

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS COM
ESTUDO DA VIABILIDADE E ESTABILIDADE GENÉTICA

MARIA INÊS DE SOUZA MENDES

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

Abril de 2020

MARIA INÊS DE SOUZA MENDES

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS COM ESTUDO
DA VIABILIDADE E ESTABILIDADE GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Melhoramento Vegetal

Orientador: Dr. Abelmon da Silva Gesteira

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

Abril de 2020

MARIA INÊS DE SOUZA MENDES

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS COM ESTUDO
DA VIABILIDADE E ESTABILIDADE GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Melhoramento Vegetal

APROVADA: 29 de maio de 2020

Profa. Dr^a. Maria Angélica P. de Carvalho Costa
(UFRB)

Profa. Dr^a. Daniela Garcia Silveira
(IFBAIANO)

Profa. Dr^a. Mariane de J. da Silva de Carvalho
(FAMAM)

Prof. Dr^a. Dayse Drielly S. Santana Vieira
(UFOP)

Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira
(UESC - Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Criador, pela vida a mim concedida e pela permissão para a realização deste trabalho, assim como de tudo em minha vida.

Aos meus amados pais, Benedito e Tomazia, maiores cooperadores na edificação do meu eu, por toda dedicação, carinho, amor e incentivo sempre.

Aos meus queridos irmãos Roque, Cosme, Damiana, Inez, Fátima, Antônio, Benedito e Maria José, juntamente com seus cônjugues e filhos, pelo apoio, admiração e valiosos momentos proporcionados em família.

Aos meus tios e primos que mesmo distantes, de algum modo estão sempre presentes.

A todos os amigos pela amizade e torcida, me incentivando continuamente a ir além, em especial a 'sister' Denise Vila Verde pelo companheirismo de todas as horas.

Ao estimado Dr. Antônio Souza por toda orientação, dedicação, amizade, cuidado e ensinamentos que tive a honra de dispor durante toda minha carreira acadêmica e guardarei sempre com muito carinho e amor.

Ao meu orientador Dr. Abelmon Gesteira pela dedicação e conhecimentos transmitidos, os quais me farão crescer profissionalmente.

Aos meus co-orientadores Dr. Marcio Costa e Dr. Walter Soares Filho pelas contribuições e apoio, e por estarem sempre à disposição.

A grande família dos Laboratórios de Cultura de Tecidos e de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura pelas cooperações, aprendizados e muitas amizades construídas ao longo desses anos, as quais levarei sempre comigo, em especial Honorato, Andresa, Karen, Tânia, Denise, Camila e Leila, pelos trabalhos compartilhados e grandes colaborações no desenvolvimento desse estudo.

Ao pessoal do campo pela atenção e disponibilidade em cooperar sempre que foi necessário com os trabalhos desenvolvidos.

A UESC e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade, e a todo o seu pessoal pela dedicação e atenção na condução das atividades e para com os alunos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura por ter possibilitado a realização dessa pesquisa.

À FAPESB pela base financeira através da bolsa de estudo concedida.
E a todos que de alguma forma cooperaram com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

EXTRATO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
OBJETIVOS	14
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 1: Meio de cultura no estabelecimento e conservação <i>in vitro</i> de porta-enxertos de citros	24
Resumo	24
Abstract	25
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
3. Resultados	29
4. Discussão	43
5. Conclusões	49
6. Referências.....	49
CAPÍTULO 2: Conservação <i>in vitro</i> de porta-enxertos de citros com uso de paclobutrazol e análise da viabilidade e estabilidade genética	54
Resumo	54
Abstract	55
1. Introdução	55
2. Material e Métodos	58
3. Resultados	62
4. Discussão	76
5. Conclusões	82
6. Referências.....	82
CONSIDERAÇÕES GERAIS	89

EXTRATO

MENDES, Maria Inês de Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Abril de 2020. **Conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com estudo da viabilidade e estabilidade genética.** Orientador: Abelmon da Silva Gesteira (Embrapa /UESC). Coorientadores: Walter dos Santos Soares Filho (Embrapa) e Márcio Gilberto Cardoso Costa (UESC).

