

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**ADEQUAÇÃO DA CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO MÍNIMO PARA A
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE CITROS**

MARIANE DE JESUS DA SILVA DE CARVALHO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2013**

**ADEQUAÇÃO DA CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO MÍNIMO PARA A
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE CITROS**

MARIANE DE JESUS DA SILVA DE CARVALHO

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. FERNANDA VIDIGAL DUARTE SOUZA

CO-ORIENTADOR: Dr. WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C331

Carvalho, Mariane de Jesus da Silva de.

Adequação da condição de crescimento para a conservação in vitro de germoplasma de citros / Mariane de Jesus da Silva de Carvalho. _ Cruz das Almas, BA, 2013.

84f.; il.

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Coorientador: Walter dos Santos Soares Filho.

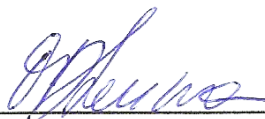
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Citrus – Cultivo – Análise. 2.Citrus – Conservação – In vitro. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.3

COMISSÃO EXAMINADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIANE DE JESUS DA SILVA DE CARVALHO



Prof.ª. Dr.ª. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF
(Orientadora)



Prof.ª. Dr.ª. Fátima Cerqueira Alvim
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC



Pesq.ª. Dr.ª. Tatiana Góes Junghans
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, minha mãe Marialva Silva, meu pai Nelson Silva e meus irmãos Nelson Filho e Roberto Silva por todo o incentivo, perseverança e amor, sempre ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória; o apoio de vocês foi fundamental para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por ter me dado força e coragem para executar o desafio que foi proposto e vencer todos os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Nelson e Marialva, pela vida, amor, dedicação e por todos os ensinamentos.

A meus irmãos Nelson Filho e Roberto e ao meu esposo Alan, pelo apoio, admiração e por todos os momentos de alegria que me proporcionaram.

À minha família, em especial meus avós Arnaldo e Maria do Carmo, meus tios Edvaldo e Marinês, que de alguma forma participaram da minha educação, e minha prima e irmã Thainara por todo o carinho.

À minha orientadora Dr^a. Fernanda Vidigal, por compartilhar seus conhecimentos, pelo carinho, dedicação, amizade e, principalmente, pelos desafios propostos que me fizeram amadurecer e me tornar uma profissional cada vez mais capacitada.

Ao pesquisador Dr. Antônio Souza, pelos ensinamentos, pela atenção, dedicação, paciência, carinho, amizade, por todos os conselhos, principalmente por me ajudar a tomar as decisões mais difíceis da minha vida e, além disso, por ter sido um pai para mim.

Ao co-orientador Dr. Walter Soares Filho, pelo incentivo e orientações.

Ao pesquisador Dr. Carlos Lédo, pela amizade, ensinamentos, incentivo, sugestões e orientações.

À Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Costa, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos pesquisadores, estagiários e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial aos amigos e amigas Emanuela, Karine, Maria Inês, Celma, Fredson, Camila, Micaela, Mariana, Ádila, Daniela, Meire, Lourival, Wallace, Laecio, Juraci, Cleilton, Silvokleio, Taliane, Honorato, Tânia, Cícera e Helder, pela amizade e contribuição no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos meus amigos em especial, Jair, Ademir, Kelly, Davi e Lucas, pela constante motivação, ajuda e amizade, sempre me incentivando e torcendo por mim.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade desde o período de graduação, por disponibilizar toda estrutura física e apoio financeiro, imprescindíveis para o desenvolvimento dos trabalhos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro à bolsa de estudos.

À todos que convivi e tive oportunidade de conhecer durante o mestrado e que de alguma forma contribuíram para a elaboração desta dissertação e minha formação profissional.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO..... 1

Capítulo 1

PROCEDIMENTOS UNIVARIADOS E MULTIVARIADOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DO LIMOEIRO 'RUGOSO DA FLÓRIDA'..... 24

Capítulo 2

INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE CULTIVO NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CITROS..... 48

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 71

ANEXO..... 73

ADEQUAÇÃO DA CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO MÍNIMO PARA A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE CITROS

Autora: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-Orientador: Walter dos Santos Soares Filho

RESUMO: A conservação *in vitro* é uma estratégia complementar à conservação tradicional dos citros. Em vista disto, este trabalho teve por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo para conservação *in vitro* de genótipos de citros. Os fatores considerados foram concentração do meio básico WPM, concentração da sacarose, ambiente de cultivo e análises estatísticas univariada e multivariadas. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com microestacas de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura WPM em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4) suplementado com 0; 12,5; 25 e 50 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e mantidas em sala de crescimento sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas durante 360 dias. No segundo experimento, microestacas de plântulas de 10 acessos do BAG citros (Banco Ativo de Germoplasma de Citros) foram inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura WPM suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e mantidas em três ambientes de incubação por 180 dias. Os experimentos foram instalados no delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições em esquema fatorial 3 x 4 e 10 x 3, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise univariada e multivariada, que mostraram ser ferramentas eficientes para estudos de conservação *in vitro*. O meio WPM, na concentração original e complementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose foi eficiente para a redução do metabolismo de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. O ambiente de cultivo com temperatura de 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 10 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 h se mostrou o mais indicado para a conservação dos acessos avaliados, tendo sido eficiente para se estabelecer condições de crescimento mínimo e manter as plantas saudáveis.

Palavras-chave: *Citrus*, crescimento mínimo, análise multivariada.

OPTIMIZATION OF SLOW GROWTH CONDITIONS TO IN VITRO CONSERVATION OF CITRUS GERMPLASM

Author: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-Adviser: Walter dos Santos Soares Filho

ABSTRACT: The *in vitro* conservation is an efficient alternative and a complementary strategy to traditional conservation of citrus. This study aimed to establish slow growth conditions for *in vitro* conservation of citrus genotypes. The factors considered were the basic medium WPM concentration, sucrose concentration, incubation condition and univariate and multivariate analyses. Two experiments were performed. In the first one microcuttings from seedlings of 'Rugoso Florida' lemon were inoculated in test tubes with WPM basal medium at different concentrations (1/1, 1/2 and 1/4) supplemented with 0, 12.5, 25 and 50 g.L⁻¹ of sucrose, solidified with 7.0 g.L⁻¹ of agar and maintained in a growth chamber under controlled conditions for 360 days. In the second experiment, microcuttings of seedling from ten citrus accessions from AGB (Active Germplasm Bank of Citrus) were inoculated in test tubes with WPM supplemented with 25 g.L⁻¹ of sucrose, solidified with 7 g.L⁻¹ agar and maintained under three different incubation conditions for 180 days. The experiments were performed in a completely randomized design with 15 replications in factorial scheme (3 x 4) and (10 x 3), respectively. The univariate and multivariate analyses were performed and provide useful information to studies on *in vitro* conservation. The WPM medium in the original concentration supplemented with 25 g.L⁻¹ of sucrose was effective in reducing the metabolism of the plants from 'Rugoso Florida' lemon. The incubation condition with the temperature of 22 ± 1 °C, 10 µmol.m⁻².s⁻¹ of density light and photoperiod of 12h was the most suitable for *in vitro* conservation of the evaluated accessions and was efficient to establish minimum growth conditions and healthy plants.

Key-words: *Citrus*, minimal growth, multivariate analysis.

INTRODUÇÃO

Recursos Genéticos de Citros e sua Importância Econômica

O gênero *Citrus* e afins (*Poncirus*, *Fortunela*) pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae. Segundo Almeida et al. (2011), as espécies cítricas são originárias das áreas subtropicais e tropicais da Ásia, de onde se disseminaram à outras partes do mundo. Esses mesmos autores afirmaram que fora do habitat original essas espécies encontraram condições mais favoráveis na faixa subtropical, embora seja nos trópicos onde se verificou a maior evolução no seu cultivo. Para Soares Filho et al. (1998) o gênero *Citrus* representa o ponto mais alto de um longo período evolutivo. Sua origem é atribuída particularmente ao Leste da Índia, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e África, sendo que a mais antiga região de cultivo dos citros compreende o Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanmar, antiga Birmânia, onde tiveram origem as tangerinas, toranjas e limas.

O gênero *Citrus* possui ampla diversidade genética e sua estrutura pode diferir de modo significativo. Conforme estudos moleculares de Fang e Roose (1997), entre as espécies cítricas, o grupo das tangerinas é aquele que possui a maior diversidade genética, enquanto que outros representantes do subgênero *Citrus*, como os pomelos (*C. paradisi* Macf.), as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck), os limões [*C. limon* (L.) Burm, f.] e as limas (*C. aurantiifolia* Christm.Swingle) apresentam menor variabilidade genética, em decorrência da alta seleção artificial imposta e da propagação vegetativa realizada durante a história de cultivo.

As mutações espontâneas tiveram um papel fundamental no processo evolutivo das plantas de propagação vegetativa, sendo que práticas como a enxertia e a estaquia, comumente utilizadas em árvores frutíferas, facilitaram a conservação e acumulação de mutações, particularmente aquelas associadas à

esterilidade, que seriam eliminadas em caso de reprodução sexual. Além disso, a embriônia nucelar, de ocorrência comum em *Citrus* e gêneros afins, como *Poncirus* e *Fortunella*, a partir do desenvolvimento de embriões apogâmicos, possibilitou a preservação de muitas mutações espontâneas de surgimento anterior às técnicas de propagação vegetativa. A maioria das variedades cítricas comerciais, por exemplo, surgiu como decorrência de algum tipo de mutação natural sendo verificadas baixa produtividade de frutos, caracteres foliares atípicos, ou frutos anormais, porém também ocorrem muitas mutações espontâneas de elevado valor (SOARES FILHO, 1998).

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a relevante importância econômica e social que a atividade tem para a economia do País. Há décadas o Brasil ocupa posição de destaque na citricultura liderando, atualmente, a produção mundial de frutas que supera 20 milhões de toneladas (FAO, 2012). Além disso, é o maior exportador de suco concentrado e congelado de laranja doce (ALMEIDA et al., 2011), cujo valor das exportações desse e de outros derivados tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (EMBRAPA, 2012).

Citrus é o gênero de importância mais relevante da família Rutaceae, uma vez que representa em muitas regiões a principal fonte de renda. O setor cítrico brasileiro somente no Estado de São Paulo gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos. Nesse aspecto, há de se considerar a importância da citricultura para a economia de regiões pobres como o Nordeste (EMBRAPA, 2012).

A produção brasileira de laranja doce apresenta expressiva concentração com respeito às variedades copas e porta-enxertos utilizados. Estima-se que o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osb.) responde por mais de 85% dos porta-enxertos, sendo a laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] a variedade-copa predominante (ALMEIDA et al., 2011). Essa situação expõe a citricultura brasileira a uma vulnerabilidade e a um alto custo de manutenção por favorecer a rápida proliferação de pragas e doenças. A presença quase única da combinação laranja 'Pêra' / limão 'Cravo' nos pomares torna urgente a diversificação de variedades. Visando contornar essa situação tem-se enfatizado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura o estudo e a seleção de espécies e variedades adaptadas a ambientes tropicais. Esse BAG

conta com 813 acessos, incluindo espécies, variedades e cultivares do gênero *Citrus* (L.) e afins, bem como híbridos interespecíficos e intergenéricos. Essa ampla variabilidade genética serve de suporte ao programa de melhoramento genético de citros executado por aquela Instituição (PASSOS et al., 2007).

A cultura de citros é alvo constante de inúmeras pragas e doenças de origem fitossanitária que prejudicam a produtividade e a qualidade dos frutos. Diversas doenças vêm surgindo em detrimento da expansão citrícola, a exemplo das causadas por fungos como: pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinoe* spp.), melanose (*Diaporthe citri*), rubelose (*Erythricium salmonicolor*), podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.); as doenças causadas por vírus, como a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*); e as doenças bacterianas, como a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa*), o cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e, mais recentemente, o huanglongbing (HLB), cujo agente causal é a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., também conhecido como *greening*, que se tornou uma grande ameaça aos pomares, além da morte súbita dos citros (MSC) e o declínio dos citros, doenças de etiologia desconhecida (EMBRAPA, 2012; FUNDECITRUS, 2012).

Na última década, quatro doenças (cancro cítrico, clorose variegada dos citros, morte súbita e a mais recente e ameaçadora huanglongbing) provocaram a erradicação de 39 milhões de plantas dos pomares citrícolas dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Quando adicionadas as perdas provocadas por pragas, o total de plantas erradicadas chega a 40 milhões (NEVES et al., 2011).

A necessidade de desenvolver programas de melhoramento de citros está diretamente relacionada a necessidade de ampliação das bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente (MACHADO et al., 2005).

Conservação de Recursos Genéticos de Citros

Os recursos genéticos vegetais compreendem as variedades tradicionais (existentes em áreas menos influenciadas pelas variedades exóticas), as variedades melhoradas (oriundas do melhoramento genético), as linhas avançadas e as espécies nativas (incluindo os parentes selvagens de espécies

cultivadas) que representam uma fonte imensurável de variabilidade genética (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

A conservação dos recursos genéticos vegetais tem sido uma questão prioritária em vários países (WITHERS; ENGELMANN, 1998), uma vez que a disponibilidade de variabilidade genética vegetal é fundamental à continuidade de programas de melhoramento, para obtenção de materiais resistentes e geneticamente superiores para o aumento da produtividade.

A conservação do germoplasma pode ser realizada *in situ* (manutenção de coleções nos seus próprios locais de ocorrência) ou *ex situ* (em locais e condições distintas aos de ocorrência natural). A conservação *in situ* objetiva conservar os habitats naturais nos quais a diversidade genética existe, incluindo áreas selvagens e de proteção ambiental, reservas e sistemas agrícolas tradicionais. Já a conservação *ex situ* corresponde a retirada dos recursos genéticos de seu ambiente de ocorrência natural e sua transferência para condições de armazenamento artificiais que podem ir desde a conservação em condições de campo, como em laboratório, por curtos ou mesmo longos períodos de tempo (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

- **Banco de germoplasma de citros**

A diversidade genética é a base do melhoramento genético de qualquer espécie e por isso deve ser protegida contra eventuais perdas, garantindo assim sua utilização para o aumento da produtividade.

O germoplasma refere-se ao conjunto de genótipos que podem doar genes para determinada espécie, sendo a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento de plantas. O local onde o germoplasma é conservado chama-se banco de germoplasma, que funciona como um reservatório de genes, os quais podem ser utilizados por melhoristas para solucionar problemas específicos, como, por exemplo, a resistência a um determinado patógeno. Sendo assim, é fundamental para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético (RONZELLI JÚNIOR, 1996).

A conservação *ex situ* em condições de campo tem sido o método mais utilizado para as espécies de propagação vegetativa, em virtude dos problemas

relacionados com a conservação por sementes. Entre as desvantagens da conservação em condições de campo estão as perdas ocasionadas por pragas, condições ambientais adversas e ações antrópicas, além de apresentarem altos custos de manutenção e também requererem consideráveis áreas de terra, mão de obra e manejo (PANIS; LAMBARDI, 2006; SOUZA et al., 2009). Conforme lista da Bioversity, coleções *ex situ* estão distribuídas em diversos países (Tabela 1).

Tabela 1. Coleções *ex situ* de *Citrus* conforme a Bioversity.

Espécies	Nº acessos	Nº instituições	Instituições	Países
<i>Citrus spp.</i>	20924	114	Institutos de pesquisa agrícola e universidades de vários países	Albânia, Argélia, Antigua, Austrália, Barbados, Barbuda, Bolívia, Brasil, China, Colômbia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Equador, Fiji, França, Gabão, Alemanha, Gana, Grécia, Honduras, Índia, Indonésia, Itália, Jamaica, Japão, Quênia, Madagascar, Malawi, México, Marrocos, Moçambique, Nepal, Nova Zelândia, Nicarágua, Nigéria, Panamá, Papua Nova Guiné, Peru, Filipinas, Portugal, Porto Rico, Santa Lúcia, Seychelles, Serra Leoa, África do Sul, Espanha, Sri Lanka, Sudão, Suriname, Taiwan, Tanzânia, Tailândia, Trinidad e Tobago, Tunísia, Turquia, EUA, Venezuela, Vietnã.
<i>Australian spp.</i>				
<i>C. australasica</i>	26	7	CSIRO, Citrus Research Institute, Universidade de Cukurova, Universidade da Califórnia, USDA –ARS	Austrália (Merbein), China, Espanha (Valencia), Turquia, EUA (Orlando e Riverside)

Continua...

