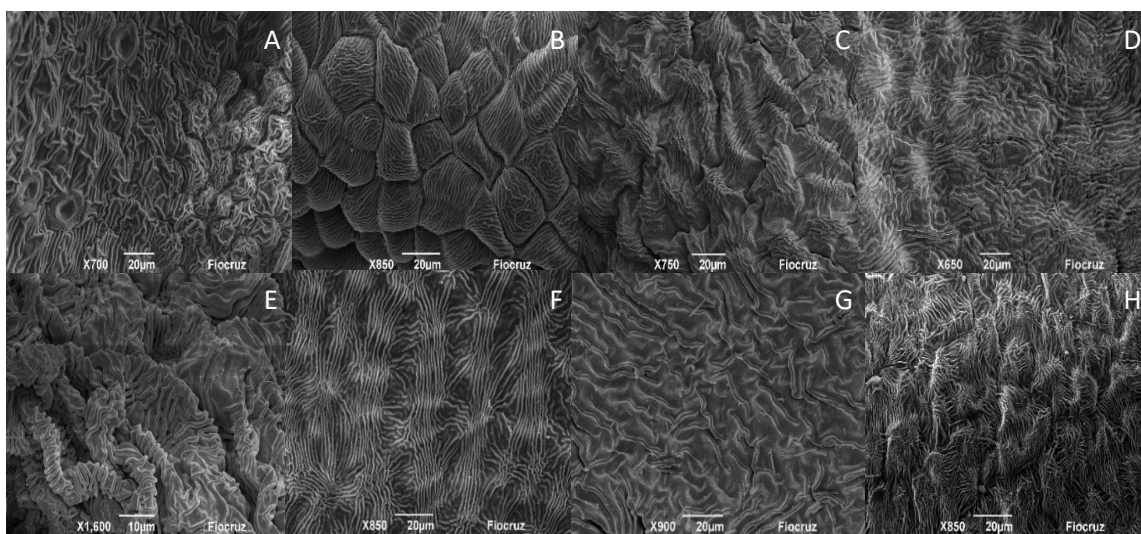


Figura 5. Detalhes da superfície epidérmica de anteras em MEV das espécies A. *Citrus medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Na espécie *C. medica*, entretanto, além do padrão estriado foi observado também o padrão papiloso, sendo que este se sobressaiu ao estriado especialmente no ápice da antera. O padrão de estriação encontrado se mostrou bastante diferenciado entre os genótipos, constituindo, assim, uma importante característica. Esses fatores são, entre outros, alguns dos que podem contribuir para a distinção entre os genótipos.

Estômatos foram observados na epiderme da região dorsal e ventral (anfiestomáticos) de quase todas as espécies (Figuras 6 e 7G), com exceção de *C. maxima*, *C. reshni* e *C. sunki*, que apresentaram estômatos apenas na região ventral (epiestomáticos). Visualmente pôde ser observado que a maioria dos genótipos possuem mais estômatos na região dorsal do que ventral. A exceção entre as oito espécies estudadas refere-se ao *P. trifoliata* que apresenta quantidade muito maior de estômatos na região ventral da antera.

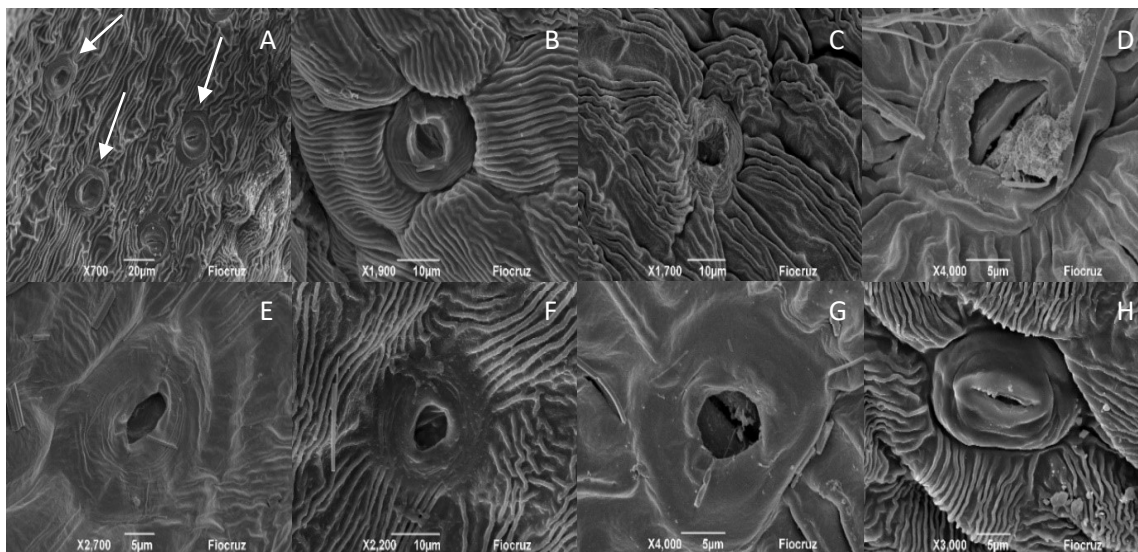


Figura 6. Estômatos na superfície epidérmica das anteras. A. *Citrus medica* L. (detalhe das setas brancas para os estômatos), B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Essa característica reforça a diferença entre o *P. trifoliata* e todos os outros genótipos trabalhados, principalmente por se tratar de um gênero diferente. Em relação às demais espécies, destacaram-se a *Citrus medica* e a *C. reticulata*, que mostraram, na análise visual, uma quantidade elevada de estômatos na região dorsal das anteras estudadas.

