

Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'

Mariane de Jesus da Silva de Carvalho¹; Emanuela Barbosa Santos¹; Antônio da Silva Souza²; Carlos Alberto da Silva Ledo²; Walter dos Santos Soares Filho²; Maria Inês de Souza Mendes¹

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, nº 710, Centro. Cruz das Almas, BA. CEP 44380-000. E-mails: marianejs@yahoo.com.br; emanuela_bs@hotmail.com; inessm.123@gmail.com.

²Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. CEP 44380-000. E-mails: antonio.silva-souza@embrapa.br; carlos.ledo@embrapa.br; wsoares@cnpmf.embrapa.br.

Resumo: A conservação *in vitro* é uma estratégia complementar à conservação tradicional dos citros. O estabelecimento de condições de crescimento mínimo é fundamental para conservação *in vitro* de germoplasma, assim como uma avaliação eficiente dos tratamentos aplicados para atingir o objetivo esperado. Em vista disto, este trabalho teve por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo para conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. Os fatores considerados foram concentração do meio básico WPM, volume do meio de cultivo e análises estatísticas univariada e multivariadas. Nesse experimento, microestacas de plantas cultivadas *in vitro* por um período de 90 dias, com aproximadamente 1 cm, foram inoculadas em tubos de ensaio com diferentes volumes (10, 15 e 20 mL) do meio de cultura WPM em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4) suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, 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 3, 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. A utilização do meio de cultura WPM na concentração normal e volume de 20 mL mostraram-se mais adequados para redução do crescimento das plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' conservadas *in vitro*.

Palavras chave: *Citrus*, Cultura de tecidos, Crescimento mínimo.

Factors that affect the *in vitro* conservation of plants of lemon 'Rugoso da Flórida'

Abstract: The *in vitro* conservation is a complementary strategy to the conservation of traditional citrus. The establishment of conditions of minimum growth is essential for *in vitro* conservation of germplasm, as well as an efficient evaluation of treatments applied to achieve the expected objective. In view of this, the objective of this study was to establish a minimum growth for *in vitro* conservation of plants of lemon 'Rugoso da Flórida'. The factors considered were concentration of basic medium WPM, volume of the culture medium and univariate and multivariate statistical analysis. In this experiment, microcuttings from *in vitro* grown plants for a period of 90 days, with approximately 1 cm, were inoculated in test tubes with different volumes (10, 15 and 20 mL) of WPM medium in different concentrations (1/1, 1/2 and 1/4) supplemented with 25 g.L⁻¹ of sucrose, 7 g.L⁻¹ of agar and the pH adjusted to 5.8. The experiment was conducted in a completely randomized design with 15 replications, 3 x 3 factorial, and maintained under controlled conditions during 360 days. The technique of multivariate analysis can be considered as an efficient tool for studies of *in vitro* conservation of germplasm having allowed the selection of determinant variables for the proposed objective. The use of the WPM medium in normal concentration and volume of 20 mL was more appropriate for reducing the growth of the plants in the lemon 'Rugoso da Flórida' preserved *in vitro*.

Key Words: *Citrus*, Tissue culture, Growth minimum.

Introdução

O gênero *Citrus* e afins (*Poncirus*, *Fortunela*) pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae (CAPUTO, 2012). 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 para seu desenvolvimento na faixa subtropical de outras longitudes, embora seja nos trópicos onde se verificou a maior evolução no seu cultivo.

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. Na última década, quatro doenças: cancro cítrico, clorose variegada dos citros, morte súbita e a mais recente e ameaçadora Huang long bing provocaram a erradicação de 39 milhões de plantas dos pomares cítricos 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).

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). No Brasil, destacam-se os Bancos de Germoplasma (BAGs) do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” com 2000 acessos (MACHADO et al., 2011), seguido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, que é a segunda maior coleção de germoplasma de citros do país, com 813 acessos (PASSOS et al., 2007) e o Programa Fruticultura do IAPAR com 509 acessos (IAPAR, 2013).

No Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura, os acessos são conservados sob condições de campo, reunindo 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. Essa coleção é 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, contribuindo para a diversificação do pomar cítrico nacional, altamente concentrado na combinação laranja ‘Pêra’ / limão ‘Cravo’ (SOARES FILHO, 1998; PASSOS et al., 2007).

Tanto as espécies nativas, exploradas de forma extrativista, quanto as espécies cultivadas na agricultura tradicional estão submetidas a riscos de extinção. Situação esta que se agrava ao longo dos anos, motivada por várias causas, embora uma quantidade expressiva de germoplasma tenha sido resgatada e esteja armazenada em diversas instituições de ensino e pesquisa do país, desde a década de 70.

Bancos de germoplasma em condições de campo têm como desvantagem a sua vulnerabilidade a uma série de fatores bióticos e abióticos, tais como à contínua exposição ao ataque de pragas e doenças, intempéries climáticas, além disso, esse método de conservação 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).

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas na agricultura moderna (SOARES et al., 2008). 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.

Na conservação *in vitro* são utilizadas estratégias para limitar o crescimento das plantas, como a redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução nas concentrações de sais do meio de cultura e omissão de elementos nutritivos (SOUZA et al., 2009), 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).

Existem várias formulações de meios

nutritivos, entre as mais utilizadas estão: o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), o B5 (GAMBORG et al., 1968), e o SP (BARRUETO CID, 2005). O meio de cultura WPM tem sido amplamente utilizado com sucesso para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001), a exemplo da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.) (VILLA et al., 2006), “pata-de-vaca” (*Bauhinia cheilantha*) (GUTIÉRREZ et al., 2011) e umburana-de-cheiro [*Amburana cearensis* (Allem.) A. C. Smith] (CAMPOS et al., 2013), apresentando ainda bons resultados na conservação *in vitro* de outras espécies, como o algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger] (CAMILLO et al., 2009) e a videira (*Vitis vinifera* L.) (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).

Variações na concentração e volume do meio de cultura são fatores que têm sido analisados na micropropagação e conservação *in vitro* de diferentes espécies (PEREIRA, 2006; REIS et al., 2007; AHMED E ANJUM, 2010; SANTA-ROSA, 2010; ASSIS et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Conforme Santos et al. (2012) a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo é uma estratégia amplamente empregada para a conservação sob crescimento lento. No entanto, é necessário que as plantas conservadas estejam com vigor suficiente para restabelecer seu crescimento e potencial de propagação normal quando transferidas para o meio de propagação.

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).

Em vista do exposto, este trabalho teve por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo para conservação *in vitro* de plantas do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ (*Citrus jambhiri* Lush.) variedade a ser usada como modelo para otimizar a conservação *in vitro* de germoplasma de citros.