Tabela 1. Continuação

<i>C. australis</i>	8	3	IVIA, Universidade de Espanha (Valência), Turquia, EUA Cukurova, Universidade da (Orlando e Riverside) California, USDAARS
<i>C. gracilis</i>	0	0	
<i>C. glauca</i>	8	8	CNPMF, CSIRO, SRA/INRA- CIRAD, IVIA, Universidade de Cukurova, Universidade da California, USDA –ARS Brasil, Austrália (Merbein), França, Turquia, EUA (Riverside e Orlando)
<i>C. garrawayi</i>	0	0	
<i>C. inodora</i>	10	4	Universidade de Cukurova, Espanha (Valência), Turquia, EUA Universidade da California, (Riverside) USDA-ARS

Instituições: CSIRO (Commonwealth Scientific & Industrial Research Organisation), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), US Department of Agriculture (USDA-ARS), Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMF), Agricultural Research Station (SRA)/National Institute of Agricultural Research and Centre International of Cooperative Research (INRA-CIRAD). Fonte: HAMILTON, 2007.

Na atualidade, os recursos genéticos de citros são mantidos na forma de bancos de germoplasma a campo, por instituições de pesquisa, ou em jardins botânicos (DURAN-VILLA et al., 2005). Os três principais bancos ativos de germoplasma (BAG) de citros existentes no mundo encontram-se no Brasil: o BAG do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, localizado em Cordeirópolis (SP), com 2000 acessos (MACHADO et al., 2011); o da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas (BA), que é a segunda maior coleção de germoplasma de citros do país, com 813 acessos (PASSOS et al., 2007); e do Programa Fruticultura do IAPAR que é o terceiro maior banco de germoplasma de citros do Brasil, com 509 acessos (IAPAR, 2013).

Esses bancos de germoplasma abrangem diferentes espécies e cultivares cítricas como laranjas, tangerinas, limões, limas, cidras, pomelos, toranjas e híbridos, apresentando um papel fundamental nos trabalhos de diversificação de cultivares copa e porta-enxerto e, ultimamente, nos de hibridação, fornecendo os parentais necessários à obtenção de variedades dentro do programa de melhoramento genético Institucional (SOARES FILHO et al., 2003). Em nível nacional, a coleção do Centro APTA Citros Sylvio Moreira e, a nível internacional, a coleção da U. S. Date and Citrus Station, Califórnia, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), têm contribuído para a introdução de variedades, híbridas ou não, para a geração de híbridos produzidos pelo programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura e para a seleção de indivíduos promissores (SOARES FILHO, 2006).

Os estudos envolvendo bancos de germoplasma têm por objetivo a obtenção de cultivares resistentes a doenças e que possuam potencial produtivo para se constituírem em novas cultivares comerciais (CCSM/IAC, 2000). Apesar da grande diversidade de citros conservados nos bancos de germoplasma, poucas cultivares são conhecidas (MACHADO et al., 2005; 2011). Com isso, os pomares comerciais geralmente são constituídos de uma ou poucas cultivares, tornando-os vulneráveis.

A coleção do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros, do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC, em Cordeirópolis, SP, é composta de “clones velhos” e “clones novos” que são mantidas em campo, utilizando, quando compatíveis, o limoeiro ‘Cravo’ ou a tangerina ‘Cleópatra’ como porta enxerto, sendo três plantas para cada acesso (CARVALHO, 1999). Essa coleção é um dos

mais completos acervos citrícolas do mundo, sendo que do seu total, 42% são de laranjas, 15% de tangerinas, 11% de limões, 4% de limas ácidas, 4% de pomelos, 3% de toranjas, 2% de cidras, 9% de outros citros e 10% de híbridos. Essa diversidade genética tem servido como sustentáculo para o desenvolvimento da citricultura paulista e contribuído como fonte de recursos genéticos para a solução de problemas relacionados à sanidade das plantas cítricas, na oferta de variedades comerciais, de copa e porta enxerto, e como fonte de estudos para pesquisadores da área. Trabalhos realizados no Banco Ativo do CCSM/IAC proporcionaram o desenvolvimento de diversas variedades comerciais de importância na citricultura paulista. Além disso, a quase totalidade das plantas cítricas existentes no Brasil foi originada de forma direta ou indireta de clones de sua coleção (CCSM/IAC, 2000).

No sistema protegido do BAG de citros, criado no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” para preservar a coleção, foi construída uma estufa de 2.400 m² para abrigar 30% da coleção, aproximadamente, onde são feitas cópias das plantas preservadas no telado. Geralmente plantas perenes, como a laranjeira, não são mantidas em estufas e permanecem em campo aberto. Seu objetivo é preservar materiais indispensáveis à pesquisa agrícola, frente aos desafios fitossanitários permanentes do setor citrícola, em especial o *greening* (PAINEL AGRONÔMICO, 2012).

No Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura, os acessos são conservados sob condições de campo, na razão de 2 a 12 plantas por acesso. Esse BAG reúne diversas espécies: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Fortunella* spp., *Microcitrus* spp., *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten., *Atalantia monophylla* DC., *Merrillia caloxylon* (Ridl.) Swing., *Feroniella oblata* Swing., *Feronia limonia* (L.) Swing., *Micromelum tephrocarpa*, *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wils. No campo, o BAG, está dividido em quatro áreas, disposto por espécies e enxertados nos porta-enxertos limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Ten. et Pasq.), citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) ‘Swingle’ e tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tan.) (PASSOS et al., 2007).

Essa coleção do BAG de citros tem sido utilizada como elemento de suporte ao Programa de Melhoramento Genético (PMG) da mesma Instituição, tanto no que concerne à identificação de variedades promissoras nele

introduzidas, copas e porta-enxertos, como no apoio a trabalhos de hibridação visando a criação de novas cultivares. Nesse sentido, os trabalhos de caracterização têm se concentrado em caracteres de interesse agrônomo, compreendendo: tolerância à seca, tolerância ao alumínio, tolerância/resistência à gomose de *Phytophthora*, tolerância/resistência à “tristeza”, grau de poliembrionia, e tem sido também utilizado como fonte de introdução de variedades promissoras, copas e porta-enxertos, em diversas regiões do País, contribuindo, assim, para a diversificação do pomar citrícola nacional, altamente concentrado na combinação laranja ‘Pêra’ / limão ‘Cravo’ (SOARES FILHO, 1998; PASSOS et al., 2007).

O Banco Ativo de Germoplasma de citros (BAG citros), em Londrina-PR, do Instituto Agrônomo do Paraná, conta com 509 acessos, provenientes de instituições de pesquisa do Brasil e do exterior, e coletados de pomares comerciais e domésticos do Paraná. Esse BAG citros, além da recomendação de cultivares, após avaliação criteriosa do comportamento do material em relação às características agrônomicas, como produção, qualidade dos frutos e resistência a doenças, principalmente o cancro-cítrico, permite a seleção de progenitores com as características que se deseja incorporar em cruzamentos (TAZIMA, 2009). Os estudos desenvolvidos pelo Programa Fruticultura do IAPAR têm sido a base para a implantação e condução de pomares de laranjas no Norte e Noroeste do estado, estabelecendo a citricultura no Paraná, que já passou a ser exportador de frutas *in natura* e de suco de laranja (IAPAR, 2013).

Bancos de germoplasma em condições de campo têm como desvantagem a sua vulnerabilidade a uma série de fatores, tais como a erosão genética devido a não adaptação das espécies e variedades a novas condições ambientais, à contínua exposição ao ataque de pragas, doenças e predadores eventuais, intempéries climáticas, problemas edáficos e vandalismo (BRISON et al., 1995; EIRA, 2001). Além disso, o tradicional método de conservação de germoplasma no campo requer um elevado custo financeiro operacional, notadamente em relação à grande quantidade de mão de obra empregada no plantio inicial e subsequentes replantios, bem como nas capinas, fertilização e tratamentos contra pragas e doenças (SOUZA et al., 2009).

Todos estes aspectos priorizam o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação dos recursos genéticos de citros. Neste sentido, a biotecnologia oferece possibilidades de grande interesse como complemento ou alternativa à

conservação tradicional dos citros, como a conservação *in vitro* e a criopreservação.

- **Conservação *in vitro* de recursos genéticos de citros**

Diversas estratégias biotecnológicas, baseadas na cultura *in vitro* de células, de tecidos e de órgãos vegetais, têm sido desenvolvidas e aprimoradas como alternativa aos problemas da conservação convencional. Essas técnicas superam as diversas limitações inerentes aos métodos convencionais de conservação *ex situ* e *in situ*, e facilitam também o intercâmbio de recursos genéticos vegetais livres de pragas (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

A conservação *in vitro* consiste na manutenção de plantas micropropagadas em condições de crescimento mínimo por meio da intervenção de diferentes fatores do cultivo, como temperatura, radiação fotossintética ativa e fotoperíodo, e adição de retardantes osmóticos e hormonais ao meio de cultura (CANTO et al., 2004), prolongando, dessa forma, o intervalo entre os subcultivos e reduzindo assim a necessidade de mão de obra e de reagentes e, conseqüentemente, diminuindo os riscos de eventuais contaminações fúngicas e/ou bacterianas (LEMOS et al., 2002) assim como o surgimento de variação somaclonal, decorrentes da excessiva manipulação do tecido vegetal (SANTOS, 2008). É válido ressaltar que a utilização rotineira desse sistema para conservar recursos genéticos vegetais pode ser limitada em virtude da interação genótipo-ambiente, bem como por falta de informação acerca da estabilidade genética do material conservado (NEGRI et al., 2000).

As coleções *in vitro* podem ser consideradas como uma duplicata de segurança, uma das premissas básicas para a conservação de germoplasma vegetal *ex situ*. Contudo, como destacado anteriormente, a necessidade de subcultivos periódicos torna essa técnica onerosa e com significativa demanda por mão de obra especializada. A redução do crescimento das plantas, sem comprometer sua posterior viabilidade para resgate é uma das estratégias mais pesquisadas para tornar a conservação *in vitro* eficiente.

Diversos tipos de explantes podem ser utilizados, tais como: ápices caulinares, meristemas, propágulos vegetativos em vários estádios de desenvolvimento (brotos, gemas axilares, segmentos nodais), protoplastos,

suspensão de células, cultura de calos e plântulas (RAZDAN, 2003). Os explantes mais indicados para a conservação *in vitro* são os de origem meristemática, uma vez que suas células são mais resistentes às baixas temperaturas e esses tecidos também apresentam maior estabilidade genética e qualidade fitossanitária (AMARAL et al., 2007). Entretanto, a conservação *in vitro* a partir de explantes obtidos de sementes cultivadas em meio de cultura permite que a variabilidade genética da espécie seja representada. O explante a ser conservado vai depender de uma série de fatores, tais como espécie, forma reprodutiva da espécie, amostragem de população natural, *status* em relação a condição de ameaçada ou não, dentre outros.

Em *Citrus*, a poliembrionia é um fenômeno comum em muitas espécies. As sementes geralmente possuem um único embrião de origem sexual, sendo os demais apogâmicos, formados a partir de células do nucelo. Diante do exposto, o estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro* de espécies cítricas deve priorizar embriões formados a partir de células nucelares, com constituição genética idêntica à planta mãe. O ápice meristemático de plantas jovens é outra fonte de explante que permite a limpeza de doenças e patógenos sistêmicos. No entanto, a técnica não é empregada satisfatoriamente para muitas espécies arbóreas porque o meristema não se regenera completamente, impedindo a formação da planta em todas as suas características (NAVARRO, 1981). Para citros não foram encontrados trabalhos dessa natureza na literatura, o que dificultaria o estabelecimento *in vitro* das espécies monoembriônicas ou com baixa poliembrionia.

A fim de evitar perdas e assegurar a preservação e disponibilização de todos os acessos do BAG citros para o programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura deu-se início ao estabelecimento *in vitro* de diferentes acessos conservados no campo, demandando o aprimoramento de técnicas para a conservação *in vitro* dos mesmos.

O meio de cultura a ser utilizado para conservação do germoplasma é um aspecto muito importante e seu potencial é expresso de forma diferenciada entre as espécies. Existem várias formulações de meios nutritivos, entre as mais utilizadas estão: o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), o B5 (GAMBORD et al., 1968), e o SP (BARRUETO CID, 2005). Normalmente, a escolha de um meio nutritivo é baseada na literatura e na

experiência com cada espécie vegetal. O meio WPM tem sido amplamente utilizado com sucesso para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001), apresentando bons resultados na conservação *in vitro* de algumas espécies (CAMILLO et al., 2009; SILVA et al., 2012). Atualmente, esse meio básico vem sendo utilizado para o estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, proporcionando resultados muito promissores (SOUZA et al., 2011).

Requerimentos nutricionais específicos, vão depender da espécie ou do explante, e dentre os ingredientes dos meios nutritivos mais importantes para a cultura de tecidos estão os sais, sacarose, vitaminas, inositol, hormônios, misturas complexas e ágar (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

Os agentes osmóticos, tais como sorbitol, manitol e sacarose, ao serem adicionados ao meio de cultura, promovem a remoção do excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, e em razão disso o crescimento da cultura ocorre de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). A utilização de elevadas concentrações desses agentes pode reduzir a viabilidade das culturas após o período de armazenamento, o que pode causar toxidez, elevada oxidação ou problemas de excessivo potencial osmótico (FORTES; PEREIRA, 2001; LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007; MACIA, 2011; SÁ et al., 2011). Para Lemos (2010), o tipo e a concentração dos carboidratos no meio de cultura podem influenciar a morfogênese de tecidos vegetais. Welander et al. (1989) sugerem que os açúcares presentes na seiva do floema das plantas têm sido positivamente relacionados com a melhor fonte de carbono usada nos meios de cultura. Zimmermann e Ziegler (1975) afirmam que a sacarose é o açúcar mais comum encontrado na seiva do floema da maioria das plantas e devido a isso é a principal fonte de carbono utilizada em culturas de tecidos.

A sacarose é um dos carboidratos mais usados na preparação de meios nutritivos por ser um composto essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta cultivada *in vitro*, ou do explante, é limitada. Sua concentração normalmente varia de 2% a 3%; no entanto, pode ser usada em concentrações maiores, de até 6%, como no caso de embriões, na indução de bulbilhos de alho ou na tuberização em raízes de mandioca (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

A redução da temperatura no ambiente de conservação é uma das

estratégias mais utilizadas para manter as plantas em crescimento mínimo, uma vez que reduz o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007). As condições de cultivo no laboratório de cultura de tecidos visam manter a temperatura o mais estável possível. Em geral, a faixa de temperatura a ser usada pode variar entre 23 °C e 27 °C. Embora não seja frequente, existem laboratórios que usam temperaturas diferentes durante o dia e a noite: 26 °C e 20 °C, respectivamente (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

Para reduzir a taxa de crescimento e assim aumentar o intervalo entre os subcultivos é necessário reduzir a temperatura da cultura entre 6 °C e 10 °C para espécies de clima temperado e entre 15 °C e 25 °C para espécies de clima tropical. Isso estenderá o intervalo de subcultivo por um período entre 1 e 2 anos (BANERJEE; DE LANGHE, 1985), facilitando o manejo da coleção.

Essa técnica tem apresentado sucesso em diversas espécies. Alguns exemplos de espécies conservadas *in vitro* sob condições de baixa temperatura são: banana, a partir de brotos conservados por até 615 dias a 16 °C (VAN DEN HOUWE et al., 1995); maçã, a partir de brotos apicais e segmentos nodais simples conservados por 12 a 18 meses a 4 °C (NEGRI et al., 2000); banana diploides a partir de plantas sem raízes e pseudocaule podado durante 450 dias a 17 °C (OLIVEIRA et al., 2000); batata (*Solanum tuberosum L.*), a partir de microestacas conservadas durante 16 meses a 6 °C (SARKAR et al., 2001), cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), a partir de brotos conservados por 12 meses a 15 °C (LEMOS et al., 2002); menta (*Mentha spp.*) (diploides, tetraploides e octaploides) a partir de explantes nodais e apicais conservados em temperatura de 20 °C e 10 °C por 3 semanas e 2 °C por 6 meses (ISLAM et al., 2003) e orquídea (*Vanilla spp.*), a partir de brotos, conservados por 360 dias a 2 °C (DIVAKARAN et al., 2006).