Anatomicamente as anteras maduras, no estágio deiscente, apresentam epiderme unisseriada constituída por células de formatos variados, coberta por cutícula estriada e/ou papilosa. A parede da antera apresentou como estratos parietais epiderme e endotécio. Neste estágio de desenvolvimento o endotécio variou em número de camadas entre a região do arco, onde se apresentou uni a bisseriado e,

na região adjacente ao conectivo, ocupando de dois a cinco estratos celulares (Figura 6). A estratificação do endotécio se mostrou menos acentuada entre as espécies *C. medica*, *C. webberi* e *C. maxima*, que apresentaram, cada uma, cerca de dois a três estratos celulares (Figura 6 A-C), enquanto entre as demais espécies esse número variou entre quatro a cinco camadas celulares (Figura 6 D-H).

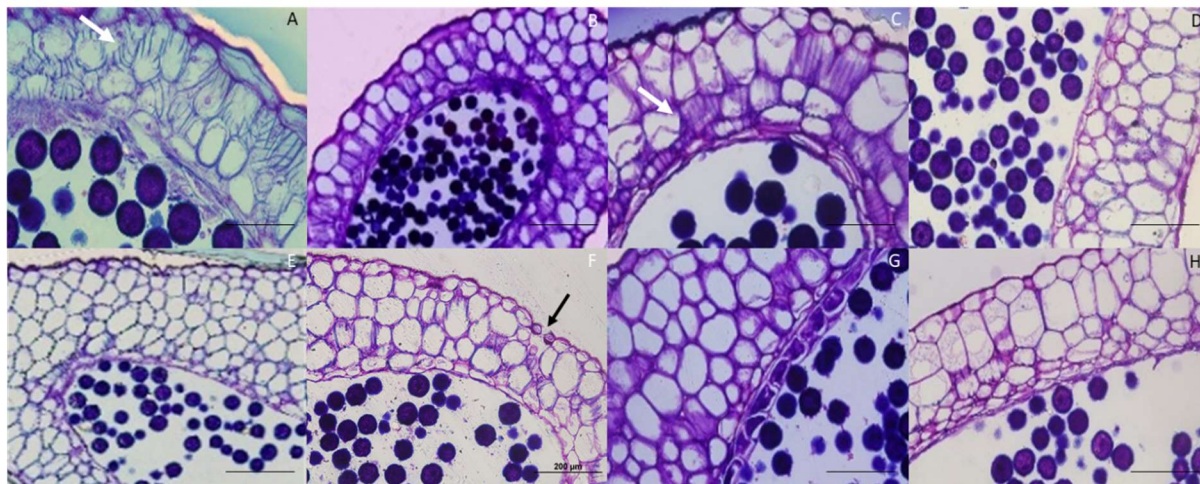


Figura 7. Seções transversais das anteras de espécies de citros corados com azul de toluidina A. *C. medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *C. reshni* hort. ex Tanaka, F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka (detalhe da seta preta para as células guardas dos estômatos), G. *C. reticulata* Blanco e H. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.. Detalhe das setas brancas para o espessamento em fi. Escalas: A-H: 200µm.

Células do endotécio apresentaram espessamento de parede em fi, que reagiu positivo para lignina na metacromasia da coloração com azul de toluidina (Figura 7A). Tal espessamento foi mais acentuado nas espécies *C. medica* (Figura 7A), *C. maxima* (Figura 7C), *P. trifoliata* (Figura 7E) e *C. reshni* (Figura 7F). O conectivo se mostrou constituído por células de formato irregular, próximo ao formato isodiamétrico.

Cavidades secretoras situada na região apical da antera, de origem lisígena, foram observadas em trifoliata 'Benecke' e *C. reshni* (Figuras 8 A-B).

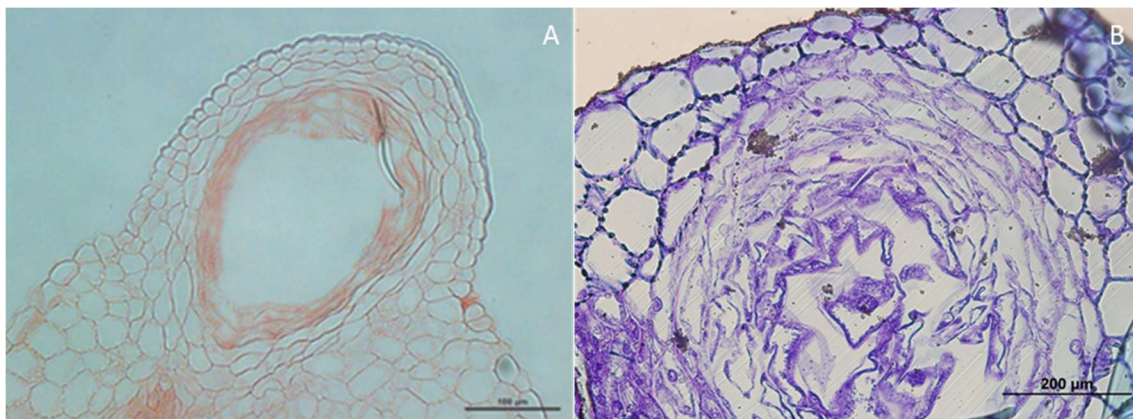


Figura 8. Estruturas secretoras nas anteras de A. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e B. *Citrus reshni* hort. ex Tanaka.

Cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfides foram observados nas células do conectivo das espécies *C. reticulata*, *C. sunki*, *C. reshni*, *C. deliciosa* e nas células da epiderme e no endotécio de *C. reticulata* (Figura 9 A-C).

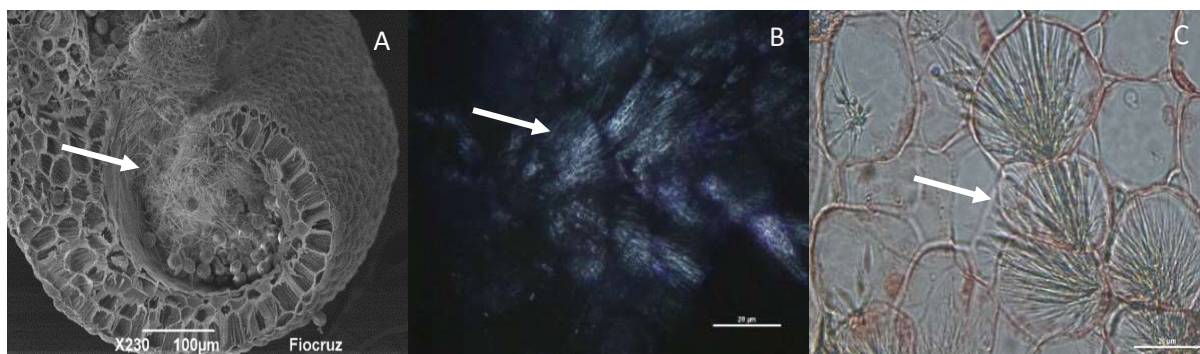


Figura 9. Detalhes de cristais de oxalato de cálcio do tipo de ráfides no endotécio das espécies: A. *Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka; B. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka (detalhe em microscopia com filtro polarizador) e C. *C. reticulata* Blanco (microscopia de campo claro). Detalhe das setas brancas para os cristais de oxalato de cálcio.

Testes histoquímicos tiveram resultado similar para os tecidos da antera de todas as espécies. O lugol revelou a presença de amido no endotécio e nos grãos de pólen testados.

Nesse aspecto, a reação com PAS revelou a presença de carboidratos no endotécio de algumas espécies, como *C. reshni* e *C. reticulata*, e nos grãos de pólen de *C. maxima* (Figura 10B) e *C. medica* (Figura 10C). As espécies *C. deliciosa* (Figura 10D) e *C. reticulata* (Figura 10E) se destacaram em relação à presença de amido nas anteras. Diferentemente do que ocorrem nessas espécies, em *P. trifoliata* a reserva de amido é menos pronunciada quando comparado o mesmo estágio de desenvolvimento da antera.

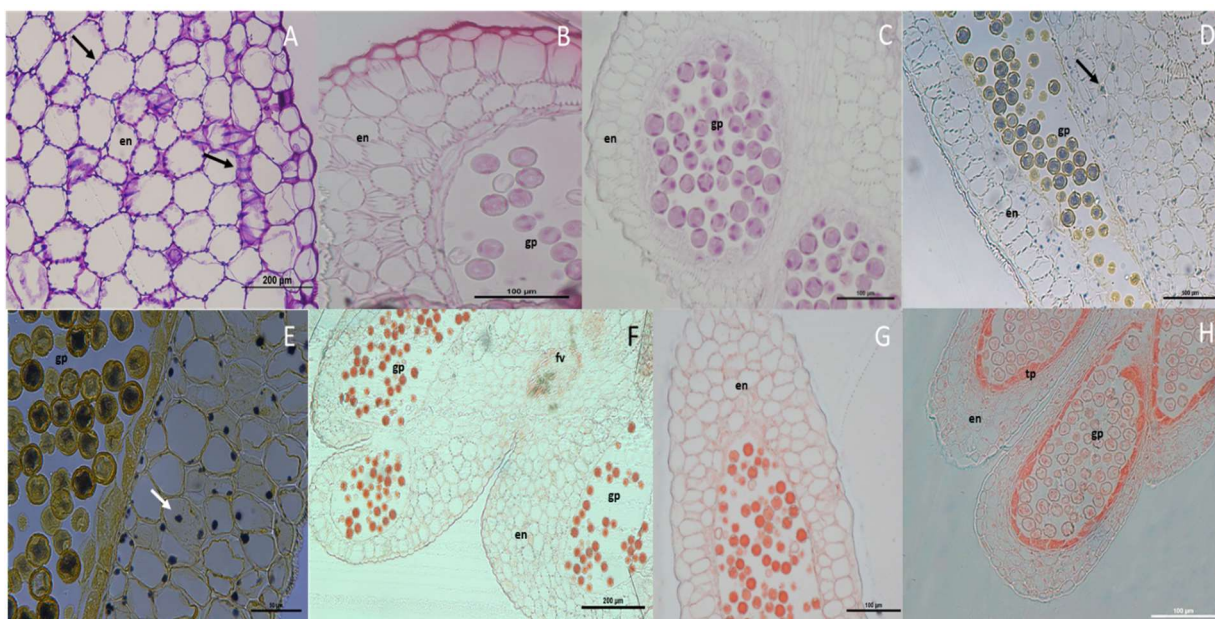


Figura 10. Corte transversal da antera evidenciado reações à coloração simples e à testes histoquímicos. Endotécio de A. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. 'Beneke', mostrando espessamentos da parede celular (setas pretas). Detalhes da coloração de anteras de B. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. e C. *C. medica* L. para observação de carboidratos. Detalhe das pontuações de amido (seta preta) no endotécio em D. *C. deliciosa* Ten. e E. *C. reticulata* Blanco. Proteínas totais em F. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, com detalhe das ráfides de cálcio no feixe vascular. Detalhe para o tapete e endotécio de G. *C. webberi* Wester e H. *C. reshni* hort. ex Tanaka. Colorações: A. Azul de toluidina; B e C. Ácido periódico e reagente de Schiff (PAS); D e E. Lugol; F-H. Xilidine Ponceau. Abreviaturas: tp, tapete; en, endotécio; fv, feixe vascular; gp, grãos de pólen.