Material e métodos

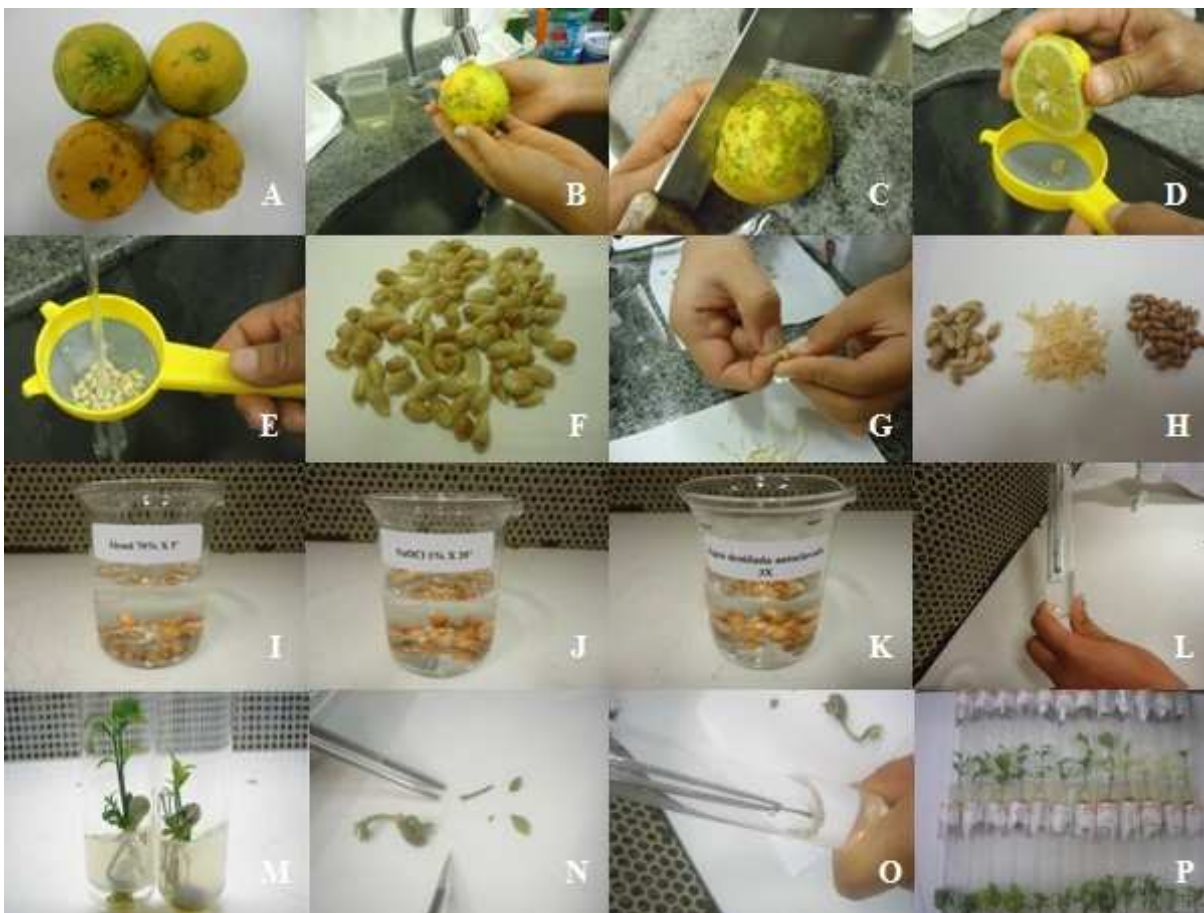
Foram utilizados frutos maduros do limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ (*Citrus jambhiri* Lush.) (Figura 1A) cultivado no campo experimental de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. Os frutos coletados foram lavados em água corrente (Figura 1B), no Laboratório de Cultura de Tecidos, 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). Na câmara de fluxo laminar as sementes foram submetidas a um processo de assepsia mediante a imersão em álcool 70% por 5 minutos (Figura 1I), seguido da imersão 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 cultivadas 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). Após esse período, as plantas obtidas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura com a constituição anterior por um período de 90 dias sob as mesmas condições.

Microestacas, com aproximadamente 1 cm de tamanho (Figura 1N), foram utilizadas como explantes e inoculadas em tubos de ensaio

contendo 10 mL do meio de cultura WPM em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4) e volumes (10, 15 e 20 mL), 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 10).

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 de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo com três gotas de Tween-20 (I-J), enxaguadas em água destilada e esterilizada (K) e cultivadas em meio de cultura (L), originando plântulas (M) que após 45 dias de cultivo sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo foram seccionadas (N) e as microestacas cultivadas 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). Para determinação da massa da planta seca procedeu-se a secagem do material em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C até a massa constante.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 3, três concentrações de WPM (1/1; 1/2 e 1/4) e três volumes de meio de cultura (10, 15 e 20 mL), com 15 repetições, sendo 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 e volumes do WPM foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 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 E REGAZZI, 1997).

Resultados e discussão

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

As variáveis que mais contribuíram para explicar a diferença existente no comportamento das plantas conservadas em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM foram NFV e AP com 80,67% e 15,99%, respectivamente (Tabela 1). Essas variáveis são fundamentais para o estabelecimento de protocolos 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. Na conservação de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM, observa-se que apenas a variável AP apresentou efeito significativo na interação volume x concentração (Tabela 2).