A maioria dos trabalhos sobre conservação *in vitro* se refere ao uso de baixas temperaturas (igual ou inferior a 20 °C) como principal estratégia para redução de crescimento. No entanto, pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de manter o material vegetal sob temperaturas próximas, ou mesmo semelhante, àquelas utilizadas nas salas de crescimento, associadas ou não com substâncias reguladoras de crescimento e agentes osmóticos (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010). Algumas das espécies que são conservadas à

temperatura semelhante às utilizadas nas salas de crescimento são: café, utilizando embriões zigóticos como explante, sendo conservados por 24 meses a 25 °C (NAIDU; SREENATH, 1999); batata (*Solanum Tuberosum* L., cv. Macaca), utilizando microestacas como explantes, conservadas por 9 meses a 25 °C ± 2 °C (FORTES; PEREIRA, 2001) e *Lilium longiflorum* e *L. henryi*, utilizando bubinhos como explante, conservados por um período 28 meses a 25 °C (BONNIER; VAN TUYL, 1997).

Outros fatores que devem ser levados em consideração nas condições de cultivo são alteração da intensidade e duração do período de luz. O fotoperíodo necessita ser previamente ajustado para 12/12, 14/10 ou 16/8 (relação de horas de luz/escuro) (MORINI et al., 1991). A irradiância, normalmente utilizada nas salas de crescimento, no nível das placas ou tubos de ensaio, geralmente, é de aproximadamente 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Essa energia é suficiente para os requerimentos normais de carbono das plantas, uma vez que a outra parte é complementada pela sacarose do meio nutritivo (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

Na conservação *in vitro*, geralmente são utilizadas técnicas estatísticas univariadas para avaliar a eficiência dos tratamentos testados. Contudo, o estudo das variáveis isoladamente pode não ser suficiente para modelar o fenômeno biológico em questão, uma vez que se perdem importantes informações ao se desconsiderar as correlações existentes entre as variáveis. Nesse sentido, torna-se importante avaliar o uso de técnicas de análise multivariada em estudos de conservação *in vitro*, visto que analisa simultaneamente duas ou mais variáveis (HAIR et al., 2005), levando em consideração as correlações existentes entre elas, permitindo que inferências em um nível de significância conhecido sejam feitas sobre o conjunto das características estudadas (JOHNSON; WICHERN, 1992).

Dessa forma o objetivo desse trabalho foi adequar fatores como o meio básico utilizado, neste caso o WPM, a concentração de sacarose, a condição de incubação, assim como o uso de ferramentas estatísticas univariada e multivariadas com a finalidade de estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* que possibilite a implantação de uma cópia de segurança do BAG citros que se encontra em condições de campo.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.; VEIGA, R. F. de A.; TOMBOLATO, A. C. F.; BARBOSA, W.; CONAGIN, A. Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de *Amarilis* (*Hippeastrum* Herb.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 113-120, 2007.

ALMEIDA, C. O; PASSOS, O. S; CUNHA SOBRINHO, A. P; SOARES FILHO, W. S. **Citricultura Brasileira**: Em busca de novos rumos, desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 160p., 2011.

BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A. L. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 4, p. 351-354, 1985.

BARRUETO CID, L. P. El cultivo de tejidos. In: PRIETO, H.; JORDAN, M.; BARRUETO CID, L. P.; CORDEIRO, M. C. R.; DURZAN, D. J. **Biotecnologia vegetal**. Santiago-Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuária. 2005. p. 35.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.

BONNIER F. J. M.; VAN TUYL, J. M. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 49, p. 81-87, 1997.

BRISON, M.; BOUCAUD, M. T. de; DOSBA, F. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interespecific *Prunus* rootstocks. **Plant Science**, Limerick, v. 105, n. 2, p. 235-242, 1995.

CAMILLO, J; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de**

Plantas Medicinais - Brazilian Journal of Medicinal Plants, Botucatu: Fundação Instituto de Biociências, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. de C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARVALHO, S. A. Banco ativo de germoplasma de citros do Instituto Agronômico de Campinas. In: WORKSHOP PARA CURADORES DE BANCOS DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1997. **Anais...** Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p.97-99.

CCSM/IAC. Centro de referência em pesquisa e difusão de tecnologia citrícola. **O Agrônomo**, Campinas, v. 52, n. 2/3, p. 5-10, 2000.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.110, p.175-180, 2006.

DUMET, D; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.

DURÁN-VILA, N.; ORTEGA, C.; OLIVARES-FUSTER, O.; NAVARRO, L. Crioconservación de germoplasma de cítricos. **Phytoma**, Espanha, n. 170, p. 24-26, 2005.

EIRA, M. T. S. Conservação de germoplasma na forma de sementes, *in vitro* e criopreservação. In: SIRGEALC – SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM ARACHIS; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM RECURSOS GENÉTICOS FLORESTAIS, 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 30-32.

EMBRAPA. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/index.htm>. Acesso em: 24 setembro 2012.

FAO. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>. Acesso em: 14 dezembro 2012.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related *Citrus* cultivars with intersimple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Amsterdam, v.95, p.408-417, 1997.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, out. 2001.

FUNDECITRUS. Disponível em:
[http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/relatorio_2010\(1\).pdf](http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/relatorio_2010(1).pdf). Acesso em: 28 setembro 2012.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, 1968, vol. 50, no. 1, p. 151-158.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 593p.

HAMILTON, K.N. **Ex situ conservation of Australian *Citrus* species: investigations on seed biology, cryopreservation and *in vitro* culture**. Australia, 2007. 61p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Griffith University, Brisbane.

IAPAR Disponível em:
<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=313>. Acesso em: 09 janeiro 2013.

ISLAM, M. T.; LEUNUFNA, S.; DEMBELE, D. P.; KELLER, E. R. J. *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. **Plant Tissue Culture**, Dhaka, v.13, n.1, p.37-46, 2003.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. New Jersey : Prentice-Hall, 1992. 390p.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, p.346-351, 2007.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; ALBUQUERQUE, M. M.; RAMALHO NETO, C. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.37, p.1359-1364, 2002.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. *In*: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 102-127, 2010.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Seattle, n. 30, p. 421-427, 1980.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. *In*: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-277.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 158-178, 2011.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas, 2011. 67p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011.

MORINI, S., MARZIALETTI, P., BABUIERE, C. *In vitro* growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 28, p. 245-248, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 55, p. 227-230, 1999.

NAVARRO, L. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* and its applications: a review. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Tokyo, Japão, v. 1, p. 452-456, 1981.

NEGRI, V.; TOSTI, N.; STANDARDI, A. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 62, p. 159–62, 2000.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: Markestrat - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2011. 138p.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. de O. E.; SILVA, K. M. da; SILVEIRA, D. G. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agricola**, São Paulo, v.57, n.2 , p. 245-249, 2000.

PAINEL AGRONÔMICO Disponível em:
[http://www.potafos.org/ppiweb/BRAZIL.NSF/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/4eac3d6afc6798af03257537007fac91/\\$FILE/Page24-25-130.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/BRAZIL.NSF/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/4eac3d6afc6798af03257537007fac91/$FILE/Page24-25-130.pdf). Acesso em: 24 setembro 2012.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.

PANIS, B., LAMBARDI, M.: Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). - In: RUANE, J., SONNINO, A., (Ed.): **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Rome: FAO, p. 61-78, 2006.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SOUZA, A. da S.; SANTOS, L. C. dos; PEIXOUTO, L. S. **Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: passado, presente e futuro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007. 60 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 163).

RAZDAN M. K. **Introduction to plant tissue culture**. 2nd ed. Enfiela: Science Publishers, 2003. p. 287-306.

RONZELLI JÚNIOR, P. **Melhoramento de plantas**. 3 ed. Curitiba: RONZELLI JÚNIOR, P, (Ed.). 1996. 220p.

SÁ, A. J. ; LEDO, A. da S.; LEDO. C. A. da S. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. Cruz das Almas, 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008.

SARKAR, D., CHAKRABARTI S. K., NAIK P. S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, p. 133-142, 2001.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.47, n.3, p.344-350, 2012.

SOARES FILHO, W. dos S. Variabilidade genética e melhoramento dos citros. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos**

genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: em: 24 setembro 2012.

SOARES FILHO, W. dos S. **Projeto "Procedimentos convencionais e biotecnológicos na criação e seleção de variedades de citros, com ênfase em porta-enxertos adaptados a estresses bióticos e abióticos"**, 2006. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/projetos/projeto_walter.pdf. Acesso em: 24 setembro 2012.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA, S. A. P. C.; OLIVEIRA, A. A. R. de; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CRUZ, J. L.; SOUZA, L. D.; CASTRO NETO, M. T.; GUERRA FILHO, M. S.; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos**, Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMF, 2003. p. 32 (Embrapa-CNPMF. Documentos, 106).

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P.; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, S. V.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca.** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 90).

SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S. do; CARVALHO, M. de J. da S. de; SANTOS, E. B. **Estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 103).

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; STENZEL, N. M. C.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P. Produção e qualidade de frutos de cultivares de laranja doce no Norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 474-479, jun. 2009.

VAN DEN HOUWE, I.; SMET, K.; TEZENAS-DU-MONTCEL, H.; SWENNEN, R.; DE-SMET, K. Variability in storage potential of banana shoot cultures under medium term storage conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 42 p. 269-274, 1995.

WELANDER, M.; WELANDER, N. T.; BRACKMAN, A. S. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.64, n.3, p.361-366, 1989.

WITHERS, L. A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (ed). **Agricultural Biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 57-88, 1998.

ZIMMERMANN, M. H.; ZIEGLER, H. List of sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: PIRSON, A.; ZIMMERMANN, M.H.; (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**, Berlin: Springer, 1975. p.480-503. (Nee Series, 1).

CAPÍTULO 1

PROCEDIMENTOS UNIVARIADOS E MULTIVARIADOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DO LIMOEIRO 'RUGOSO DA FLÓRIDA'¹

¹ Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*

PROCEDIMENTOS UNIVARIADOS E MULTIVARIADOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DO LIMOEIRO 'RUGOSO DA FLÓRIDA'

Autora: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientador: Walter dos Santos Soares Filho

RESUMO – O estabelecimento de condições de crescimento mínimo é fundamental para a conservação *in vitro* de germoplasma. Alterações nas concentrações do meio básico, na fonte de carbono, são fatores importantes na desaceleração do crescimento de plantas *in vitro*. Este trabalho teve como objetivo ajustar procedimentos uni e multivariados para auxiliar na definição de um protocolo de conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. O comportamento de procedimentos estatísticos apropriados foi avaliado. Nesse experimento, microestacas de plantas previamente cultivadas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura WPM em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4), suplementado com 0; 12,5; 25 e 50 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e o pH ajustado em 5,8. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições, em esquema fatorial 3 x 4, e mantido sob condições controladas durante 360 dias. A técnica de análise multivariada pode ser considerada uma ferramenta eficiente para estudos de conservação *in vitro* de germoplasma tendo permitido a seleção de variáveis determinantes para o objetivo proposto. O meio de cultura WPM na sua concentração original adicionado de 25 g.L⁻¹ de sacarose promoveu os melhores resultados na redução do crescimento das plantas *in vitro* do limoeiro 'Rugoso da Flórida', mantendo-as fisiologicamente saudáveis.

Palavras-chave: Citros, cultura de tecidos, plântulas *in vitro*, conservação de germoplasma.

UNIVARIATE AND MULTIVARIATE PROCEDURES ON IN VITRO CONSERVATION OF PLANTS FROM 'RUGOSO DA FLORIDA' LEMON

Author :Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-adviser: Walter dos Santos Soares Filho

ABSTRACT - The establishment of slow growth conditions is fundamental to the *in vitro* conservation of germplasm. Changes in the concentrations of the basal medium, as well as in the carbon source are important factors to reduce the growth of the *in vitro* plants. This study aimed to adjust univariate and multivariate procedures to help the establishment of *in vitro* conservation protocol of *in vitro* seedlings from 'Rugoso Florida' lemon. Moreover the contribution of appropriate statistical procedures was evaluated. In this experiment, microcuttings from *in vitro* plants with approximately 1 cm were inoculated in test tubes containing 10 ml of WPM at different concentrations (1/1, 1/2 and 1/4) supplemented with 0, 12.5, 25 and 50 g.L⁻¹ of sucrose, solidified with 7 g.L⁻¹ agar and the pH adjusted to 5.8. The experiment was conducted in a completely randomized design with 15 replications in a 3 x 4 factorial and maintained under controlled conditions for 360 days. Multivariate analysis technique can be considered an effective tool for studies of *in vitro* conservation of Germplasm allowed the selection of the effective variables. The WPM with the original concentration added with 25 g.L⁻¹ of sucrose provide the best results to reduce the growth of *in vitro* plants from 'Rugoso Florida', keeping them physiologically healthy.

Key-Words: Citrus, tissue culture, *in vitro* seedlings, germplasm conservation.

INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos de citros são fundamentais para o melhoramento genético destes, pois incluem genótipos selvagens, linhagens, variedades obsoletas e modernas com características úteis para o desenvolvimento de novas cultivares copas e porta-enxertos. Para garantir o uso desse importante *pool* genético, é necessário o estabelecimento de coleções de germoplasma que devem ser conservadas de forma eficiente e segura.

Atualmente a conservação das espécies de citros se faz pela manutenção em bancos sob condições de campo. Entretanto, a conservação de germoplasma no campo requer um elevado custo financeiro operacional, em relação à grande quantidade de mão de obra empregada no plantio inicial e subsequentes replantios, bem como nas capinas, fertilização e tratamentos contra pragas e doenças (SOUZA et al., 2009). Além disso, o germoplasma conservado em condições de campo fica vulnerável a uma série de fatores, como pragas, condições ambientais adversas e ações antrópicas, que aliado aos altos custos de manutenção e requerimento de consideráveis áreas de terra, mão de obra e manejo torna essa forma de conservação dispendiosa (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Dessa forma, a biotecnologia oferece algumas vantagens e possibilidades de grande interesse como complemento ou alternativa à conservação tradicional dos citros, a exemplo da conservação *in vitro*, que implica na manutenção de plantas em laboratório sob crescimento lento por meio de subculturas periódicas (SOUZA et al., 2009).

A desaceleração no crescimento da planta permite aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos sem afetar a viabilidade das culturas, facilitando o manejo da coleção. Outros ganhos com a conservação *in vitro* estão na redução do espaço físico necessário para manter grandes coleções, na facilidade para o intercâmbio de germoplasma, assim como na proteção do germoplasma conservado contra fatores bióticos e abióticos (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010; SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

Por outro lado, a conservação *in vitro*, apesar das vantagens apresentadas, demanda uma mão de obra especializada e, a depender das taxas de crescimento das plantas conservadas, a realização de subcultivos em curtos

intervalos de tempo que pode resultar em um trabalho laborioso e oneroso, além de favorecer a variação somaclonal. Em vista disso, os trabalhos voltados para a conservação *in vitro* de espécies vegetais buscam condições de crescimento mínimo das plantas por meio da redução do metabolismo das mesmas, como destacado anteriormente.

Para tal, várias estratégias podem ser utilizadas, como redução da temperatura e da intensidade luminosa, modificações dos meios de cultura com suplementos de agentes osmóticos, como manitol e sorbitol, e inibidores de crescimento (SOUZA et al., 2009; LATA et al. 2010; SCHERWINSKI-PEREIRA et al, 2010; MACIA, 2011). Essa estratégia tem sido aplicada em diferentes espécies alcançando bons resultados (LEMOS et al., 2002; ISLAM et al., 2003; DIVAKARAN et al., 2006; FARIA et al., 2006; LÉDO et al., 2007; KOVALCHUK et al., 2009).