O reagente xilidine de Ponceau exibiu a presença de proteínas nos grãos de pólen e endotécio de *C. sunki* (Figura 10F) e *C. webberi* (Figura 10G). Já na Figura

10H, para a espécie *C. reshni*, pode-se observar a reação nas células do tapete e do endotécio, mostrando maior presença de proteínas nos tecidos.

O reagente cloreto férrico não foi reagente em nenhuma das espécies analisadas. Dessa forma, foi constatado o resultado negativo em relação a compostos fenólicos.

Caracterização dos grãos de pólen

Os grãos de pólen apresentam variação na quantidade por flor, no tamanho e no formato (Figura 11 A-H). Em geral, quanto maiores as anteras dos genótipos estudados maiores as quantidades de grãos de pólen encontradas (Tabela 1).

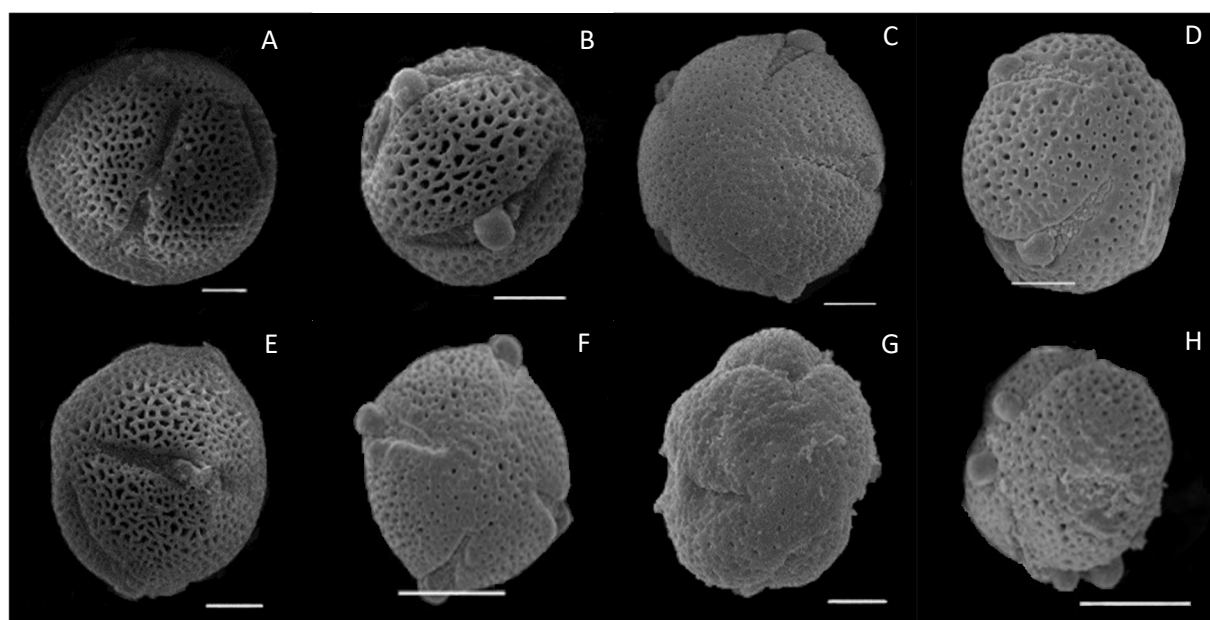


Figura 11. Grãos de pólen, em MEV. A. *Citrus medica* L., B. *C. webberi* Wester, C. *C. maxima* (Burm.) Merr., D. *C. deliciosa* Ten., E. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., F. *C. reshni* hort. ex Tanaka, G. *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanak] e H. *C. reticulata* Blanco. Escalas: A-E e G: 5 μ m; F e H: 10 μ m.

São do tipo mônades, apolares ou isopolares, de tamanho pequeno a médio, âmbito circular, oblato esferoidal a prolato esferoidal, tetracolporado a hexacolporado, colpo longo, endoabertura lalongada. A ornamentação varia entre microreticulada e reticulada, com perfurações que vão de perfuradas a heterobrocadas. Os lúmens diminuem de tamanho à medida que se aproximam dos colpos, dando lugar a uma margem com poucas ou sem perfurações.