Tabela 1 - Contribuição relativa das variáveis para a diversidade (Sij) 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) em função das concentrações e volume de WPM utilizando microestacas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'.

Variável	Sij	Sij (%)
AP	46,13	15,99
NFV	232,80	80,67
NFS	3,54	1,23
NM	5,95	2,06
MPS	0,14	0,05

Para NFV e MPS houve efeito significativo para os fatores isolados volume e concentração, enquanto que para NM houve significância apenas para o fator concentração de WPM. Os CV's variaram de 13,18% a 40,75%, para NFV e NFS, respectivamente. A análise de variância multivariada mostrou, de acordo com o valor calculado pelo critério de Wilks (Λ), que houve efeito significativo para todas as variáveis estudadas. 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. Essa correlação parcial estabelece o grau de associação entre duas variáveis, eliminando o efeito dos tratamentos, ou seja, identifica uma correlação verdadeira entre as variáveis.

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, em g (MPS) do limoeiro 'Rugoso da Flórida' conservado *in vitro* em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM.

FV	GL	QM					Λ
		AP	NFV	NFS	NM	MPS	
Volume	2	1,9092 ^{ns}	1,9081**	0,2309 ^{ns}	0,1289 ^{ns}	0,0606**	0,7548**
Concentração	2	10,8333**	1,5197**	0,1927 ^{ns}	0,3064**	0,0303*	0,7390**
Vol. x Conc.	4	12,6953**	0,2825 ^{ns}	0,0440 ^{ns}	0,0266 ^{ns}	0,0131 ^{ns}	0,6469**
Erro	123	1,9947	0,2032	0,1361	0,0494	0,0067	
CV (%)		28,02	13,18	40,75	14,70	33,69	
Média Geral		5,0409	11,4394	0,4545	1,8409	0,2436	

** 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.

Observa-se na Tabela 3 que as menores alturas de plantas foram obtidas nos volumes de 10 mL de meio de cultura WPM combinado com as concentrações de 1/2 e 1/4 de WPM (4,13 e 4,34 cm) não diferindo do volume de 15 mL combinados com 1/1 (4,62 cm) e 1/4 de WPM

(4,45 cm). Isso pode está relacionado a uma menor disponibilidade de nutrientes para as plantas em meios de cultura com menor concentração de sais, reduzindo o metabolismo das mesmas.

Tabela 3 - Valores médios da altura de planta (cm) do limoeiro 'Rugoso da Flórida', em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM.

Volume (mL)	Concentrações		
	1/1	1/2	1/4
10	5,9400 aA	4,1333 bB	4,3400 aB
15	4,6200 bB	6,3800 aA	4,4500 aB
20	5,7667 abA	5,0143 bA	4,6571 aA

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

Os volumes de 15 e 20 mL (11,41 e 12,93, respectivamente) e o meio de cultura WPM na sua concentração normal proporcionaram plantas com maiores NFV (12,93), condição de interesse efetivo para a conservação *in vitro*. (Tabela 4). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Junghans et al. (2002) que, trabalhando com microplantas de maracujazeiro (*P. edulis f. flavicarpa*) comprovaram também maior percentagem de folhas verdes com concentrações normais do meio de cultura utilizado, sendo este o meio MS. Os maiores NM foram obtidos no meio de cultura WPM na sua concentração normal (2,09), assim como na metade de sua constituição (1,86), não ocorrendo diferenças significativas para os volumes de meio

de cultura utilizados. A maior MPS também foi obtida quando se utilizou a concentração normal e metade da concentração do meio de cultura WPM, e os volumes de 15 e 20 mL (Tabela 4).

Não houve correlação significativa entre AP e NFV ($r = -0,04^{ns}$), mostrando que é possível a obtenção de plantas de menor altura e com maior NFV (Tabela 5), condição fundamental para a conservação *in vitro*.

O número de condição (NC) do diagnóstico de multicolinearidade foi de 4,90, indicando multicolinearidade fraca na matriz de correlação, indicando a possibilidade de obtenção de uma estimativa confiável em termos biológicos.

Tabela 4 - Valores médios do número de folhas verdes, número de microestacas e massa da planta seca (g) do limoeiro 'Rugoso da Flórida' em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM.