Os agentes osmóticos, tais como sacarose, sorbitol e manitol, quando adicionados ao meio de cultura, atuam como retardantes de crescimento, pelo estresse osmótico que causam nas plantas, reduzindo o potencial hídrico e restringindo a disponibilidade de água para os explantes (FORTES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2001; SHIBLI et al., 2006; LÉDO et al., 2007). A sacarose é um dos carboidratos mais usados na preparação de meios nutritivos por ser um composto essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta cultivada *in vitro*, ou do explante, é limitada (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010). Dessa forma a concentração de sacarose também é um fator determinante no meio de cultura, podendo alterar de forma significativa o metabolismo das plantas.

Várias formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*, com vistas à conservação de germoplasma. Não existe nenhuma fórmula padrão, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com algumas modificações e diluições, tem sido usado para a conservação *in vitro* de várias espécies (LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006; SANTA-ROSA, 2010; SÁ et al., 2011). No entanto, para muitas espécies lenhosas, o meio MS não tem se mostrado o mais eficiente, enquanto composições com macronutrientes mais diluídas produzem um melhor crescimento e desenvolvimento das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), por exemplo, contém 25% dos íons de nitrato e de amônia encontrados no meio MS, porém

mais íons de potássio e sulfato, e tem sido amplamente utilizado com sucesso para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001). O meio de cultura WPM também apresentou bons resultados no armazenamento de genótipos de videira por um período de 6 meses (SILVA et al., 2012), assim como na manutenção e conservação de explantes de *Cochlospermum regium* sob regime de crescimento mínimo *in vitro* (CAMILLO et al., 2009). Atualmente, esse meio básico vem sendo utilizado para o estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, proporcionando resultados muito promissores (SOUZA et. al., 2011), ainda que melhorias precisem ser feitas, pois na conservação *in vitro* de citros por se tratar de espécies e gêneros afins é difícil o estabelecimento de condições ideais de cultivo para todos os genótipos.

Por outro lado, nos estudos de conservação *in vitro*, geralmente são utilizadas técnicas estatísticas univariadas para avaliar a eficiência dos tratamentos testados. No entanto, o estudo das variáveis isoladamente poderá não ser suficiente para modelar o fenômeno biológico em questão, uma vez que se perdem importantes informações ao se desconsiderarem as correlações existentes entre as variáveis. Dessa forma, a análise multivariada, que corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (NETO, 2004), torna-se muito importante, porque avalia simultaneamente um conjunto de características, levando em consideração as correlações existentes entre elas, o que permite que inferências sobre o conjunto de características sejam feitas em um nível de significância conhecido (JOHNSON; WICHERN, 1992). Segundo Hair et al. (2005), a análise multivariada de variância (MANOVA) é uma técnica estatística que pode ser usada para explorar simultaneamente as relações entre diversas variáveis independentes categóricas (geralmente chamadas de tratamentos) e duas ou mais variáveis dependentes métricas, representando, dessa forma, uma extensão da análise univariada de variância (ANOVA). Entretanto, a utilização de técnicas de análise multivariada tem sido pouco aproveitada em estudos envolvendo a conservação *in vitro*, devido à complexidade de seus cálculos e falta de conhecimento pelos pesquisadores.

Em vista do exposto, este trabalho teve por objetivo ajustar procedimentos uni e multivariados para auxiliar na definição de um protocolo de conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' (*Citrus jambhiri* Lush.), a partir da experimentação proposta, com a finalidade de gerar um modelo a ser usado na conservação *in vitro* de germoplasma de citros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados frutos maduros do limoeiro 'Rugoso da Flórida' (*Citrus jambhiri* Lush.) (Figura 1A) cultivado no campo experimental de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. Os frutos foram levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos, lavados em água corrente (Figura 1B) e cortados transversalmente (Figura 1C). As sementes foram extraídas (Figura 1D), lavadas com detergente em água corrente (Figura 1E), colocadas para secar em temperatura ambiente (Figura 1F) e, posteriormente, despojadas do tegumento externo, a testa (Figuras 1G e H). Essas sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e submetidas a um processo de assepsia mediante a imersão em álcool 70% por 5 minutos (Figura 1I), seguido por tratamento em solução aquosa de hipoclorito de sódio contendo 1% de cloro ativo com três gotas de Tween-20, durante 20 minutos (Figura 1J) e enxaguadas três vezes em água destilada e esterilizada (Figura 1K). Após a desinfestação, as mesmas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do meio de cultura WPM, suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (Figura 1L). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, durante 45 dias (Figura 1M) para servirem de fontes de explantes para o estabelecimento do experimento.

Dessa forma, microestacas destas plantas, com aproximadamente 1 cm de tamanho (Figura 1N), foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio WPM em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4) suplementado com 0; 12,5; 25 e 50 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (Figura 1O).



Figura 1. Frutos maduros do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ (*Citrus jambhiri* Lush.) em estágio de desenvolvimento adequado para a extração de sementes (A), que foram lavados em água corrente (B); cortados de forma transversal incompleta (C) para retirada de sementes (D), que foram lavadas em água corrente (E); secas em temperatura ambiente (F) para retirada do tegumento externo (G-H), desinfestadas em álcool 70% e solução aquosa de hipoclorito de sódio contendo 1% de cloro ativo com três gotas de Tween-20 (I-J), enxaguadas em água destilada e esterilizada (K) e inoculadas em meio de cultura (L), originando plântulas (M) que após 45 dias de cultivo sob condições controladas de temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo foram micropropagadas (N) e as microestacas inoculadas no meio para a conservação *in vitro* (O), originando novas plantas (P). Fotos: Antônio da Silva Souza

Após 360 dias (Figura 1P), foram avaliadas as variáveis altura de planta em cm (AP), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca em g (MPS).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 4, respectivamente concentrações de WPM (1/1; 1/2 e 1/4) e de sacarose (0; 12,5; 25 e 50 g.L⁻¹), com 15 repetições, em que cada parcela experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma microestaca. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias das concentrações do WPM foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias das concentrações de sacarose foram ajustados modelos de regressão polinomial. Sendo que para as equações de 1º grau as doses ótimas foram obtidas a partir dos pontos de mínimo e máximo. Já para as equações de 2º grau as doses ótimas foram obtidas derivando a equação e igualando a zero. Posteriormente, os valores esperados para cada variável em função da dose ótima foram estimados pelas equações. As variáveis, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de microestacas (NM) foram transformadas para $\sqrt{x+0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

Foi também realizada análise de variância multivariada (MANOVA), visando verificar o efeito dos tratamentos em relação às variáveis simultaneamente. A significância dos tratamentos foi testada pelo critério de Wilks, segundo Johnson e Wichern (1992). Com base na matriz de somas de quadrados e produtos obtidos na manova, foram calculados os coeficientes de correlação parcial e realizado o diagnóstico de multicolinearidade segundo o critério de Montgomery e Peck (1981). Para o cálculo da contribuição relativa de cada variável na análise multivariada utilizou-se o critério de Singh (1981).

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2004) e Genes (CRUZ; REGAZZI, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas conservadas em diferentes concentrações de sacarose e do meio WPM apresentaram diferentes comportamentos a depender do tratamento e da variável considerada.

As variáveis que mais contribuíram para explicar o comportamento observado das plantas do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’, foram NFV e AP com 61,63% e 35,08%, de acordo com o critério de Singh (1981), respectivamente (Tabela 1). Ambas as variáveis são consideradas fundamentais para o estabelecimento de protocolos eficientes de conservação *in vitro*. A menor taxa de crescimento nas plantas *in vitro*, quando o objetivo é a conservação, é um atributo desejável, desde que seja a expressão da redução do metabolismo e não de outros eventos, como toxicidade, por exemplo, como ocorre com alguns tratamentos. Altas concentrações de alguns açúcares, como sorbitol ou manitol, podem provocar esse resultado equivocado (MACIA, 2011). Por outro lado, essa redução do porte *in vitro*, deve vir acompanhada de plantas com uma boa área foliar e que possam garantir a regeneração das mesmas ao final do período de conservação, deixando evidente a importância de um NFV significativo. O resultado obtido a partir do critério de Singh, é, portanto, um indicador positivo em relação ao trabalho realizado.

Tabela 1. Contribuição relativa das variáveis para a diversidade segundo o critério de Singh (1981) para altura de planta, em cm (AP), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS) de plantas do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ em função das concentrações do meio WPM e de sacarose.

Variável	Sij	Sij (%)
AP	136,05	35,08
NFV	239,02	61,63
NFS	6,09	1,57
NM	6,44	1,66
MPS	0,22	0,06

O efeito significativo na interação sacarose x WPM para altura de plantas (AP), número de microestacas (NM) e massa da planta seca (MPS) pode ser observado na Tabela 2. Para número de folhas verdes (NFV) houve significância para os fatores isolados e nenhum efeito significativo para número de folhas senescentes (NFS). Os coeficientes de variação (CV) variaram de 13,21% a 41,41%, para NM e MPS, respectivamente. Os experimentos na área de cultura de tecidos, geralmente, apresentam CV's mais elevados, mostrando que apesar

do controle nas condições de cultivo (temperatura, luz e fotoperíodo) a distribuição dos dados de resposta não costuma seguir o pressuposto da normalidade, gerando CV's bastante elevados e exigindo muitas vezes a transformação destes dados para possibilitar a interpretação dos resultados.

Tabela 2. Resumo da análise de variância univariada e multivariada para altura de planta, em cm (AP), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida', em g (MPS) conservada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e do meio WPM.

FV	GL	QM					Λ
		AP	NFV	NFS	NM	MPS	
Sacarose	3	23,9901**	1,1366**	0,0588 ^{ns}	0,1167*	0,0553**	0,4256**
WPM	2	20,4841**	1,5227**	0,0799 ^{ns}	0,0312 ^{ns}	0,0264**	0,7781**
Sac. x WPM	6	9,0674**	0,1451 ^{ns}	0,1258 ^{ns}	0,0876*	0,0098**	0,6027**
Erro	164	1,4143	0,2539	0,1020	0,0325	0,0020	
CV (%)		27,94	15,44	37,87	13,21	41,41	
Média Geral		4,2563	10,4318	0,3125	1,3977	0,1093	

** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. Λ valor calculado pelo critério de Wilks.

Na conservação *in vitro* de mangabeira, Sá et al. (2011) encontraram CV's variando de 35,65% a 112,44%, enquanto Santa-Rosa (2010), conservando bromélias do gênero *Aechmea in vitro*, encontrou CV's entre 18,17% e 118,72%, e Flores-Escobar et al. (2011) na propagação *in vitro* da orquídea *Brassia verrucosa* encontraram CV's entre 21,81% e 52,83%. Já na conservação *in vitro* de cultivares de mandioca, Macia (2011) encontrou CV's entre 14,32% e 33,55% após a transformação dos dados. Essas referências apenas confirmam a tendência de elevados CV's para esse tipo de trabalho e a necessidade de se ter critérios eficientes para a avaliação dos resultados.

Com relação à análise de variância multivariada, observa-se, pelo critério de Wilks (Λ), que houve efeito significativo para todas as variáveis consideradas conjuntamente (Tabela 2).

Uma vantagem da extensão multivariada, quando comparada com a metodologia univariada tradicional, é a possibilidade de se estimar a matriz de correlação parcial obtida a partir da matriz de soma de quadrado e produto do

resíduo. A correlação parcial estabelece o grau de associação entre duas variáveis, eliminando o efeito dos tratamentos. Ito e Schull (1964) e Korin (1972) observaram que os testes aplicados na análise de variância multivariada não são grandemente influenciados pela heterogeneidade das matrizes de variância e covariâncias, quando o número de repetições é grande. Mardia (1971) concluiu que a análise de variância multivariada é robusta à não normalidade, o que a torna uma ferramenta mais indicada para os trabalhos de cultura de tecidos.

Na Tabela 3 são apresentados os modelos de regressão polinomial e na Tabela 4 os valores médios para NFV. Observa-se o ajuste de modelos de 1º e 2º graus, com R² que variaram de 54,14% a 98,89% (Tabela 3).

Tabela 3. Equações de regressão, coeficientes de determinação, dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de folhas verdes, número de microestacas e massa da planta seca (g) do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ em função das concentrações de WPM e de sacarose (g.L⁻¹).

Concentração do WPM	Equação	R ² (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de plantas				
1/1	$\hat{y}^{**} = 3,1361 + 0,0715x$	98,89	25,00	4,92
1/2	$\hat{y}^* = 3,9946 + 0,0208x$	54,14	25,00	4,51
1/4	$\hat{y}^{ns} = 3,60$	-	25,00	3,60 ¹
Número de folhas verdes				
1/1; 1/2; 1/4	$\hat{y}^{**} = 11,3900 - 0,0429x$	77,22	25,00	10,32
Número de microestacas				
1/1	$\hat{y}^* = 0,9268 + 0,0387x - 0,0005x^2$	80,46	38,70	1,68
1/2	$\hat{y}^{ns} = 1,47$	-	0,00	1,47 ¹
1/4	$\hat{y}^{ns} = 1,37$	-	0,00	1,37 ¹
Massa da planta seca				
1/1	$\hat{y}^{**} = 0,0560 + 0,0028x$	87,48	50,00	0,20
1/2	$\hat{y}^{**} = 0,0944 + 0,0013x$	83,01	50,00	0,16
1/4	$\hat{y}^{ns} = 0,09$	-	0,00	0,09 ¹

** e * significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. ns não significativo a 5% de probabilidade. ¹baseado na média dos valores observados.

Tabela 4. Valores médios do número de folhas verdes no limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ em função das concentrações do WPM.

WPM	Médias
1/1	11,1897 a
1/2	10,7931 a
1/4	9,3500 b

médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para AP, nas concentrações de 1/1 e 1/2 de WPM, observou-se um comportamento linear crescente da altura com o aumento da concentração de sacarose, enquanto que 1/4 do WPM não houve diferença estatística entre as doses de sacarose testadas, deixando evidente a importância que a interação significativa entre esses dois fatores (WPM e sacarose) tem para limitar o desenvolvimento das plantas (Figura 2). Observa-se um acréscimo mais acentuado na AP à medida que se aumenta as doses de sacarose quando se utiliza a concentração original de WPM ($\hat{b}=0,07$) e em comparação com a metade da concentração ($\hat{b}=0,02$), destacando o papel que os componentes do meio básico têm para o desempenho das plantas, sendo mais determinante que o aumento nas doses de sacarose. Os resultados mostram que a ausência de sacarose no meio propiciou as menores alturas, independente da concentração de WPM utilizada (Tabela 3, Anexo 1 e Figura 2), motivo pelo qual foi inicialmente considerada como concentração ótima, já que um dos indicativos da redução do metabolismo é uma redução na taxa de crescimento.

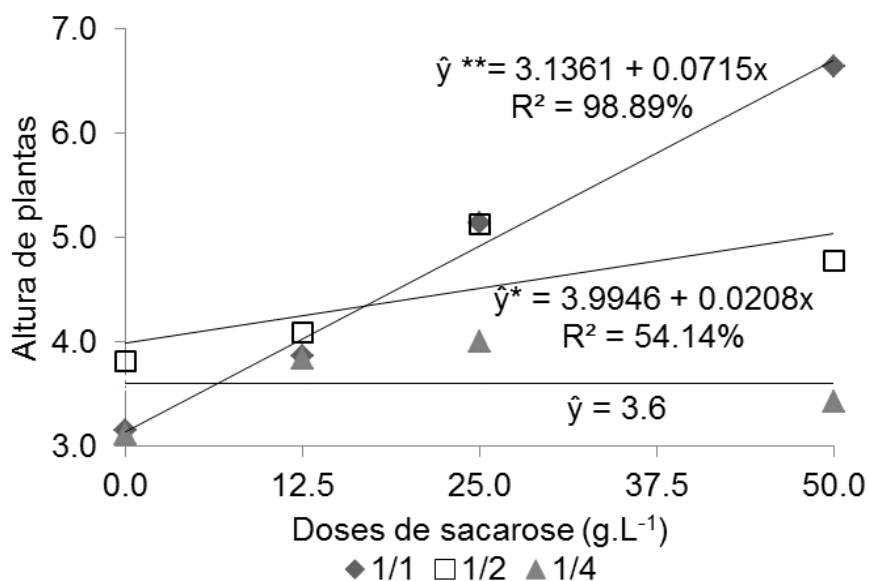


Figura 2. Altura da planta do limoeiro 'Rugoso da Flórida' em função das concentrações de sacarose e do meio de cultura WPM.