Descrição da morfologia polínica das espécies

Espécie	Polaridade	Âmbito	Eixo polar (P) (μm) (Alcance e média \pm DP)	Eixo equatorial (E) (μm) (Alcance e média \pm DP)	Razão P/E	Tamanho	Formato	Colpos	Tipo de endoabertura	Ornamentação da parede do pólen
<i>C. medica</i>	Isopolar	Circular	19.06 - 31.48 (25.29 \pm 2.76)	19.92 - 30.52 (27.12 \pm 2.51)	0.93	Médio	Oblato esferoidal	TCL, PCL	Lalongadas	Macroreticulada, Heterobrocada
<i>C. webberi</i>	Isopolar	Circular	13.7 - 16.51 (15.49 \pm 0.81)	13.09 - 17.11 (15.19 \pm 0.92)	1.02	Pequeno	Prolato esferoidal	TCL	Lalongadas	Macroreticulada, Heterobrocada
<i>C. maxima</i>	Isopolar	Circular	14.49 - 28.21 (20.41 \pm 4.78)	15.68 - 28.64 (20.54 \pm 4.19)	0.99	Médio	Oblato esferoidal	TCL, PCL	Lalongadas	Perfurada
<i>C. deliciosa</i>	Isopolar	Circular	15.54 - 19.52 (17.74 \pm 0.85)	17.00 - 20.62 (18.56 \pm 0.90)	0.96	Pequeno	Oblato esferoidal	TCL	Lalongadas	Microreticulada, Perfurada
<i>C. reshni</i>	Isopolar	Circular	16.79 - 19.9 (18.37 \pm 0.85)	17.18 - 19.87 (18.38 \pm 0.75)	1.00	Pequeno	Esférico	TCL	Lalongadas	Microreticulada, Perfurada
<i>C. sunki</i>	Isopolar	Circular	15.06 - 21.32 (19.62 \pm 1.32)	16.57 - 20.54 (19.09 \pm 1.18)	1.03	Pequeno	Prolato esferoidal	TCL, PCL	Lalongadas	Microreticulada, Perfurada
<i>C. reticulata</i>	Isopolar	Circular	16.7 - 21.66 (19.10 \pm 1.27)	17.61 - 23.18 (20.01 \pm 1.31)	0.95	Pequeno	Oblato esferoidal	TCL	Lalongadas	Microreticulada
<i>P. trifoliata</i>	Isopolar	Circular	15.24 - 19.52 (17.80 \pm 1.19)	15.88 - 20.86 (18.46 \pm 1.28)	0.96	Pequeno	Oblato esferoidal	PCL, HCL	Lalongadas	Macroreticulada, Heterobrocada

Pode-se observar as semelhanças e diferenças nos grãos de pólen de algumas espécies estudadas. Todos os genótipos são isopolares, com excessão de *C. reshni* que se apresenta apolar, e possuem endoaberturas lalongadas. Em *C. webberi*, *C. deliciosa*, *C. reshni* e *C. reticulata* a quantidade de colpos é essencialmente quatro (tetracolporados). Já o *P. trifoliata* é a única espécie pentacolporada e hexacolporada. As perfurações nas ornamentações são maiores em *C. medica*, *C. webberi* e *P. trifoliata* e apenas perfuradas em *C. maxima* e *C. sunki*.

Discussão

Curk et al. (2016) realizaram análises citoplasmáticas em diversos acessos de citros e a partir disso foi possível observar a divisão de diferentes grupos de acordo com a maior proximidade genética. Dos genótipos estudados neste trabalho foram identificados os grupos das cidreiras (*C. medica*), dos pomeleiros (*C. maxima*) e das tangerineiras comestíveis (*C. deliciosa*) e silvestres (*C. sunki*, *C. reshni* e *C. reticulata*). Dessa forma, pode-se notar que entre os genótipos estudados, os três últimos seriam os mais próximos geneticamente. Entretanto, em todos os genótipos há a influência dos outros grupos básicos, mostrando a complexidade e proximidade das espécies.

Garcia-Lor et al. (2013) estudaram diferentes espécies da família Citrinae, entre elas *C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica* e *P. trifoliata*, que também fazem parte deste trabalho. Naquele estudo ficou claro o distanciamento de todos os genótipos em relação ao *P. trifoliata*. As demais espécies também se distanciam entre si, sendo a *C. medica* e a *C. maxima* aquelas mais próximas filogeneticamente.

Diante dos diversos estudos genéticos e filogenéticos encontrados na literatura, é de fundamental importância o conhecimento aprofundado da biologia reprodutiva das espécies a nível de flor, antera e pólen para que, conjuntamente, possam auxiliar as diversas etapas do melhoramento genético e também a classificação de plantas.

Segundo Agustí e Primo-Millo (2020), os citros têm nas regiões dos trópicos o hábito de florescerem durante a primavera, no período compreendido entre

setembro e dezembro. Os autores também citam a dependência das floradas ao estresse hídrico e à temperatura às quais as plantas são submetidas. Coelho et al. (2006) versam sobre a importância do aporte de água na floração, pegamento e maturação dos frutos. No presente trabalho as floradas foram observadas no início da primavera e no período de chuvas após um longo período de estiagem, o que está de acordo com os trabalhos pesquisados.

Buril et al. (2014), ao trabalharem com a espécie *Conchocarpus* J. C. Mikan da família Rutaceae, encontraram flores que se apresentavam com coloração alva, actinomorfas, bissexuais, contendo 5 sépalas e 5 pétalas e estames livres entre si. Judd et al. (2009) descreveram várias características observadas na família Rutaceae, tais como: presença de flores unissexuais, podendo ser encontradas em inflorescências determinadas ou reduzidas a uma flor solitária; sépalas e pétalas em números entre 4 e 5 e estames que podem ser numerosos; carpelos que podem variar entre 4 e muitos, com um único estilete; ovário súpero e placentação axial, corroborando ao encontrado no presente estudo. Mahdi et al. (2017) também encontraram flores de coloração branca, contendo filetes gamostêmones e dialistêmones, em diferentes variedades de limeira (*Citrus aurantifolia* L.). Chauhan (2015) citam a presença de um disco nectarífero na base do ovário da espécie *Feronia limonia* (L.) Swingle (Rutaceae).