Volume (mL)	Médias	Concentração	Médias
Número de folhas verdes			
10	10,0444 b	¹ / ₁	12,9333 a
15	11,4091 ab	¹ / ₂	10,7955 b
20	12,9302 a	¹ / ₄	10,5349 b
Número de microestacas			
10	1,6667 a	¹ / ₁	2,0889 a
15	2,0000 a	¹ / ₂	1,8636 ab
20	1,8605 a	¹ / ₄	1,5581 b
Massa da planta seca			
10	0,2022 b	¹ / ₁	0,2430 ab
15	0,2582 a	¹ / ₂	0,2699 a
20	0,2719 a	¹ / ₄	0,2171 b

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

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) do limoeiro 'Rugoso da Flórida' conservado *in vitro* em diferentes volumes e concentrações do meio de cultura WPM.

	NFV	NFS	NM	MPS
AP	-0,04 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,48**	0,26**
NFV		0,08 ^{ns}	0,29**	0,28**
NFS			0,15 ^{ns}	-0,17 ^{ns}
NM				0,18*

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

De maneira geral, a utilização do meio de cultura WPM em sua concentração normal e nos volumes de 15 e 20 mL proporcionou os melhores resultados no que se refere a AP e NFV, o que permitiu a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida', prolongando o intervalo entre os subcultivos. Contudo, para fins de conservação *in vitro*, tubos contendo 20 mL do meio de cultura WPM podem aumentar o intervalo entre os subcultivos, pelo fato de se constituir em um maior volume a ser explorado pelas plantas. Com relação à concentração e volume do meio de cultura, para Assis et al. (2012) os meios de cultura MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram os mais eficientes na regeneração de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz, nos volumes de 15 e 25 mL, indicando a utilização do volume de 15 mL para uma maior economia. 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, ocorreu morte das brotações devido a escassez de nutrientes no meio de cultivo por um período de 360 dias, o meio de cultura contendo concentrações mais elevadas de sais foi o que proporcionou as melhores taxas de sobrevivência e regeneração.

Segundo Santa-Rosa (2010), a temperatura mais elevada e o volume do meio de cultura, provavelmente foram determinantes para o maior desenvolvimento de espécies de bromélias até os 9 meses e subsequente redução após esse período, evidenciando que a quantidade do meio de cultura é um aspecto a ser considerado como estratégia de conservação *in vitro* para as espécies de bromélias.

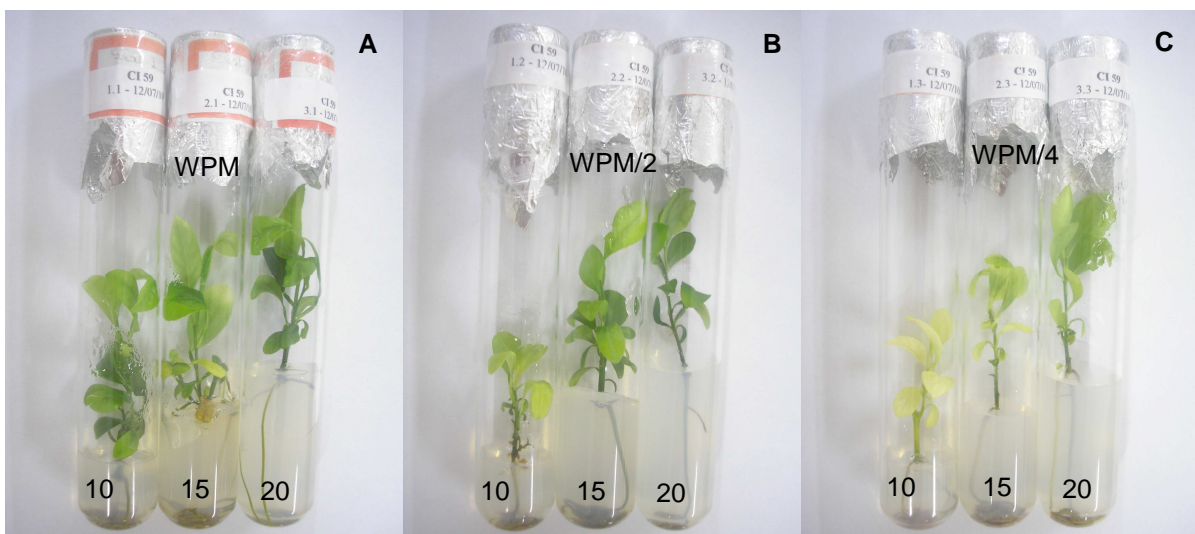
O espaço interno do recipiente de cultivo disponível para o crescimento do explante tem um efeito significativo sobre seu desenvolvimento *in vitro*. Além do volume do meio de cultura, este