Por outro lado, apesar da interação entre os fatores não ter sido significativa para NFV, ajustou-se um modelo de 1º grau decrescente, indicando que o aumento nas concentrações de sacarose não foi determinante para o incremento no número de folhas verdes (NFV), visto que os maiores valores para essa variável foram encontrados na ausência da fonte de carboidrato (Tabela 3 e Figura 3). Esse resultado destaca o papel que o meio básico teve para o desenvolvimento do material, mantendo parâmetros relevantes de crescimento, com um bom número de folhas verdes, mas mostrando redução significativa no metabolismo da planta (Tabela 4). Entretanto, apesar dos resultados mostrarem que as plantas conservadas em ausência de sacarose produziram o maior número de folhas verdes (NFV), é preciso considerar que o trabalho abarca o período de 12 meses e que a ausência da fonte de carbono pode trazer consequências negativas no momento posterior dos subcultivos.

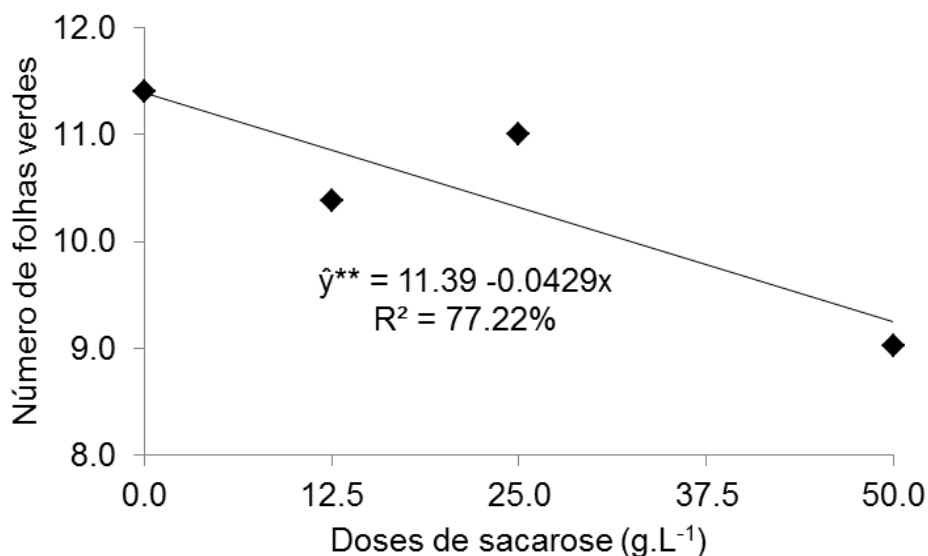


Figura 3. Número de folhas verdes do limoeiro 'Rugoso da Flórida' em função das concentrações de sacarose.

Vale destacar que nenhuma das grandes coleções *in vitro* abrigadas em Instituições como a Bioversity na Bélgica, o CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) na Colômbia ou o IITA (International Institute of Tropical Agriculture) na Nigéria mantêm suas coleções em ausência de sacarose ou outra fonte de carbono. Na coleção de bananeiras da Bioversity, cujo intervalo médio de subcultivos é de 12 meses, se utiliza 30 g.L⁻¹ de sacarose, enquanto que para mandioca no CIAT a concentração utilizada é de 20 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ no IITA com intervalos de subcultivos que variam de 4 a 19 meses (CGIAR, 2012). Além dessas, a coleção de inhame no IITA também utiliza 30 g.L⁻¹ de sacarose para conservar os acessos por um período de 10 a 24 meses sem subcultivar (DUMET et al. [20-?]).

Dessa forma, comparando o resultado obtido com o número de folhas verdes (Tabela 3 e Figura 3) na concentração de 25 g.L⁻¹ de sacarose (10,32) e com o alcançado na sua ausência (11,39) e com base na experiência relatada com grandes coleções, decidiu-se como concentração ótima de sacarose a ser adotada a de 25 g.L⁻¹. A altura das plantas nessa concentração (4,92 cm) não compromete os resultados esperados. Esse aspecto evidencia a possibilidade de, com o uso das equações de regressão, se obter um valor estimado, a partir de

uma dose considerada ótima, pode se constituir em uma ferramenta muito útil para o manejo das coleções e o estabelecimento dos tratamentos adequados.

Em bromélias, Santa-Rosa (2010) chegou a resultados que permitiu conservar três espécies de *Aechmea* por um período de 12 meses a partir da adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose ao meio de cultivo, que, no entanto, se constituía no MS com 1/3 de sua concentração de sais. Em cana-de-açúcar também houve efeito positivo da utilização de sacarose (20 g.L⁻¹) como fonte de carbono e regulador osmótico na manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro* (LEMOS et al., 2002).

Conforme Santos et al. (2012), a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo é outra estratégia amplamente empregada para a conservação sob crescimento lento. Nesse sentido, Ahmed e Anjum (2010), estudando a cultura da pêra (*Pyrus* sp.), observaram boas taxas de sobrevivência com a redução de sais por um período de seis meses, sendo que após esse tempo foi observada a morte das brotações devido a escassez de nutrientes no meio de cultivo, uma vez que a conservação por períodos mais prolongados pode demandar maiores concentrações de sais e vitaminas dos meios básicos, para garantir boas taxas de sobrevivência e regeneração.

Para o NM não houve diferenças significativas entre as doses de sacarose nas concentrações de 1/2 e 1/4 de WPM. O maior NM pode ser obtido na dose ótima de 38,70 g.L⁻¹ de sacarose, valor estimado pela equação, quando se utilizar o meio completo do WPM, com valor estimado pelo modelo de 2º grau de 1,68 microestacas (Tabela 3).

Já para o peso da matéria seca, os maiores resultados foram obtidos na concentração de 50 g.L⁻¹ de sacarose com o meio WPM na composição normal e com metade da concentração, com valores estimados pela equação de regressão de 0,20 g e 0,16 g, respectivamente (Tabelas 3 e Anexo 1). Esse resultado era o esperado, já que as plantas de maior altura foram obtidas nessa concentração.

O número de condição (NC) do diagnóstico de multicolinearidade foi de 3,79, considerada uma multicolinearidade fraca na matriz de correlação, segundo a classificação de Montgomery e Peck (1981), indicando a possibilidade de obtenção de uma estimativa confiável em termos biológicos. A presença de multicolinearidade, ainda que baixa, no caso específico deste trabalho, pode ser

devido a correlação entre altura de planta e massa seca, por exemplo, se forem consideradas como variáveis que geram informações similares.

Observou-se, também, uma baixa correlação entre AP e NFV ($r = 0,17^*$), o que propicia a obtenção de materiais com menor altura e com um número adequado de folhas verdes (Tabela 5), condição de interesse efetivo para a conservação *in vitro*. Entre AP e NM não existe correlação ($r = -0,13^{ns}$), indicando que em plantas com maior altura, o número de microestacas não será elevado (Tabela 5). Isso está relacionado ao fato das plantas de citros cultivadas *in vitro* apresentarem uma menor distância entre os segmentos internodais, o que reduz o número de microestacas por planta, tornando essa variável de relativa importância.

Tabela 5. Coeficientes de correlação parcial para altura de planta, em cm (AP), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS), de plantas do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ em função das concentrações do WPM e de sacarose.

	NFV	NFS	NM	MPS
AP	0,17*	-0,15 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,36**
NFV		-0,17*	0,39**	0,39**
NFS			0,14 ^{ns}	-0,18*
NM				0,12 ^{ns}

** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste t. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Já em mandioca esse aspecto não é observado, pois a maior altura das plantas propicia a obtenção de várias microestacas e o incremento no número delas vai depender do tratamento. A quebra da dominância apical *in vitro* em mandioca é bastante complicada e a multiplicação é dependente do número de microestacas. No cultivo *in vitro* de mandioca, Vidal (2009) encontrou uma correlação fortemente positiva (0,71**) entre altura das plantas e número de microestacas, concluindo que quanto maior a planta, maior o número de microestacas. Macia (2011) também sugere que essas duas variáveis podem apresentar uma boa correlação na conservação *in vitro* de mandioca, tornando essa variável muito importante para essa espécie.

Esse é um aspecto importante dos trabalhos em conservação *in vitro* de plantas. As variáveis que são correlacionadas e que devem ser consideradas nas avaliações para se estabelecer uma condição de crescimento mínimo, mas mantendo a planta viável, vão variar de uma espécie para a outra e dependerão da genética de cada uma, da dinâmica de crescimento *in vitro* e dos critérios adotados pelo condutor do trabalho.

Outro aspecto observado durante a avaliação do experimento foi a coloração das folhas das plantas nos diferentes tratamentos. À medida que aumentou a concentração de sacarose e reduziu a do meio WPM, as plantas apresentaram maior número de folhas amarelas, indicando que altas concentrações de sacarose associadas à redução das quantidades dos demais componentes do meio de cultura podem provocar efeito tóxico para as plantas (Figura 4).

Relatos de efeitos tóxicos em experimentos voltados para a conservação *in vitro* são frequentes, pelo uso de altas concentrações de reguladores osmóticos, como descrito por Léo et al. (2007) em coqueiro, Macia (2011) em mandioca ou em mangabeira a partir do uso de manitol (SÁ et al., 2011).

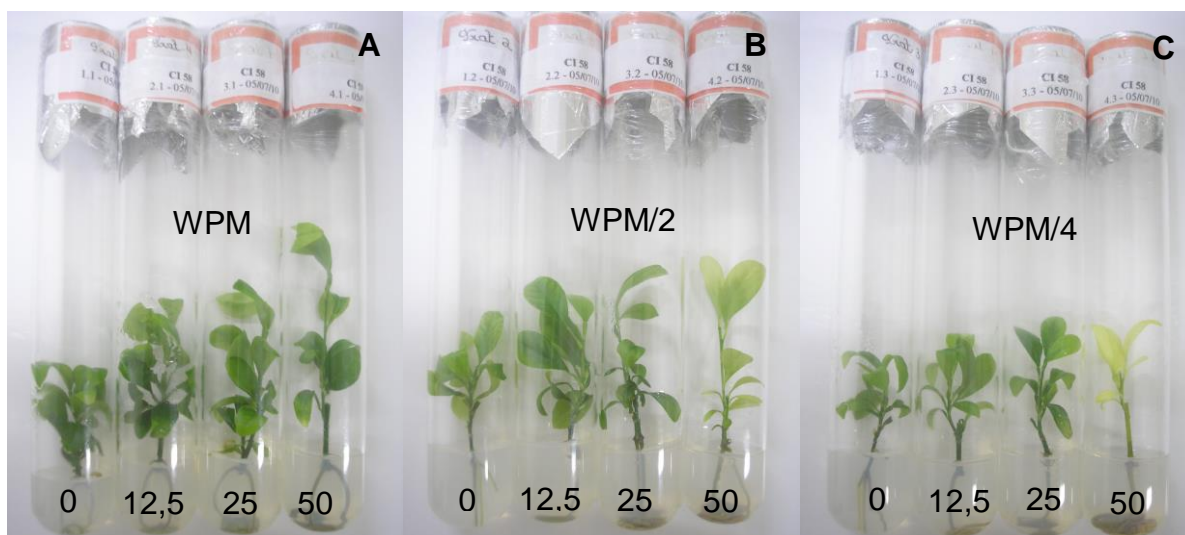


Figura 4. Plantas do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ com 360 dias de conservação *in vitro* em meio de cultura WPM na sua concentração normal (A), na metade (B) e a 1/4 da concentração (C), com doses de 0; 12,5; 25 e 50 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente. Foto: Antônio da Silva Souza

Os resultados mostram ser possível conservar *in vitro* plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' sem subcultivar por um período de 12 meses utilizando o WPM como meio de cultura padrão na sua concentração normal. No entanto, são necessários estudos com outros genótipos para definir o protocolo de conservação *in vitro* para as espécies de citros, visto que pode ocorrer variação entre as plantas de um mesmo genótipo conservadas *in vitro*. Marin e Duran-Vila (1991) propuseram um protocolo de micropropagação para conservação de germoplasma de citros *in vitro*. O ciclo de subcultivos variou de 8-12 meses e incluíram várias operações (cultura de segmentos nodais, enraizamento de brotos e alongamento dos brotos enraizados), permitindo a manutenção de plantas regeneradas *in vitro* de citros por um período de até 12 meses, sem subcultivar. Contudo, houve a adição de alguns reguladores de crescimento ao meio de cultura padrão MS, o que ao longo dos subcultivos aumenta o risco de ocorrência de variações somaclonais nas plantas conservadas *in vitro*. Em contra partida, Souza et al. (2011) utilizaram um protocolo sem adição de reguladores de crescimento que permitiu manter genótipos de *Citrus* e gêneros relacionados que apresentam elevada poliembrionia por um período de 18 meses sem subcultivar. Entretanto, apesar dos resultados promissores obtidos pelos autores acima citados, a demanda por ajustes no protocolo utilizado existe, devido principalmente, às diferentes espécies e gêneros afins que constituem o germoplasma de citros em condições de campo e que deverão ser introduzidos *in vitro* para estabelecimento da cópia de segurança. Além disso, a necessidade de se adequar de forma correta o uso das ferramentas estatísticas pode significar uma economia significativa de tempo, assim como aumentar a eficiência dos trabalhos realizados.

CONCLUSÕES

A utilização da técnica de análise multivariada pode ser considerada uma ferramenta eficiente para estudos de conservação *in vitro*, tendo permitido a seleção de variáveis determinantes para o objetivo proposto.

As variáveis que mais contribuíram para explicar a variabilidade observada devido ao efeito dos tratamentos na conservação *in vitro* do limoeiro 'Rugoso da Flórida' foram número de folhas verdes e altura de plantas.

Para desacelerar o crescimento das plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida, o meio mais eficiente deve considerar a concentração original do meio básico WPM adicionado de 25 g.L⁻¹ de sacarose.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; ANJUM, M. A. *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. **Turkish Journal Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 34, p. 25-32, 2010.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.

CAMILLO, J; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - Brazilian Journal of Medicinal Plants**, Botucatu: Fundação Instituto de Biociências, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CGIAR. Disponível em:
http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&Itemid=742. Acesso em: 21 agosto 2012.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.110, p.175-180, 2006.

DUMET, D.; ADEYEMI, A.; OJUEDERIE, O. Yam *in vitro* genebanking. Ibadan: IITA, [20-?]. 31 p.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 267-270, 2006.

FLORES-ESCOBAR, G.; GIL-VÁSQUEZ, I.; COLINAS-LEÓN, M. T.; MATA-ROSAS, M. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Chapingo, v.17, n.1, p.5-8, 2011.

FORTES, G. R. de L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1261-1264, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 593p.

ISLAM, M. T.; LEUNUFNA, S.; DEMBELE, D. P.; KELLER, E. R. J. *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. **Plant Tissue Culture**, Dhaka, v.13, n.1, p.37-46, 2003.

ITO, K; SCHULL, W. J. On the robustness of the T^2 test in multivariate analysis of variance when variance-covariance matrices are not equal. **Biometrika**, London, v. 51, n. 1/2, p. 71-82, June 1964.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. New Jersey : Prentice-Hall, 1992. 390p.

KORIN, B. P. Some comments on the homocedasticity criterion M and the multivariate analysis of variance tests T^2 , W and R. **Biometrika**, London, v. 59, n. 1, p. 215-216, Apr. 1972.

KOVALCHUK, I. LYUDVIKOVA, Y.; VOLGINA, M.; REED, B. M. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, The Hague, v. 96, n. 02, p. 127-136, 2009.

LATA, H.; MORAES, R. M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v.46, p.22-27, 2010.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A.O.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, p.346-351, 2007.