Nas flores de citros, convencionalmente todas as pétalas se abrem para a liberação dos estames. Após a exposição dos órgãos reprodutores, as pétalas continuam a se afastar até assumir uma posição horizontal na flor para a liberação dos grãos de pólen. Esse mesmo comportamento foi identificado no trabalho realizado por Souza et al. (2003) ao trabalharem com *Pilocarpus pennatifolius* Lem., também pertencente à família Rutaceae.

Mert (2010), trabalhando com a espécie *Juglans regia* L., observou diferenças entre quantidade de estames, tamanho de anteras e formato de grãos de pólen, que variaram de acordo com a cultivar estudada. Dorji e Yapwattanaphun (2011) encontraram médias para número de estames variando entre 13,9 a 16 para diferentes acessos de *C. reticulata*. Gaikwad et al. (2015), ao trabalharem com a espécie *C. grandis*, quantificaram 25-35 estames por flor.

Souza et al. (2003) encontraram anteras tetrasporangiadas, com parede constituída por epiderme, endotécio e duas camadas médias, um resultado semelhante ao deste trabalho. Rozefelds (1998) e Vargas-Rodriguez et al. (2017), mostraram a importância da ornamentação de anteras dentro das famílias Nothofagaceae e Sapindaceae, respectivamente, para distinção de espécies.

A deiscência das anteras é altamente regulada por diversos fatores para aumentar ao máximo as chances de fertilização (Nelson et al., 2012). Um dos mecanismos que ocorre no processo é o espessamento da parede celular. Wilson et al. (2011) apontam a importância desse espessamento em anteras, tendo em vista que no processo de deiscência ocorre uma deposição ligno-celulósica como forma de espessamento secundário no endotécio. Esse espessamento, associado ao aumento do volume dos grãos de pólen e a desidratação da antera, promove a deiscência e liberação do pólen por meio do colapso das células estomiais.

A presença das papilas epidérmicas pronunciadas na espécie *C. medica* pode estar correlacionada diretamente a eventos morfogénéticos advindos do cultivo in vitro de anteras. Uma maior superfície de contato por meio das papilas aos meios de cultura, pode promover uma melhor absorção das auxinas e, dessa forma, possibilitar a desdiferenciação celular para cultivo de calos in vitro.

Souza et al. (2004), ao trabalharem com *Metrodorea nigra* St. Hill., espécie também pertencente à família Rutaceae, afirmaram não haver cavidades secretoras nas anteras. Em contrapartida, Bamonieri et al. (2006) realizaram a extração de óleos essenciais de flores de *Haplophyllum robustum* Bge., que também fazem parte dessa família. Thomson et al. (1976) estudaram folhas da família Rutaceae e localizaram glândulas oleíferas, com respectivas cavidades de óleo e células esquizógenas, diferentes das encontradas no presente estudo. Cresti et al. (1982) acharam exsudatos compostos por lipídeos, polissacarídeos e proteínas ao estudarem o estigma de *C. limon* L.

Meric (2009) ressaltou a presença de cristais de cálcio em anteras estudadas da tribo Inuleae (Asteraceae). O autor aponta que a presença das estruturas deve ser voltada à sustentação dos tecidos reprodutivos, que são de extrema importância para a perpetuação das espécies.

Segundo Tilton e Horner Jr. (1980), os cristais ráfide são o tipo mais comum encontrado nos tecidos florais. Kartal (2016) cita que o controle de formação de cristais de cálcio tem base genética e pode ser um caractere de diagnóstico para a taxonomia das plantas. Esses autores não encontraram cristais de cálcio nos grãos de pólen de *Ornithogalum caudatum* Aiton.

Os grãos de pólen têm suas características definidas para cada espécie, gênero e família (Mert, 2010), e, portanto, a morfologia deles pode ser utilizada como um importante descritor morfológico e ainda estabelecer a taxonomia entre espécies de uma mesma família (Soares et al., 2018). De acordo com Erdtman (1952), os grãos de pólen da família Rutaceae são classificados como euripolínicos, apresentando morfologias polínicas variáveis, como formato, medidas dos eixos equatorial e polar, tamanho, tipos e quantidade de aberturas. Wurdack (2017), ao trabalhar com *Raveniopsis* (Rutaceae), encontrou grãos de pólen com ornamentação reticulada, pentacolporado e com formato prolato-esferoidal. Chauhan (2015), estudando a espécie *Feronia limonia* (L.) Swingle (Rutaceae), achou grãos de pólen tri, tetra e pentacolporados. Já Clarke e Prakash (2001) encontraram grãos de pólen com formato esférico, pentacolporado e diâmetro de 20 µm em *Citrus australasica* F.Muell. e tetracolporado com diâmetro de 17 µm em *Citrus australis* (Mudie) Planchon.

Diversas variedades cítricas foram estudadas por García et al. (2015), que descreveram os grãos de pólen observados com o formato variando de oblato esférico a prolato esférico, endoaberturas alongadas, 3-colporado a 5-colporado e ornamentação do pólen reticulada e perfurada. Essas características corroboram os resultados encontrados neste estudo.