espaço varia com a forma e volume do recipiente. Estas variáveis são raramente analisadas, embora interfiram no volume de ar no interior do recipiente e na profundidade do meio de cultura no mesmo (ASSIS et al., 2012). Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que essas variáveis influenciam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio. Esses fatores também interferem no crescimento e desenvolvimento da planta (PEREIRA et al., 2006). Murashige (1977), citado por Reis et al. (2007), afirmou que quanto menor o explante, menor a quantidade de meio de cultura a ser utilizado. Para ápices caulinares de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir.] e batata (*Solanum tuberosum* L.), 4 mL de meio líquido é suficiente para a diferenciação e crescimento inicial. Entretanto, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio de cultura. Já Carvalho et al. (1995), estudando a influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir.], verificaram que 10 mL de meio de cultura por frasco com quatro explantes proporcionaram maior formação de gemas em relação aos volumes de 20 e 30 mL e que no volume de 20 mL houve um melhor desenvolvimento dos explantes.

Reis et al. (2007) inferem que o rendimento esperado do cultivo *in vitro*, em se tratando do volume de meio de cultura, será em função do programa de desenvolvimento de cada espécie vegetal e conclui que o volume de meio de cultura influencia no crescimento *in vitro* de melissa (*Melissa officinalis* L.), sendo que à medida que se aumenta o volume de meio de cultura há tendência de aumento do número de nós e comprimento do maior broto.

Na concentração normal e no volume de 20 mL do meio de cultura WPM as plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' conservadas *in vitro* apresentaram-se mais verdes e vigorosas. Já a redução da concentração e volume do meio de cultura WPM proporcionaram o amarelecimento das folhas das plantas, reduzindo o vigor e aumentando o risco de perda destas durante a realização do subcultivo (Figura 2). Este aspecto também foi observado por Santos (2012) na conservação *in vitro* do capim vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty], onde as menores médias para coloração foram alcançadas utilizando-se 50 e 25% de sais MS. Segundo Rademacher (2000), os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal induzem aumento no conteúdo de citocininas, e os níveis de etileno são diminuídos, tendo como consequência um retardo na senescência.

Figura 2 - Plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' com 360 dias de conservação *in vitro* em meio de cultura WPM na concentração normal (A), na metade (B) e a 1/4 (C) com volumes de 10, 15 e 20 mL de meio de cultura por tubo, 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 concentração normal e volume de 20 mL. 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) propôs um protocolo de micropropagação para conservação de germoplasma de citros *in vitro*. O ciclo de subcultivos variou de 8-12 meses envolvendo várias operações (cultura de segmentos nodais, enraizamento de brotos e alongamento dos brotos enraizados). Este protocolo permitiu a manutenção de plantas regeneradas *in vitro* de citros por um período de até 12 meses, sobre o mesmo meio de cultura antes de subcultivar para meio de cultivo fresco. 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*. Por outro lado, Souza et al. (2011) utilizaram um protocolo que permite manter genótipos de *Citros* e gêneros relacionados que apresenta elevada poliembrião por um período de 18 meses sem subcultivar. Entretanto, 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, uma vez que nos estudos de conservação *in vitro* geralmente são utilizadas técnicas estatísticas univariadas para avaliar a eficiência dos tratamentos testados (RAKOSY-TICAN et al. 2012; RANI e DANTU 2012; SRIVASTAVA, et al. 2013). No entanto, neste trabalho demonstrou-se que a análise multivariada pode ser uma ferramenta diferencial e mais eficiente para o gerenciamento de uma coleção *in vitro*.