LEMO, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; ALBUQUERQUE, M.M.; RAMALHO NETO, C.E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v.37, p.1359-1364, 2002.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Seattle, n. 30, p. 421-427, 1980.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas, 2011. 67p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011.

MARDIA, K. V. The effect of nonnormality on some multivariate tests and robustness to nonnormality in the linear model. **Biometrika**, London v. 58, n. 1, p. 105-121, Apr. 1971.

MARIN, M. L.; DURAN-VILA, N. Conservation of citrus germplasm *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 116, p. 740-746, 1991.

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: J. Wiley, 1981. 504 p.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NETO, M. M. J. Estatística multivariada. Revista de Filosofia e Ensino. 2004. Disponível em: http://www.criticanarede.com/cien_estatistica.html. Acesso em: 18 janeiro 2013.

PANIS, B., LAMBARDI, M.: Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). - In: RUANE, J., SONNINO, A., (Ed.): **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Rome: FAO, p. 61-78, 2006.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.

SÁ, A. J. ; LEDO, A. da S.; LEDO. C. A. da S. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTA-ROSA, S. **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. Feira de Santana, 2010. 86p Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. ; BLANK, A. F. ; MENEZES, M. M. L. A. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal** (Impresso), Uberlândia, v. 28, p. 963-970, 2012.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S.; CAMILLO, J.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; VIEIRA, R. F. Tissue culture storage of Brazilian medicinal plants germplasm. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.860, p.211-214, 2010.

SHIBLI, R. D.; SHATNAWI, M. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, Dubai, Emirados Árabes Unidos, v.2, p.372-382, 2006.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.47, n.3, p.344-350, 2012.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, S. V.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 90).

SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S. do; CARVALHO, M. de J. da S. de; SANTOS, E. B. **Estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 103).

VIDAL, A. M. **Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca**. Cruz das Almas, 2009. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE CULTIVO NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CITROS²

² Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Acta Scientiarum. Agronomy (Online)

INFLUÊNCIA DA CONDIÇÃO DE INCUBAÇÃO NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CITROS

Autora: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientador: Walter dos Santos Soares Filho

RESUMO – A conservação *in vitro* é uma estratégia a ser considerada para preservação de germoplasma do gênero *Citrus*. Estratégias para reduzir o metabolismo das plantas envolvem diferentes reduções da temperatura de incubação, da radiação fotossintética ativa e do fotoperíodo. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivos avaliar a influência do ambiente de cultivo para a conservação *in vitro* de diferentes genótipos de citros oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas (BA), assim como o uso da técnica de componentes principais para agrupamento dos genótipos com comportamento semelhante em função do ambiente de cultivo utilizado. Para isso, microestacas de plântulas de dez genótipos previamente cultivadas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm, foram inoculadas em tubos de ensaio com 20 mL do meio de cultura WPM suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8, e mantidas em três ambientes distintos por 180 dias. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 10 (genótipos) x 3 (ambientes) com 15 repetições. Os resultados indicam que a técnica de componentes principais pode ser considerada uma ferramenta eficiente para estudar o comportamento de genótipos conservados em diferentes ambientes de cultivo *in vitro*. O ambiente de cultivo com temperatura de 22 ± 1 °C, intensidade luminosa de 10 μmol.m⁻².s⁻¹ e 12 horas de fotoperíodo é o mais indicado para reduzir o crescimento das plantas conservadas prolongando o tempo de subcultivo e mantendo as plantas saudáveis.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, crescimento mínimo, germoplasma, *Citrus* spp.

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITION ON *IN VITRO* CONSERVATION OF DIFFERENT CITRUS GENOTYPES

Author: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Adviser: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-adviser: Walter dos Santos Soares Filho

ABSTRACT - The '*in vitro*' conservation is a strategy to be considered for *Citrus* germplasm preservation. Strategies to reduce the metabolism of plants involve different strategies like reductions of the incubation temperature, the photosynthetic active radiation and the photoperiod. Thus, this study aimed to evaluate the influence of cultivation condition to *in vitro* conservation of different genotypes of citrus from the Citrus germplasm active bank at Embrapa Cassava and Fruits, Cruz das Almas (BA). The principal components analyses were used to classify the different accession with similar behavior according the cultivation condition. For this, microcuttings from seedling of ten genotypes previously cultured *in vitro* with approximately 1 cm were inoculated in test tubes with 20 ml of WPM medium supplemented with 25 g.L⁻¹ sucrose, solidified with 7 g.L⁻¹ agar and pH 5.8, and maintained in three distinct environments for 180 days. The experiment was carried out in a completely randomized design in a factorial 10 (genotypes) x 3 (environments) with 15 replications. The results indicate that the technique of principal components can be considered a powerful tool for studying the behavior of genotypes in different environmental conditions. The growing environment with temperature of 22 ± 1 °C, light radiation of 10 μmol.m⁻².s⁻¹ and photoperiod of 12 hours is the most indicated to reduce plant growth '*in vitro*', extending the subculture period and keeping the plants healthy.

Key-Words: Tissue culture, minimal growth, germplasm, *Citrus* spp.

INTRODUÇÃO

A conservação da diversidade genética existente no gênero *Citrus*, incluindo espécies selvagens, é fundamental, uma vez que vários de seus genótipos têm sido historicamente vulneráveis a graves pragas e doenças, a exemplo do cancro cítrico, greening, tristeza e gomose de *Phytophthora*, que afetam os citros nas condições brasileiras, levando à morte milhões de plantas. Atualmente, esses recursos genéticos são mantidos em bancos de germoplasma a campo por instituições de pesquisa ou em jardins botânicos (DURAN-VILLA et al., 2005), condições que deixam os acessos vulneráveis a adversidades climáticas e a fatores bióticos e abióticos.

Dessa forma, a conservação *in vitro* surge como uma alternativa de preservação do germoplasma, além de poder funcionar como cópia de segurança de grandes coleções mantidas em campo. Consiste no cultivo de coleções em laboratório, a partir de técnicas de cultura de tecidos vegetais, as quais possibilitam a manutenção de um elevado número de acessos em espaço reduzido sob condições assépticas, reduzindo a mão de obra, as perdas de materiais devido a não adaptação às condições ambientais locais e, além disso, facilitam o intercâmbio de germoplasma (RAO, 2004; FARIA et al., 2006; SARASAN et al., 2006; SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

Para esse tipo de conservação, apesar das vantagens, alguns aspectos precisam ser melhor ajustados, como, por exemplo, o crescimento das plantas *in vitro*. Ao contrário das expectativas que se tem em relação à regeneração de plantas *in vitro*, a conservação de grandes coleções busca a desaceleração do crescimento das plantas por meio da redução de seu metabolismo. Crescimento rápido implica na necessidade de subcultivos em intervalos curtos de tempo, o que a longo prazo, torna o manejo da coleção laborioso e oneroso, além dos riscos de variação somaclonal que podem ocorrer pelo excesso de repicagens.

Essa redução do crescimento é conhecida na conservação *in vitro* como “crescimento lento” ou “crescimento mínimo”, e pode ser obtida pela intervenção de diversos fatores determinantes para o cultivo *in vitro* de plantas. Dentre esses fatores, a temperatura de incubação, a radiação fotossintética ativa e fotoperíodo, o uso de retardantes osmóticos e de inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) ao meio de cultura, destacam-se como alternativas utilizadas na

conservação *in vitro*, pois interferem na rota metabólica das plantas afetando seu ritmo de crescimento (LEMOS et al., 2002; CANTO et al., 2004; LÉDO et al., 2007; SOUZA et al., 2009; MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010).

Um dos primeiros fatores a serem testados na conservação *in vitro* de uma espécie é a redução de temperatura. Contudo, para cada espécie existe um limite que permite a restrição do crescimento sem causar danos fisiológicos à planta. Em geral, espécies de fruteiras tropicais são mais sensíveis ao armazenamento em temperaturas abaixo de 15 °C que espécies da zona temperada. Culturas de clima temperado, como framboesa, amora, maçã e pêra, podem ser conservadas em temperaturas acima de 4 °C com relativo sucesso (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010). Assim, as respostas a esse fator variam em função da sensibilidade da planta à baixa temperatura e ela tem sido o principal aspecto considerado na conservação de diversas espécies vegetais (NEGASH et al., 2001; LEMOS et al., 2002).

Para reduzir a taxa de crescimento e assim aumentar o intervalo entre os subcultivos, Matsumoto et al. (2010) afirmam que a temperatura para a conservação *in vitro* é fixada por volta de 20 °C para as espécies tropicais, que não toleram exposição a temperaturas mais baixas do que essa, e que as espécies de climas subtropical e temperado podem ser mantidas a temperaturas mais baixas, que variam de 10 °C a 15 °C.

Além da temperatura, outro fator que deve ser analisado na conservação *in vitro* de germoplasma é a emissão de luz. Existem três características principais que devem ser observadas: fotoperíodo, irradiância e composição espectral. O fotoperíodo necessita ser previamente ajustado para 12/12, 14/10 ou 16/8 (relação de horas de luz/escuro) (MORINI et al., 1991). Matsumoto et al. (2010) afirmam que a diminuição da intensidade luminosa pode ser utilizada para reduzir o crescimento das plantas. Entretanto, concluem que esta diminuição não pode ser muito drástica, podendo causar estiolamento e impedir a ativação da clorofila, causando reduções muito intensas no crescimento ou até mesmo a morte da planta.

Em vista dos aspectos abordados, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do ambiente de cultivo para a conservação *in vitro* de diferentes genótipos de citros, assim como avaliar o uso da técnica de componentes

principais para agrupamento dos genótipos com comportamento semelhante em função do ambiente de cultivo utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas microestacas de plântulas dos genótipos limoeiros 'Cravo' clone comum (*Citrus limonia* Osbeck), 'Volkameriano' clone Catânea 2 (*C. volkameriano* V. Ten. & Pasq.) e 'Rugoso Mazoe' (*C. jambhiri* Lush.); citranges 'Carrizo' (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e 'Troyer' (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf.); laranjeiras 'Azeda' clone Narrow Leaf (*C. aurantium* L.) e 'Azeda' clone comum (*C. aurantium* L.); citrumeleiro 'Swingle' (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (L.) Raf.); híbridos TSKC x CTSW 03 [*C. sunki* hort. ex Tanaka x (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (L.) Raf.)] e TSKC x (TR x LCR) 059 [*C. sunki* hort. ex Tanaka x (*P. trifoliata* (L.) Raf. x *C. limonia* Osbeck)], previamente cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, com aproximadamente 1 cm de tamanho.

As microestacas foram inoculadas em câmara de fluxo laminar utilizando-se tubos de ensaio com 20 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, e mantidas em diferentes condições de cultivo: a) sala com temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h; b) sala com temperatura de 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 10 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 h; e c) câmara climatizada, com temperatura de 17 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 20 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 10 (genótipos de citros) x 3 (ambientes de cultivo), com 15 repetições. Cada parcela experimental foi constituída de um tubo de ensaio contendo uma microestaca.

As avaliações foram realizadas aos 180 dias de cultivo *in vitro* analisando-se as seguintes variáveis: altura de planta, em cm (AP); número de folhas verdes (NFV); número de folhas senescentes (NFS); número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As variáveis número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de microestacas foram transformadas para $\sqrt{x+0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. As médias dos ambientes foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as médias dos genótipos agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os dados também foram submetidos à análise multivariada. Foram calculados os coeficientes de correlação parcial entre as variáveis estudadas com base na matriz de somas de quadrados e produtos do resíduo obtidos a partir da análise de variância multivariada. Essa correlação mede a associação entre as variáveis desconsiderando-se o efeito dos tratamentos (HAIR JR. et al., 2006). A contribuição relativa de cada variável foi calculada utilizando-se o critério de Singh (1981) e foi empregada a análise de componentes principais para agrupamento dos genótipos em função das variáveis avaliadas, para cada ambiente de cultivo.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2004), Statistica (STATSOFT INC., 2004) e Genes (CRUZ, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A correlação entre as variáveis estudadas é um aspecto que precisa ser considerado na escolha das melhores condições para a conservação.

Na conservação *in vitro* busca-se um protocolo que estabeleça a redução do metabolismo das plantas, proporcionando a obtenção de plantas que possam ser subcultivadas em intervalos maiores, mantendo, porém, menor crescimento (altura da planta), baixa taxa de senescência e boa superfície foliar (representativo número de folhas verdes). Dessa forma, torna-se importante verificar a correlação existente entre essas variáveis. O coeficiente de correlação obtido para altura de planta e número de folhas verdes apresentou valor baixo, positivo e significativo ($r = 0,25^{**}$), o que demonstra a possibilidade de conservar materiais com menor tamanho e número de folhas verdes satisfatórios (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes de correlação parcial para altura de planta, em cm (AP), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS) de genótipos de citros cultivados em diferentes ambientes de conservação *in vitro*.

Variáveis	NFV	NFS	NM	MPS
AP	0,25**	-0,07 ^{ns}	0,50**	0,63**
NFV		-0,13*	0,31**	0,43**
NFS			-0,02 ^{ns}	-0,05 ^{ns}
NM				0,45**

** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste t. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Por outro lado, a correlação negativa e significativa entre NFV e NFS era a esperada. Quanto maior o número de folhas verdes, menor o número de folhas senescentes. Santos et al. (2012) afirmam que no aspecto coloração deve-se considerar plantas mais verdes, mesmo que estas apresentem tamanho um pouco maior que o desejado.

Observou-se também uma correlação média entre AP e NM (0,50**) e uma alta correlação entre AP e MPS (0,63**). Esses resultados permitem desconsiderar as variáveis NM e MPS nesse trabalho, uma vez que o comportamento das mesmas pode ser observado através da variável AP.

Na Tabela 2 está o resumo da análise de variância. Houve efeito significativo na interação Ambiente x Genótipo para todas as variáveis ($p < 0,05$), com a exceção para o NFV, para a qual apenas o ambiente foi significativo.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS) de genótipos de citros cultivados em diferentes ambientes de conservação *in vitro*.

FV	GL	QM				
		AP	NFV	NFS	NM	MPS
Ambiente	2	17,13**	25,19**	0,22 ^{ns}	0,24**	0,0013**
Erro a	42	0,57	0,37	0,17	0,03	0,0001
Genótipo	9	11,57**	0,63 ^{ns}	0,75**	0,52**	0,0019**
Amb. x Gen.	18	3,03**	0,59 ^{ns}	0,67**	0,12**	0,0005**
Erro b	354	0,51	0,36	0,18	0,03	0,0001
CV (%)		28,07	22,60	42,78	13,52	40,14
Média Geral		2,54	7,06	0,69	1,37	0,03

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Os resultados referentes ao desdobramento dessa interação se encontram na Tabela 3. No que se refere à altura das plantas, os três ambientes promoveram comportamentos diferentes em relação aos genótipos, com as plantas mais altas obtidas no ambiente com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, enquanto os menores valores para essa variável foram obtidos no cultivo em câmara climatizada a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Como um dos parâmetros que indica a redução do metabolismo das plantas é a altura, a escolha dessa condição poderia ser a mais indicada inicialmente, se fosse considerada a variável de forma isolada.

Tabela 3. Valores médios de altura de planta (AP), em cm, número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca (MPS), em g, de genótipos de citros cultivados em diferentes ambientes de conservação *in vitro*.

Genótipo	Ambiente		
	$17 \pm 1^\circ\text{C}$	$22 \pm 1^\circ\text{C}$	$27 \pm 1^\circ\text{C}$
Altura de planta (cm)			
LCCC	1,32 Bb	1,99 bA	2,39 cA
LVCC2	1,99 bB	2,07 bB	2,88 cA
CC	2,30 aC	3,67 aB	4,53 aA
LRM	2,37 aA	2,25 bA	2,16 cA
TSKC x CTSW 03	2,23 aA	2,49 bA	2,46 cA
LACNL	1,68 bB	2,20 bAB	2,61 cA
CT	2,47 aB	3,76 aA	3,83 bA
LACC	1,87 bA	2,17 bA	2,45 cA
TSKC x (TR x LCR)	2,44 aB	3,26 aA	2,25 cB
CS	2,66 aA	2,19 bA	2,64 cA
Valor médio	2,13	2,61	2,82
Número de folhas senescentes			
LCCC	1,62 a A	0,13 bB	0,13 bB
LVCC2	0,07 bA	0,27 bA	0,13 bA
CC	0,93 aAB	1,14 aA	0,27 bB
LRM	0,07 bA	0,27 bA	0,57 bA
TSKC x CTSW 03	1,40 aA	1,20 aA	1,07 aA
LACNL	0,50 bA	0,54 bA	0,20 bA
CT	0,79 bAB	1,27 aA	0,13 bB
LACC	2,00 aA	1,36 aA	0,29 bB
TSKC x (TR x LCR)	0,43 bB	0,40 bB	1,92 aA
CS	0,31 bB	0,42 bB	1,47 aA
Valor médio	0,81	0,70	0,62

Continua...