O germoplasma vegetal de citros é indispensável para a geração de novas cultivares, tendo papel fundamental nos programas de melhoramento genético. A principal forma de conservação de citros é em bancos de germoplasma a campo, contudo este método apresenta algumas desvantagens, podendo gerar perdas irreparáveis de acessos. Nesse sentido, a técnica de conservação *in vitro*, pode proporcionar uma maior segurança do germoplasma vegetal. Assim, o objetivo desse estudo foi estabelecer condições para conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com o estudo da viabilidade e estabilidade genética. Para isso, foram instalados experimentos avaliando-se as composições dos meios MS, RMAN e WPM e a adição de paclobutrazol (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹) ao meio de cultura, além da resposta em nível de genótipo. Plantas nucelares de 10 genótipos, confirmadas por meio de marcadores SSRs (Simple Sequence Repeats) foram conservadas em meio WPM basal, conforme condições pré-estabelecidas e decorridos 12 meses foi testada a viabilidade por meio de três subcultivos. Para verificação da estabilidade das plantas mantidas *in vitro*, foi realizada sua caracterização molecular, utilizando 21 marcadores microssatélites, no final do terceiro subcultivo, após 12 meses de conservação *in vitro*. A formulação RMAN propiciou percentagem de germinação de porta-enxertos de citros superior à obtida no meio MS e não diferiu da observada para o WPM. O meio WPM é o mais indicado para a conservação dos porta-enxertos *in vitro* quando comparado aos meios MS e RMAN, por manter a viabilidade e um desenvolvimento completo da planta ao longo dos subcultivos. O uso do paclobutrazol não mostrou eficiência na manutenção do crescimento reduzido nos genótipos de citros estudados, sendo o meio WPM basal o mais indicado para conservação *in vitro*. Plantas aclimatizadas, oriundas da conservação *in vitro* apresentam 100% de sobrevivência. Os marcadores SSRs foram eficientes na caracterização dos porta-enxertos estudados, revelando indivíduos híbridos apenas o genótipo HTR - 051 (20%). De modo geral as condições de conservação *in vitro* estudadas não afetaram a viabilidade das plantas. Os três ciclos de subcultivos realizados após a conservação não resultaram em variantes somaclonais. O protocolo de conservação descrito nesse estudo pode ser utilizado para a conservação *in vitro* dos porta-enxertos analisados.

Palavras-chave: *Citrus*, cultura de tecidos, melhoramento genético, marcadores SSR.

ABSTRACT

MENDES, Maria Inês de Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Abril de 2020. ***In vitro* conservation of citrus rootstocks with study of genetic viability and stability**. Orientador: Abelmon da Silva Gesteira (Embrapa /UESC). Coorientadores: Walter dos Santos Soares Filho (Embrapa) e Márcio Gilberto Cardoso Costa (UESC).

The citrus plant germplasm is indispensable for the generation of new cultivars, having a fundamental role in genetic improvement programs. The main form of conservation of citrus is in germplasm banks in the field, however this method has some disadvantages, which can cause irreparable loss of access. In this sense, the *in vitro* conservation technique can provide greater safety for plant germplasm. Thus, the objective of this study was to establish conditions for *in vitro* conservation of citrus rootstock with the study of genetic viability and stability. For that, experiments were installed evaluating the compositions of MS, RMAN and WPM and the addition of paclobutrazol (0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 mg L⁻¹) to the medium culture, in addition to the genotype-level response. Nuclear plants of 10 genotypes, confirmed by SSRs markers (Simple Sequence Repeats) were conserved in basal WPM medium, according to pre-established conditions and after 12 months, viability was tested by means of three subcultures. To verify the stability of plants maintained *in vitro*, their molecular characterization was performed, using 21 microsatellite markers after 12 months of *in vitro* conservation and a third subculture. The RMAN formulation provided a higher percentage of germination of citrus rootstocks than that obtained in the MS medium and did not differ from that observed for WPM. The WPM medium is the most suitable for the conservation of rootstocks *in vitro* when compared to MS and RMAN media, for maintaining the viability and a complete development of the plant throughout the subcultures. The use of paclobutrazol did not show efficiency in maintaining reduced growth in the studied citrus genotypes, being the basal WPM medium the most suitable for *in vitro* conservation. Acclimatized plants from *in vitro* conservation have 100% survival. The SSRs markers were efficient in the characterization of the studied rootstocks, revealing hybrid individuals only the HTR - 051 genotype (20%). In general, the *in vitro* conservation conditions studied did not affect the viability of the plants. The three cycles of subcultures performed after conservation did not result in somaclonal variants. The conservation protocol described in this study can be used for *in vitro* conservation of the analyzed rootstocks.