Apesar de todos os aspectos abordados, para determinar o momento em que os acessos podem ser subcultivados e evitar que entrem em senescência, o monitoramento do banco de

germoplasma *in vitro* deve focalizar principalmente o vigor e a viabilidade das plantas. Outro fator crucial para a exploração racional e eficiente dos bancos de germoplasma tanto na conservação sob limitação do crescimento, como em qualquer outro método alternativo, é que seja mantida a fidelidade genética dos acessos.

Conclusões

A técnica de análise multivariada pode ser considerada uma ferramenta eficiente para estudos de conservação *in vitro*.

A variabilidade observada devido ao efeito dos tratamentos na conservação *in vitro* do limoeiro 'Rugoso da Flórida' é melhor explicada pelo número de folhas verdes e altura de plantas.

O meio de cultura WPM na concentração normal com maior volume favorece a conservação *in vitro* do limoeiro 'Rugoso da Flórida', a partir de plantas com menor altura e satisfatório número de folhas verdes.

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.
- 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.
- ASSIS, K. C. de; PEREIRA, F. D.; CABRAL, J. S. R.; SILVA, F. G.; SILVA, J. W.; SANTOS, S. C. dos. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n.1, p. 77-83, 2012.
- 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.
- CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M. de; SANTANA, J. R. F. de; SOUZA, A. V. V. de. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- CAPUTO, M. M. **Avaliação de doze cultivares de laranja doce de maturação precoce na região sudoeste do Estado de São Paulo**. Piracicaba, 2012. 84f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. 2012.
- CARVALHO, R.; FAVARETTO, N.; PINTO, J. E. B.; DESCHAMPS, C.; INNECCO, R. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir]. **Ciência e Prática**. Lavras, MG, v. 19, n. 2, p. 158-164, 1995.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- DURÁN-VILA, N.; ORTEGA, C.; OLIVARES-FUSTER, O.; NAVARRO, L. Crioconservación de germoplasma de cítricos. **Phytoma**, Espanha, n. 170, p. 24-26, 2005.
- GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, 1968, v. 50, no. 1, p. 151-158.
- 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.
- GUTIÉRREZ, I. E. M. de; NAPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, J. R. F. de. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 260-265, 2011.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 593p.
- IAPAR. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=313>. Acesso em: 09 janeiro 2013.
- JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da S. **Cultivo in vitro de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura** In. XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura: Os Novos Desafios da Fruticultura Brasileira, Belém. 2002. CD-ROM
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. New Jersey : Prentice-Hall, 1992. 390p.
- LEMONS, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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).
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, H. C. A.; ROSADO, L. D. S.; BEIJO, L. A.; LAMEIRA, O. A. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 53-106, 2006.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 501-531, 2000.
- RAKOSY-TICAN, E.; BORS, B.; Szatmari, A. M. *In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.11, n.81, p. 14703-14712, 2012.
- RANI, D.; DANTU, P. K. Direct shoot regeneration from nodal, internodal and petiolar segments of *Piper longum* L. and *in vitro* conservation of indexed plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.109, p. 9-17, 2012.
- REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2007.
- SANTA-ROSA, S. **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. Feira de Santana, 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. 2010.
- 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.
- 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.
- 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.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NERY, F. C.; STEIN, V. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; FIGUEIREDO, M. A. de. Indução de calos em explantes foliares e caulinares de mangabeira. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 20, n. 2, p. 121-127, 2008.
- 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.
- 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).

SRIVASTAVA, M.; PURSHOTTAM, D. K.; SRIVASTAVA, A. K.; MISRA, P. (2013) In Vitro Conservation of Glycyrrhiza Glabra by Slow Growth Culture. **International Journal of Bio-Technology & Research**, Landover, v. 3, p. 49-58, 2013.

VILLA, F.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 266-270, 2006.

Recebido em: 18/06/2013
Aceito em: 17/06/2014