Tabela 3. Continuação

	Número de microestacas		
LCCC	1,00 aA	1,07 cA	1,20 bA
LVCC2	1,13 aA	1,27 cA	1,40 bA
CC	1,20 aB	2,36 aA	2,53 aA
LRM	1,33 aA	1,27 cA	1,07 bA
TSKC x CTSW 03	1,13 aA	1,13 cA	1,27 bA
LACNL	1,00 aA	1,00 cA	1,13 bA
CT	1,36 aB	2,13 aA	2,20 aA
LACC	1,27 aA	1,00 cA	1,21 bA
TSKC x (TR x LCR)	1,29 aA	1,67 bA	1,38 bA
CS	1,46 aA	1,08 cA	1,20 bA
Valor médio	1,22	1,40	1,46
	Massa da planta seca (g)		
LCCC	0,02 bA	0,02 bA	0,02 bA
LVCC2	0,02 bA	0,03 bA	0,03 bA
CC	0,03 aB	0,05 aA	0,05 aA
LRM	0,03 aA	0,02 bA	0,03 bA
TSKC x CTSW 03	0,02 bA	0,03 bA	0,03 bA
LACNL	0,02 bA	0,03 bA	0,02 bA
CT	0,03 aB	0,04 aA	0,04 aA
LACC	0,03 aA	0,03 bA	0,03 bA
TSKC x (TR x LCR)	0,03 aB	0,04 aA	0,02 bB
CS	0,02 Ba	0,02 bA	0,03 bA
Valor médio	0,03	0,03	0,03

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. LCCC (limoeiro 'Cravo' clone comum); LVCC2 (limoeiro 'Volkameriano' clone Catânea 2); CC (citrange 'Carrizo'); LRM (limoeiro 'Rugoso Mazoe'); TSKC x CTSW 03 (tangerineira 'Sunki' comum x citrumelo 'Swingle'); LACNL (laranjeira 'Azeda' clone Narrow Leaf); CT (citrange 'Troyer'); LACC (laranjeira 'Azeda' clone comum); TSKC x (TR x LCR) 059 [tangerineira 'Sunki' comum x (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x limoeiro 'Cravo')]; CS (citrumelo 'Swingle').

No entanto, as plantas obtidas nessa condição apresentaram folhas amareladas e plantas com aparência pouco sadia (Figura 1A), deixando evidente que esse ambiente de cultivo reduz o metabolismo, comprometendo, portanto, o desenvolvimento da planta e acelerando a queda das folhas, como mostram os valores referentes ao NFS (Tabela 3).

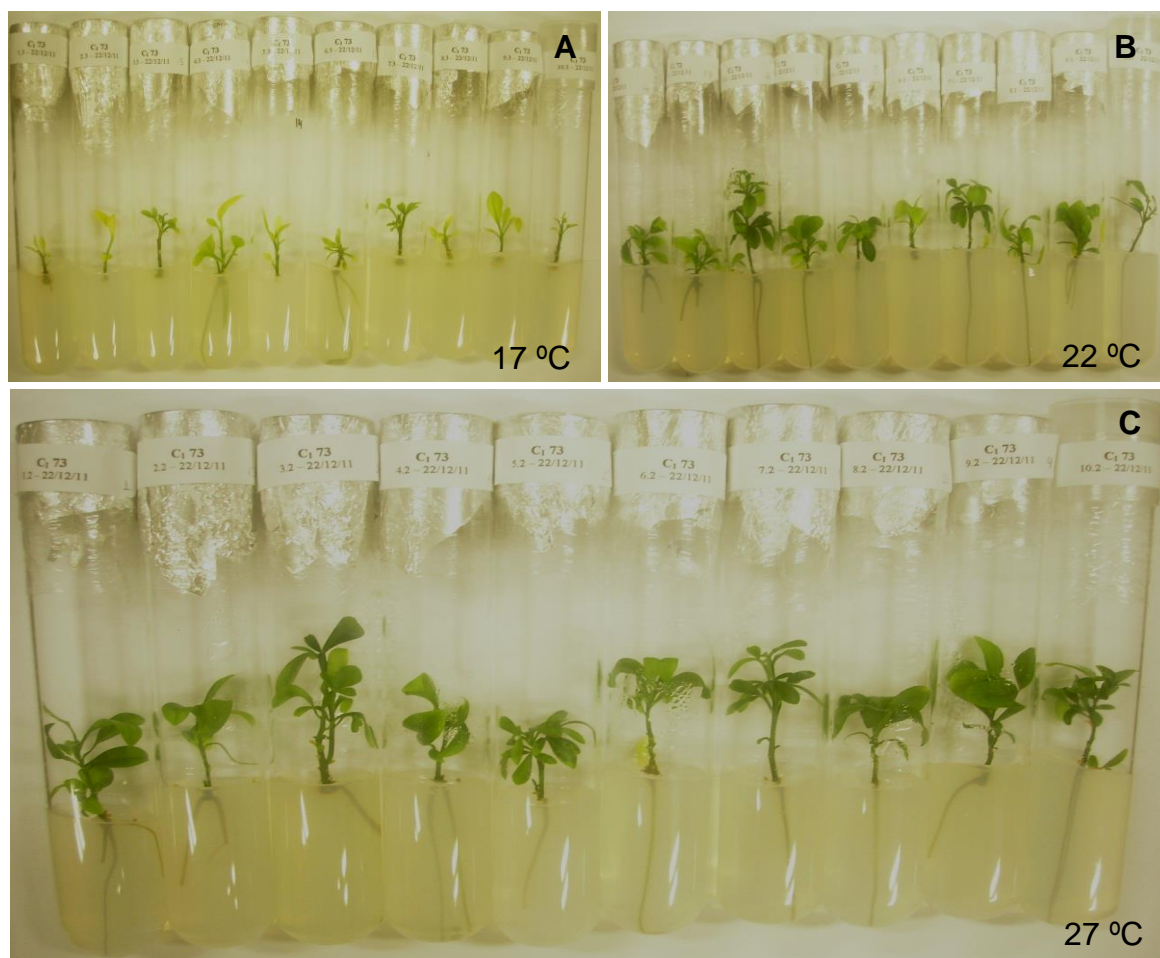


Figura 1. Plantas, da esquerda para direita, dos genótipos limoeiro ‘Cravo’ clone comum, limoeiro ‘Volkameriano’ clone Catânea 2, citrange ‘Carrizo’, limoeiro ‘Rugoso Mazoe’, híbrido TSKC x CTSW 03, laranjeira ‘Azeda’ clone Narrow Leaf, citrange ‘Troyer’, laranjeira ‘Azeda’ clone comum, híbrido TSKC x (TR x LCR) 059 e citrumelo ‘Swingle’, respectivamente, cultivadas *in vitro* na câmara climatizada com 17 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h (A); em sala com 22 ± 1 °C densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h (B); e em sala com 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h (C) durante 180 dias. Foto: Antônio da Silva Souza

Por outro lado, o cultivo na sala com temperatura de 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h apresentou valores de altura mais baixos que os alcançados na sala com 27 ± 1 °C, ainda que alguns genótipos não diferissem estatisticamente entre si. No entanto, as diferenças observadas no número de folhas verdes em cada ambiente devem ser

consideradas (Tabela 4), uma vez que essa é uma variável determinante para a escolha de uma boa condição de conservação. Além do NFV, a condição fisiológica dessas folhas também foi levada em conta nesse ambiente, como pode ser observado na Figura 1B.

Tabela 4. Valores médios do número de folhas verdes dos genótipos de citros em função dos ambientes de conservação *in vitro*.

AMBIENTE	MÉDIAS
Câmara climatizada com temperatura de 17 ± 1 °C	4,61 c
Sala com temperatura de 22 ± 1 °C	7,50 b
Sala com temperatura de 27 ± 1 °C	8,93 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A senescência é sem dúvida um indicador importante para a conservação de germoplasma *in vitro*, já que, a semelhança do que ocorre *in vivo*, é a expressão do processo de envelhecimento da planta. A dificuldade é determinar quanto de senescência deve ser considerada para se estabelecer o momento adequado de se realizar um subcultivo e não comprometer a regeneração posterior das plantas (CANTO et al., 2004), mas ter um intervalo eficiente entre os subcultivos. Esse tem sido um dos desafios das grandes coleções *in vitro* e para o estabelecimento de novas coleções.

Quanto ao número de microestacas, não houve diferenças significativas entre os cultivos a 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C para nenhum dos genótipos estudados, tornando essa variável secundária na decisão de qual é o melhor ambiente de cultivo para a conservação *in vitro* desses genótipos. Praticamente o mesmo comportamento foi observado para MPS. Esse aspecto foi evidenciado pela correlação entre a AP e essas variáveis.

A contribuição das variáveis baseada nas correlações entre as variáveis originais e os componentes principais se encontra na Tabela 5. As variáveis que mais contribuíram para explicar o comportamento observado entre os genótipos dentro do componente principal 1 no ambiente de cultivo câmara climatizada (17 ± 1 °C) foram AP (39,98%), NM (34,53%) e NFS (15,43%). Já nos ambientes salas com 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C as variáveis que mais contribuíram foram AP (27,10% e 31,38%), MPS (27,96% e 31,06%) e NM (26,43% e 29,35%) (Tabela 6). Para o

componente principal 2 em todos os ambientes de cultivo, a variável NFV foi a mais determinante. De maneira geral, considerando os componentes principais 1 e 2, as variáveis que mais contribuíram para identificar as diferenças no comportamento dos genótipos em função dos ambientes de cultivo *in vitro* foram NFV e AP.

Tabela 5. Contribuição das variáveis baseada nas correlações entre as variáveis originais e os componentes principais do cultivo *in vitro* de genótipos de citros nos ambientes: câmara climatizada com 17 ± 1 °C e salas com temperaturas de 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C.

Variáveis	Câmara climatizada com 17 ± 1 °C		Sala com 22 ± 1 °C		Sala com 27 ± 1 °C	
	CP1 (46,16%)	CP2 (30,00%)	CP1 (68,82%)	CP2 (21,86%)	CP1 (61,74%)	CP2 (27,30%)
AP	39,98	0,54	27,10	0,80	31,38	0,80
NFV	1,59	48,62	10,40	44,97	0,10	59,42
NFS	15,43	11,10	8,11	53,89	8,11	37,66
NM	34,53	2,17	26,43	0,30	29,35	1,92
MPS	8,47	37,58	27,96	0,04	31,06	0,19

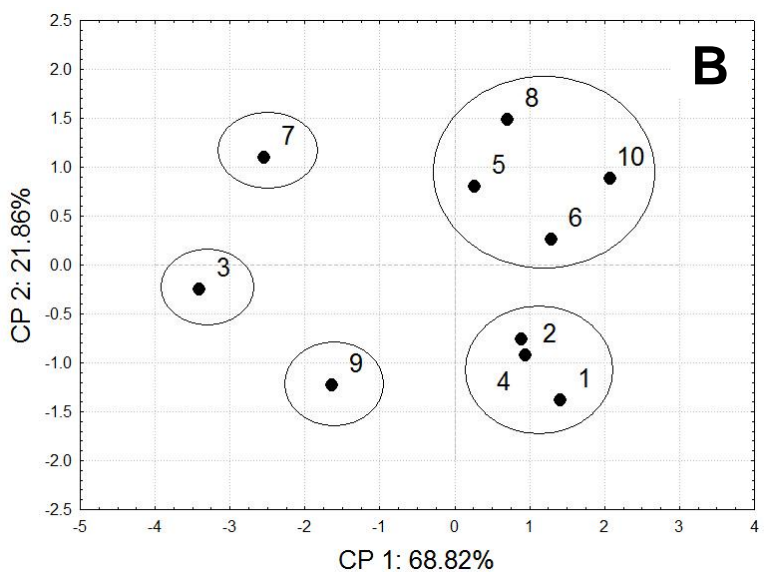
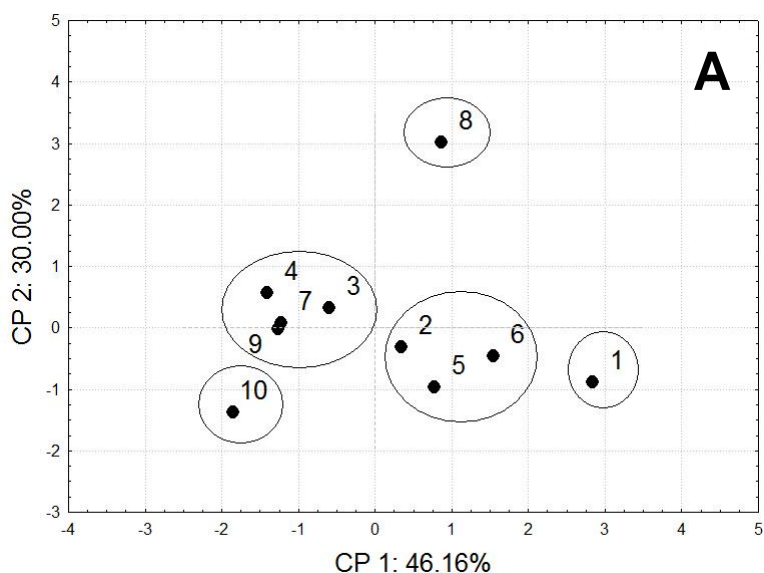
AP (altura de planta); NFV (número de folhas verdes); NFS (número de folhas senescentes), NM (número de microestacas) e MPS (massa da planta seca). CP1 (componente principal 1) e CP2 (componente principal 2).

O primeiro e o segundo componente para os diferentes ambientes representaram conjuntamente 76,16%, 90,68% e 89,04% do total da variação nos ambientes de 17 ± 1 °C, 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C, respectivamente.

A técnica de componentes principais permitiu agrupar os genótipos com comportamento semelhante em função do ambiente de cultivo utilizado. A partir disso, observou-se que o cultivo dos diferentes genótipos de citros na câmara climatizada com 17 ± 1 °C e nas salas com 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C formaram cinco grupos distintos (Figura 2), ainda que diferentes entre si, mostrando as respostas diferenciadas de cada genótipo ao ambiente de cultivo. Também foi possível observar que tanto na sala com 22 ± 1 °C quanto na de 27 ± 1 °C, os genótipos 3 (citrange 'Carrizo') e 7 (citrange 'Troyer') ficaram isolados. Ambos os genótipos mostraram maior crescimento em todas as variáveis avaliadas (Tabela 3) e, provavelmente por isso, se destacam em grupos separados. Por sua vez, os genótipos 5, 6 e 8 se agrupam tanto a 22 ± 1 °C quanto no cultivo a 27 ± 1 °C. Já

a resposta destes genótipos com a redução da temperatura é diferenciada, tendo o genótipo 8 apresentado maiores valores de NFS, ficando isolado dos demais nessa condição e deixando evidente que é mais susceptível à senescência nesse ambiente de cultivo.

Esses resultados mostram que a técnica de componentes principais contribui para um melhor gerenciamento da coleção *in vitro*, pois facilita o planejamento dos subcultivos em função da semelhança de comportamento entre os genótipos. Vale destacar que a aplicação desta ferramenta para a análise de um número elevado de acessos, de diferentes espécies e gêneros, fará uma diferença significativa na eficiência do manejo da coleção.