Conclusão

As espécies estudadas neste trabalho possuem diversas similaridades e diferenças em relação a morfologia floral. O tamanho e a morfologia das anteras diferem expressivamente entre os genótipos estudados, enquanto algumas similaridades são encontradas quando realizado um estudo comparativo dos grãos de pólen, tais como o tamanho, formato e quantidade de cólporos. Testes histoquímicos tiveram resultado similar para os tecidos da antera de todas as espécies. Estudos

florais, de anteras e grãos de pólen devem ser considerados nos programas de melhoramento genético de plantas para melhor compreensão da funcionalidade dessas estruturas e auxílio na caracterização e na regeneração in vitro de genótipos de interesse.

Referências

Agustí, M., Primo-Millo, E., 2020. Flowering and fruit set., in: Talon, M., Caruso, M., Gmitter Jr., F.G. (Eds.). The genus *Citrus*. Woodhead Publishing. p. 219-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00011-5>.

Bamonieri, A., Safaei-Ghomi, J., Asadi, H., Batooli, H., Masoudi, S., Rustaiyan, A., 2006. Essential oils from leaves, stems, flowers and fruits of *Haplophyllum robustum* Bge.(Rutaceae) grown in Iran. Journ. Essent. Oil Res., 18(4), 379-380. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699119>.

Buril, M.T., Thomas, W.W., Alves, M., 2014. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. Rodriguésia, 65(3), 701-710. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201465309>.

Chagas, E.A., Pio, R., Chagas, P.C., Pasqual, M., Bettiol Neto, J. E., 2010. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. Ciênc. Rural, 40(2), 261-266. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000200002>.

Chauhan, C., 2015. Reproductive biology of *Feronia limonia* (L.) Swingle syn. *Limonia acidissima* (Rutaceae). The Intern. Journ. of Plant Reprod. Biol., 7(2), p.128-134.

Clarke, K., Prakash, N., 2001. Floral morphology and embryology of two Australian species of *Citrus* (Rutaceae). Australian Journ. of Bot., 49(2), 199-207. <https://doi.org/10.1071/BT99054>.

Cresti, M., Ciampolini, F., Van Went, J.L., Wilms H.J., 1982. Ultrastructure and histochemistry of *Citrus limon* (L.) stigma. *Planta*, 156, 1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00393436>.

Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1262 p.

Coelho, E.F., Coelho Filho, M.A., Simões, W.L., Coelho, Y.S., 2006. Irrigação em citros nas condições do nordeste do Brasil. *Citrus R&T*, 27(2).

Cortez, A.P., Silva, D.C., Chaves, A.L.F., 2016. Manual prático de morfologia e anatomia vegetal, Editora da UESC, Ilhéus, BA. 92 p.

Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Ann. Bot.*, 117, 565-583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>.

Dettke, G.A., Santos, R.P., 2011. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Biociênc.*, 9(1), 48-74.

Dettke, G.A.; Santos, R.P., 2009. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Acta Bot. Bras.*, 23(4), 1119-1128. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400021>.

Dorji, K., Yapwattanaphun, C., 2011. Assessment of morphological diversity for local mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions in Bhutan. *Journ. of Agric. Techn.*, 7(2), 485-95.

Dutra, F.V., Gasparino, E.C., 2018. Pollen morphology of Rutaceae from Brazilian forest fragments. *Palynology*, 42(1), 43-54. <https://doi.org/10.1080/01916122.2017.1306812>.

Erdtman, G., 1952. Pollen morphology and plant taxonomy: Angyosperms. Chronica Botanica Co., Stockholm. 539 p.

Gaikwad, K.A., Haldavanekar, P.C., Parulekar, Y.R., Haldankar, P.M., 2015. Survey and characterization of pummelo genotypes (*Citrus grandis* L. Osbeck) grown in coastal region of Maharashtra. *The Ecoscan*, 371-380.

García, M.E., Reyes, N.J.F., Espeche, M.L., 2015. Aportes palinológicos de once variedades de cítricos (Rutaceae) cultivados en Tucumán (Argentina). *Lilloa*, 52(1), 19-30.

Garcia-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2013. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Ann. Bot.*, 111, 1-19. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs227>.

Jacomassi, E., Moscheta, I.S., Machado, S.R., 2010. Morfoanatomia e histoquímica de órgãos reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). *Rev. Bras. Bot.*, 33(1), 115-129. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000100011>.

Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Books, New York. 523 p.

Judd, W.S., Campbell, C., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Artmed Editora, Porto Alegre, RS. 612 p.

Kartal, C., 2016. Calcium oxalate crystals in some species of the Tribe Cardueae (Asteraceae). *Bot. Sci.*, 94(1), 107-119. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.259>.

Konarska, A., 2017. Comparative micromorphology and anatomy of flowers and floral secretory structures in two *Viburnum* species. *Protoplasma*, 254, 523-537. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-016-0972-0>.

López, H.A., Galetto, L., 2002. Flower structure and reproductive biology of *Bougainvillea stipitata* (Nyctaginaceae). *Plant Biol.*, 4, 508-514. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34134>.

Mahdi, E.F.M., Aman, A.M.A.E., 2017. Morphological characterization of lime (*Citrus aurantifolia* L.) genotypes grown at Shambat. *Univ. of Khartoum Journ. of Agric. Scienc.*, 25(2), 224-239.

McManus, J.F.A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23, 99-108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>.

Meric, C., 2009. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 51, 105-110. <https://doi.org/10.17129/botsoci.259>.