Keywords: *Citrus*, tissue culture, genetic improvement, SSR markers

INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca no ramo da produção mundial de citros, sendo o Brasil o segundo maior produtor. Em 2018, a produção global de frutos cítricos foi de 138,6 milhões de toneladas, tendo o Brasil participado com 13,9% dessa produção (FAO, 2019).

Apesar da sua posição de destaque os problemas fitossanitários e as barreiras impostas pela biologia reprodutiva dos citros são fatores que dificultam seu melhoramento pelo método convencional. A grande diversidade genética dos citros constitui uma base ao melhoramento genético da espécie, o que reflete em respostas à aquisição de resistência/tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos. Assim, o germoplasma vegetal da espécie é imprescindível na geração de novas cultivares (SOUZA et al., 2011).

Os principais bancos de germoplasma de citros existentes são mantidos em condições de campo (OLIVEIRA, 2006; ZHANG et al., 2014; VOLK et al., 2017). Dentre esses bancos, o da Embrapa Mandioca e Fruticultura localizado na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, conta com 750 acessos e tem fornecido valiosa contribuição ao programa de melhoramento institucional na geração de cultivares copas e porta-enxerto (SANTOS et al., 2015).

A diversidade existente em um germoplasma deve ser protegida contra eventuais perdas, de forma a garantir sua utilização para o aumento da produtividade. Contudo, a vulnerabilidade aos fatores bióticos e abióticos aos quais os bancos de citros estão expostos em condições de campo, traduzem a importância de métodos de conservação alternativos (EIRA, 2001; SOUZA et al., 2009).

Nesse aspecto, a cultura de tecidos pode auxiliar oferecendo como complementação a esse método a técnica de conservação *in vitro* de germoplasma. A conservação *in vitro* consiste em manter plantas sob condições de crescimento mínimo por longo período de tempo, entretanto, pode ocorrer à necessidade de subcultivos periódicos, o que torna essa técnica laboriosa e onerosa, sendo necessário adequar condições para retardar o crescimento das plantas e diminuir o número de repicagens (CANTO et al., 2004). Nesse sentido, a adição do paclobutrazol como retardante de crescimento, vem sendo utilizada em algumas

culturas *in vitro* (STERREFTT, 1985; CANTO et al., 2004; GIMENES et al., 2018), no entanto, em citros não há estudos que determinam a concentração do produto para uso com este fim.

Dentre os diversos fatores que estão relacionados com o sucesso do cultivo *in vitro*, o meio de cultura é um fator de grande relevância por influenciar no fornecimento de nutrientes em quantidades ideais ao desenvolvimento de cada espécie. Apesar de existirem estudos para os citros com o objetivo de micropropagar e conservar *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2010; TALLÓN et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; NAVARRO-GARCÍA, et al., 2016; GORSHKOV et al., 2019) não há uma concordância em relação ao meio para uso na cultura ou para grupos específicos dentro desta.

A viabilidade e posterior retomada do crescimento completo das plantas submetidas à conservação *in vitro* sob condições normais de cultivo são fatores imprescindíveis nesse processo, sobretudo se a conservação for baseada no crescimento mínimo ou reduzido (LEMOS et al., 2002), sem que haja ainda variações somaclonais, o que prejudicaria a estabilidade genética do material conservado.

Dessa forma, o estudo de composições nutricionais na conservação *in vitro*, bem como da definição da concentração de paclobutrazol na promoção de crescimento reduzido de porta-enxertos de citros, mantendo a qualidade genética e fitossanitária, são métodos que podem trazer ganhos a produção de citros, uma vez que esse grupo cítrico constitui a base da produção da cultura.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Origem e distribuição

Os citros possuem como ancestrais as espécies *Citrus maxima* (J. Burm.) Merr. (*C. grandis* Osb.), pomelo, *Citrus medica* L., cidra, *Citrus reticulata* Blanco, tangerineira e similar e *Citrus halimii* B. C. Stone, papedas, que deram origem a todas as espécies cultivadas (WU et al., 2018; AHMED, et al., 2019). São descritos inicialmente como originários do sudeste da Ásia, e as espécies ancestrais

originárias do Arquipélago da Malásia, Índia, China, Tailândia e Malásia, de onde os citros se espalharam para outras regiões durante a civilização (CALABRESE, 2002). As regiões do Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanmar são consideradas as localidades de cultivo dos citros mais antigas, de onde se dispersaram para as Filipinas e vários grupos de ilhas do Pacífico (SPURLING, 1969). Todavia, estudos recentes realizados por Wu et, al. (2018) constatam como centro de origem dos citros o sudeste do Himalaia, em uma região que inclui o Leste de Assam, norte de Mianmar e Yunnan ocidental.