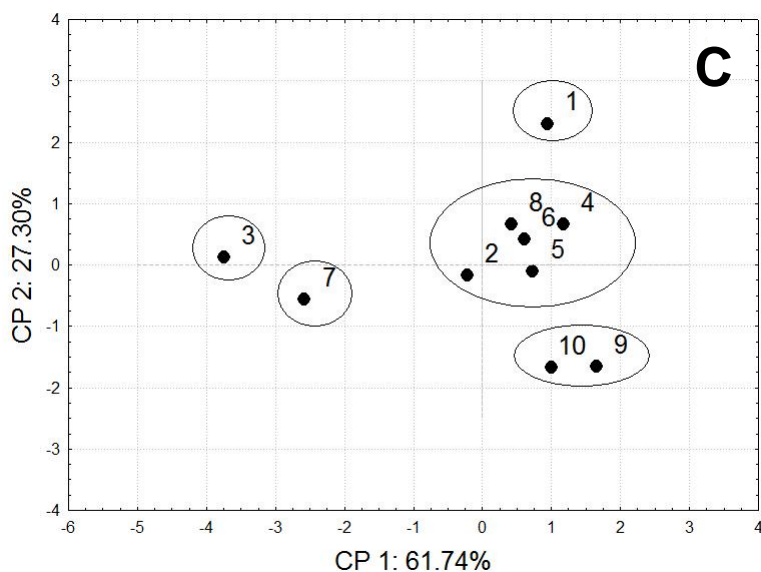


Figura 2. Gráficos de dispersão dos escores dos componentes principais 1 e 2 do cultivo *in vitro* de genótipos de citros nos ambientes: câmara climatizada com 17 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h (A); em sala com 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h (B); e em sala com 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h (C). A numeração de 1 a 10, para os grupos formados, corresponde aos 10 genótipos de citros identificados na mesma ordem da tabela 4.

No que se refere às diferenças observadas entre os diferentes genótipos, segundo o critério de Singh (1981) (Tabela 6), as variáveis que mais contribuíram para tal comportamento na condição de 17 ± 1 °C foram o NFV e o NFS enquanto que nas condições de 22 ± 1 °C e 27 ± 1 °C o NFV e AP foram mais determinantes.

Tabela 6. Contribuição relativa das variáveis para a diversidade segundo o critério de Singh (1981), em cada ambiente, para altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM) e massa da planta seca, em g (MPS) de genótipos de citros cultivados em diferentes ambientes de conservação *in vitro*.

Variáveis	Câmara climatizada		Sala com 22 ± 1 °C		Sala com 27 ± 1 °C	
	com 17 ± 1 °C		Sij	Sij(%)	Sij	Sij(%)
	Sij	Sij(%)				
AP	15,35	12,12	42,26	17,97	52,36	21,77
NFV	68,93	54,45	150,31	63,92	128,78	53,53
NFS	40,21	31,76	20,93	8,90	37,46	15,57
NM	2,10	1,66	21,65	9,21	21,97	9,13
MPS	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00

AP (altura de planta); NFV (número de folhas verdes); NFS (número de folhas senescentes), NM (número de microestacas) e MPS (massa da planta seca).

A temperatura está entre os fatores mais considerados para a obtenção do crescimento mínimo, na busca de condições ótimas de conservação *in vitro*, uma vez que qualquer espécie possui uma temperatura ideal de cultivo e uma intensidade luminosa que mais podem favorecer o seu desenvolvimento.

A redução da temperatura é uma estratégia comum para espécies tropicais e subtropicais, que costumam responder de forma significativa e diferenciada, no que se refere a redução do metabolismo das plantas (NORMAH et al., 2013), casos do abacaxi (CANTO et al., 2004; SOUZA et al., 2006), mandioca (SOUZA et al., 2009), cana-de-açúcar (LEMOS et al., 2002), videira (SILVA et al., 2012), bananeira (OLIVEIRA et al., 2000) e batata (CONCEIÇÃO et al., 1999).

Segundo Lemos et al. (2002), temperaturas muito baixas (12 °C) ou mais altas (25 °C) promoveram amarelecimento e morte dos explantes, parecendo ser inadequadas para manter a viabilidade dos explantes de cana-de-açúcar conservados *in vitro*. Esses autores ressaltam que o uso de temperaturas excessivamente baixas no cultivo *in vitro* pode provocar a redução da ação de enzimas importantes, comprometendo, dessa forma, o metabolismo geral das plantas. A temperatura ideal vai depender da espécie em questão e por isso a necessidade de vários estudos quando se pretende iniciar uma coleção *in vitro*.

Plantas tropicais e subtropicais normalmente suportam redução de temperatura entre 15 °C e 20 °C (SOUZA et al., 2009). Entretanto, os resultados com citros nesse trabalho mostraram que a condição de 17 °C é excessivamente baixa para os acessos avaliados, já que houve comprometimento no desenvolvimento das plantas conservadas.

Uma coleção de abacaxi, com 230 acessos é mantida nas condições de 22 °C, fotoperíodo de 12 horas. A redução do metabolismo das plantas conservadas foi obtida por meio de uma interação da temperatura reduzida com a redução dos sais do MS (SOUZA et al., 2006).

Da mesma forma, acessos de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] foram conservados sob o regime de crescimento lento por um período de 270 dias, reduzindo-se a concentração dos sais do MS a 25% de sua concentração normal, na temperatura de 18 °C. Para muitas espécies a associação de diferentes fatores se faz necessário para a obtenção de um resultado satisfatório (SANTOS et al., 2012).

Neste trabalho, a redução do metabolismo para a maioria dos genótipos foi obtida cultivando-se em ambiente com temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas, utilizando-se o meio WPM como meio básico. Os resultados mostraram plantas bem conservadas por 6 meses e com potencial para suportarem um intervalo de subcultivo maior. A introdução *in vitro* de aproximadamente 30 acessos do BAG citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (dados não apresentados), e que vêm sendo mantidos nessa condição, tem demonstrado a possibilidade de um tempo de conservação bem superior a 6 meses, tendo alguns acessos chegado a 1 ano sem subcultivos nessa condição de temperatura e fotoperíodo. A avaliação destas plantas está em andamento e poderá confirmar os resultados obtidos neste trabalho, assim como trazer dados novos, visto que o número de acessos é bem mais elevado.

Resultados semelhantes a esses foram obtidos por Silva et al. (2012), em que genótipos de videira puderam ser armazenados *in vitro* por 6 meses, em meio WPM, a 20 °C, assim como por Camillo et al. (2009), onde a temperatura de 20 °C associada ao meio de cultura WPM/2 mostrou ser uma condição eficiente para a manutenção e conservação de explantes de *Cochlospermum regium* sob regime de crescimento mínimo *in vitro*. Silva e Scherwinski-Pereira (2011) também

observaram que a temperatura de 20 °C foi efetiva para a conservação *in vitro* de brotos de *Piper aduncum* e *P. hispidinervum*.

Os trabalhos na conservação *in vitro*, cada vez mais, vêm apresentando resultados promissores e, com isso, permitindo um intervalo maior entre os subcultivos. Em cana-de-açúcar, Lemos et al. (2002) observaram que é possível conservar sob crescimento lento, por 12 meses, microplantas mantidas sob temperatura de 15 °C.

Oliveira et al. (2000) constataram que o intervalo entre as transferências dos acessos diploides de bananeira conservados *in vitro* deve ser de 180, 360 e 450 dias, mantendo-se, respectivamente, as temperaturas médias a 26 °C, 22 °C e 17 °C. De acordo com o CGIAR (2012), para a conservação *in vitro* de bananeira, as condições de cultivo mais indicadas são temperatura de 16 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 24 h. Já para mandioca, as condições indicadas são temperatura de 18-24 °C, densidade de fluxo de fótons de $18,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h.

As pesquisas em cultura de tecidos de muitas culturas, entre elas podemos citar os citros, revelam que as respostas morfogênicas de plantas cultivadas *in vitro* são influenciadas pelo genótipo, o tipo de explante e o meio de cultura. Marin e Duran-Vila (1991) utilizaram um protocolo de micropropagação para conservar germoplasma de *Citrus* e gêneros afins *in vitro*, sob temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $40 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, realizando de um a dois subcultivos por ano. Esses autores concluíram que o protocolo pode ser facilmente aplicado a muitas espécies e parentais de citros, enquanto aguardam o desenvolvimento de melhores técnicas. No entanto, essas condições de maior temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo normalmente aceleram os processos metabólicos das plantas, reduzindo o intervalo entre subcultivos.

Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, o que se busca no manejo de grandes coleções é a possibilidade de se obter um protocolo que favoreça o maior número de acessos possível, facilitando o planejamento das transferências e determinando um intervalo de subcultivos que possa garantir a estabilidade genética das plantas conservadas e tornar menos laboriosa a manutenção.

CONCLUSÕES

As variáveis que mais contribuíram para explicar a variabilidade observada devido ao efeito do comportamento dos genótipos de citros em diferentes condições de cultivo *in vitro* foram número de folhas verdes e altura de planta.

A ambiente de cultivo com 17 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h mostrou-se inapropriado para o cultivo de genótipos de citros *in vitro*.

A melhor condição para reduzir o metabolismo das plantas foi o ambiente de cultivo com 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h.

A técnica de componentes principais pode ser considerada uma ferramenta eficiente para estudar o comportamento de genótipos de citros conservados em diferentes ambientes de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - Brazilian Journal of Medicinal Plants**, Botucatu: Fundação Instituto de Biociências, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. de C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CGIAR. Disponível em: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&Itemid=742. Acesso em: 21 agosto 2012.

CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de

segmentos caulinares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p.182-185, 1999.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.

DURAN-VILA, N.; ORTEGA, C.; OLIVARES-FUSTER, O.; NAVARRO, L. Crioconservación de germoplasma de cítricos. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 24-26, 2005.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 267-270, 2006.

HAIR JR., J. F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. 6th ed. **Multivariate data analysis**, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall Editor, 2006.

ISLAM, M. T., DEMBELE, D. P.; KELLER, E. R. J. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.81, p. 123-130, 2005.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A.O.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, p.346-351, 2007.

LEMO, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; ALBUQUERQUE, M.M.; RAMALHO NETO, C.E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.37, p.1359-1364, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Seattle, n. 30, p. 421-427, 1980.

MARIN, M. L.; DURAN-VILA, N. Conservation of citrus germplasm *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, n. 116, p. 740-746, 1991.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: conservação *in vitro***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 318).

MOOSIKAPALA L; TE-CHATO S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

MORINI, S., MARZIALETTI, P., BABUIERE, C. *In vitro* growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 28, p. 245-248, 1991.

NEGASH A.; KRENS, F.; SCHAART, J.; VISSER, B. *In vitro* conservation of enset under slowgrowth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.66, n.2, p.107-111, 2001.

NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. R. **Conservation of tropical plant species**. New York: Springer. 2013. 172 p.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVA, S. de O. e.; SILVA, K. M. da; SILVEIRA, D. G. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agricola**, São Paulo, v.57, n.2 , p. 245-249, 2000.

RAO, N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.2, p.136-145, 2004.

SÁ, A. J.; LEDO, A. da S.; LEDO. C. A. da S. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; BLANK, A. F.; MENEZES, M. M. L. A. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal** (Impresso), Uberlândia, v. 28, p. 963-970, 2012.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, M. M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants: progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Development Biology Plant**, Wallingford, v. 42, p. 206-214, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; COSTA, F.H.S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.47, n.3, p.344-350, 2012.

SILVA, T. L. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.4, p.384-389, 2011.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, S. V.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 90).

SOUZA, F. V. D. ; SOARES, T.L. ; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C. da; BENJAMIM, D. A. Slow-Grow Conditions for the in vitro conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.702, p. 41-47, 2006.

STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. Available at: < www.statsoft.com>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho buscou-se adequar condições de crescimento mínimo na busca de um protocolo eficiente de conservação *in vitro* que possa ser usado para estabelecer uma duplicata de segurança do BAG citros que se encontra em condições de campo na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

O primeiro capítulo abordou os efeitos que o meio básico, assim como a concentração de sacarose podem ter no crescimento mínimo e como se poderia adequar esses fatores para favorecer a desaceleração do crescimento. Usou-se apenas um genótipo a fim de servir como modelo para o estabelecimento de um experimento envolvendo maior número de genótipos. Outro aspecto abordado no Capítulo 1 foi a questão das análises estatísticas que rotineiramente são realizadas para avaliar a conservação *in vitro*, considerando o uso de análises multivariadas. Os resultados obtidos mostraram que o meio WPM, seja na metade de sua concentração ou na concentração original, em combinação com 25 g.L⁻¹ de sacarose, reduz o metabolismo das plantas, sem, no entanto comprometer o vigor e a possibilidade de uma regeneração eficiente pós-conservação. As análises realizadas, por sua vez, permitiram decidir melhor sobre as variáveis realmente importantes, assim como prever alguns comportamentos *in vitro*, a partir de tratamentos utilizados. As regressões polinomiais foram uma boa contribuição neste sentido.

A partir dos resultados obtidos no Capítulo 1, outros genótipos foram avaliados, assim como outros fatores considerados importantes para a desaceleração do crescimento na conservação: a temperatura, o fotoperíodo e a intensidade luminosa. Três ambientes distintos envolvendo esses fatores foram avaliados. Análises de componentes principais foram realizadas a fim de agrupar os diferentes genótipos por comportamentos similares, assim como estabelecer que variáveis devem efetivamente ser consideradas para esse tipo de trabalho com citros.

O ambiente com 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h foi o que proporcionou os dados mais interessantes, assim como as variáveis que se mostraram mais determinantes para os resultados foram a altura das plantas e o número de folhas verdes, que em conjunto expressam melhor o estado fisiológico da planta, assim como a redução do metabolismo.

O agrupamento dos genótipos, obtido pela análise dos componentes principais, quando ampliado para um grande número de genótipos, se constitui em uma ferramenta valiosa para facilitar o manejo do BAG *in vitro*, já que possibilita o planejamento dos subcultivos, com base nos comportamentos similares.

O trabalho realizado é indicado, entretanto, para espécies poliembriônicas, priorizando os embriões nucelares com constituição genética idêntica à planta mãe.

No entanto, as espécies monoembriônicas ou com baixa poliembrionia continuam a representar o maior desafio relacionado à conservação *in vitro* de citros, uma vez que o estabelecimento dessas espécies deve ser feito a partir de ápices meristemáticos, de forma a garantir a conservação da planta matriz. Contudo, a técnica não é empregada satisfatoriamente para muitas espécies arbóreas porque o meristema não se regenera completamente, impedindo a formação da planta em todas as suas características (NAVARRO, 1981). Para citros não foram encontrados trabalhos dessa natureza na literatura, o que dificulta o estabelecimento *in vitro* das espécies monoembriônicas ou com baixa poliembrionia.

Finalmente, os resultados obtidos nesse trabalho serão aplicados para vários acessos do BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que conta, atualmente, com 813 acessos, a fim de ampliar a coleção existente, assim como adequar e otimizar os fatores que se fizerem necessários.

REFERÊNCIA

NAVARRO, L. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* and its applications: a review. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Tokyo, Japão, v. 1, p. 452-456, 1981.

ANEXO

Anexo 1: Valores médios da altura de planta (cm), número de microestacas e massa da planta seca (g) do limoeiro 'Rugoso da Flórida' em função das concentrações de WPM e de sacarose.

WPM	Sacarose (g.L ⁻¹)			
	0,0	12,5	25,0	50,0
Altura de plantas				
1/1	3,1571 a	3,8600 a	5,1357 a	6,6467 a
1/2	3,8154 a	4,0867 a	5,1267 a	4,7733 b
1/4	3,1133 a	3,8467 a	4,0067 b	3,4333 c
Número de microestacas				
1/1	1,0000 a	1,1333 a	1,7143 a	1,5333 a
1/2	1,2308 a	1,4667 a	1,4667 ab	1,7333 a
1/4	1,3333 a	1,5333 a	1,2667 b	1,3333 a
Massa da planta seca				
1/1	0,0366 b	0,1231 a	0,1159 a	0,1921 a
1/2	0,0814 a	0,1284 a	0,1273 a	0,1564 a
1/4	0,0694 ab	0,0775 b	0,0954 a	0,0996 b

médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.