Mert, C., 2010. Anther and pollen morphology and anatomy in walnut (*Juglans regia* L.). *HortScience*, 45(5), 757-760. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.5.757>.

NCBI (National Center for Biotechnology), 2017. Taxonomy/Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (accessed 20 feb 2020).

Nelson, M.R., Band, L.R., Dyson, R.J., Lessinnes, T., Wells, D.M., Yang, C., Everitt, N.M., Jensen, O.E., Wilson, Z.A., 2012. A biomechanical model of anther opening reveals the roles of dehydration and secondary thickening. *New Phytol.*, 196, 1030-1037. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04329.x>.

O'Brien, T.P., McCylly, M.E., 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcarphi PTY., Melbourne. 345 p.

Pirani, J.R., El Ottra, J.H.L., Menezes, N.L., 2010. Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea* Aubl. e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais. Rev. Bras. Bot., 33(2), 301-318. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000200011>.

Rodrigues, L.R., Oliveira, J.M.S., Mariath, J.E.A., 2004. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. Rev. Bras. Biociênc., 2(3/4), 159-167.

Rozefelds, A.C., 1998. Stamen morphology in *Nothofagus* (nothofagaceae). Int. J. Plant Sci., 159(4), 655-667.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods, 9, 671=675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

Silva, D.F, Pio, R., Nogueira, P.V., Silva, P.A.O., Figueiredo, A.L., 2017. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. Rev. Ciênc. Agron., 48, 365-373. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20170042>.

Soares, T.L., Jesus, O.N., Souza, E.H., Rossi, M.L., Oliveira, E.J., 2018. Comparative pollen morphological analysis in the subgenera *Passiflora* and *Decaloba*. An. Acad. Bras. Ciênc., 90(2 Suppl. 1), 2381-2396. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170248>.

Soares Filho, W.S., Souza, F.V.D., Passos, O.S., Souza, A.S., Castellen, M.S., Santos-Serejo, J.A., 2011. *Citrus* e gêneros afins: Potencial de exploração no melhoramento genético dos citros, in: Lopes, M.A., Fávero, A.P., Ferreira, M.A.J.F., Faleiro, F.G., Folle, S.M., Guimarães, E.P. (Eds.) Pré-melhoramento de plantas:

Estado da arte e experiências de sucesso. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, pp. 401-412.

Souza, L.A., Moscheta, I.S., Mourão, K.S.M., Rosa, S.M., 2004. Morphology and anatomy of the flower and anthesis of *Metrodorea nigra* St. Hill. (Rutaceae). Braz. Arch. Biol. Technol, 47(1), 107-112. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000100014>.

Souza, L.A., Mourão, K.S., Moscheta, I.S., Rosa, S. M., 2003. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem.(Rutaceae). Braz. Journ. of Bot., 26(2), 175-184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000200005>.

Swingle, W.T., 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives, in: Reuther, W., Webber, H. J., Batchelor, L. D. (Eds.), The citrus industry. University of California, Riverside, pp. 190-430.

Thomson, W.W., Platt-Aloia, K.A., Endress, A.G., 1976. Ultrastructure of oil gland in the leaf of *Citrus sinensis* L. Bot. Gaz., 137, 330-340.

Tilton, V.R., Horner -Jr., H.T., 1980. Calcium oxalate raphide crystals and crystalliferous idioblasts in the carpels of *Ornithogalum caudatum*. Ann. Bot., 46, 533-539. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085951>.

Vargas-Rodriguez, Y.L., Urbatsch. L.E., Karaman-Castro, V., Figueroa-Rangel, B.L., 2017. *Acer binzayedii* (Sapindaceae), a new maple species from Mexico. Brittonia, 69, 246-252. <https://doi.org/10.1007/s12228-017-9465-5>.

Vidal, B.C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. Ann Histochem, 15, 289-296.

Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B., Yang, C., 2011. The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of Exp. Bot.*, 62(5), 1633-1649. <https://doi.org/10.3897/10.1093/jxb/err014>.

Wurdack, K.J., 2017. A new tiny-leaved species of *Raveniopsis* (Rutaceae) from the Pakaraima Mountains of Guyana. *PhytoKeys*, 91, 1-12. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.91.14763>

Zambon, V., Agostini, K., 2017. Polimorfismo floral e suas implicações em sistemas sexuais: o caso de *Solanum melongena* (Solanaceae). *Rodriguésia*, 68(4), 1187-1199. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768403>.

Zubaidah, A.H., Bahri, A.R.S., Sanusi, J., Adam, N.A., Azura, A., Hamzah, A.H., 2018. Application of scanning electron microscope in palynology study of floral resources by indo-malayan stingless bees genus *Tetragonula*. *Malaysian J. Microsc.*, 14, 95-102.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por serem recalcitrantes para o cultivo in vitro de anteras, os citros não são comumente estudados para essa finalidade. O presente estudo, porém, mostrou a importância da diversidade de meios de cultivo estudados a fim de buscar uma melhor combinação de resultados para sucesso dos experimentos que envolvam processos androgênicos in vitro.

Ajustes nos protocolos de meios de cultura devem ser realizados nas fases de indução de calos e regeneração de plantas a fim de propiciar a obtenção de plantas haploides por meio do cultivo in vitro de anteras da espécie *C. medica*.

A morfologia floral, anatomia e histoquímica das espécies de citros analisadas neste trabalho devem servir como modelo para futuros estudos base para melhoramento genético convencional.