Os diversos comércios e as guerras entre as nações contribuíram com a expansão dos citros pelos continentes. A introdução das frutas cítricas na Europa se deu no início do século 11 pelos árabes, durante as cruzadas. Na África do Sul, a dispersão ocorreu a partir de navegações entre Europa e Índia em 1654. Na Austrália, colonos ingleses contribuíram com as primeiras introduções em 1788. No continente americano, os citros foram introduzidos durante expedição de Cristóvão Colombo, ocorrida por volta dos anos de 1500 (WEBBER et al., 1967). No início da colonização do Brasil a cultura cítrica foi inserida no País, onde a laranja se alastrou por alcançar melhores condições para sua produção do que as encontradas nas próprias regiões de onde se originou (NEVES et al., 2010).

Com sua expansão, os citros passaram a ter ampla extensão geográfica e a serem cultivados em áreas tropicais e subtropicais, que são favoráveis à cultura, sendo que as principais áreas comerciais encontram-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20° N e 20° S (SOOST; ROOSE, 1996).

No Brasil, a produção de citros está distribuída por todas as regiões, com maior concentração na região Sudeste, principalmente no Estado de São Paulo, onde há grande concentração da laranja doce nos pomares, seguida das tangerinas e das limas ácidas (ALMEIDA; PASSOS, 2011).

Classificação

Os citros são plantas eudicotiledôneas pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae (CALABRESE, 2002). Essa família inclui desde gêneros mais primitivos como *Severinia* Ten. ex Endl., *Pleiospermium* [(Engl.) Swingle], *Burkillantus* (Swingle), *Limnocitrus* (Swingle) e

Hesperetusa (Roem.), a gêneros mais evoluídos como *Citropsis* [(Engl.) Swingle e M. Kell.] e *Atalantia* (Corrêa), além do grupo dos citros verdadeiros, que abrange *Poncirus* (Rafinesque), *Fortunella* (Swingle), *Microcitrus* (Swingle), *Eremocitrus* (Swingle), *Clymenia* (Swingle) e *Citrus* (Linnaeus), os quais produzem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (SWINGLE, 1943), sendo os *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* os gêneros de maior importância econômica mundial, com o *Citrus* mantendo maior relevância dentre esses (WEILER et al., 2010).

Há controvérsias quanto ao sistema de classificação do gênero *Citrus* e aqueles relacionados, as quais Nicolosi et al. (2000) atribuem principalmente à compatibilidade sexual entre esses gêneros, a alta frequência de mutações de gemas e a longa história de cultivo e ampla dispersão. De acordo com Passos et al. (2013), o sistema de classificação de Tanaka baseado no conceito biológico de espécies, desconsiderando as variações em híbridos, que foi concluído em 1977, e o sistema de Swingle, estabelecido em 1943, fundamentado em características morfológicas, são os que vêm sendo mais utilizados para o gênero *Citrus*. A categorização de Swingle (1943), divide o gênero *Citrus* em 16 espécies, sendo 10 delas pertencentes ao subgênero dos *Citrus* verdadeiro e 6 ao subgênero *Papeda*. Já na divisão proposta por Tanaka (1977), o gênero possui 162 espécies, agrupadas em *papeda*, *limonellus*, *citrophorum*, *cephalocitrus* e *aurantium*, pertencentes ao subgênero *Archicitrus*, e em *osmocitrus*, *acrumen* e *pseudofortunella*, do subgênero *Metacitrus*.

No entanto, estudos recentes baseados na divergência de sequências e na filogenia de todo o genoma sugerem uma nova reformulação do gênero *Citrus*, revelando que vários gêneros nomeados como *Fortunella*, *Eremocitrus* e *Microcitrus* estão de fato agrupados no clado cítrico, e o gênero *Poncirus*, proposto inicialmente como pertencente ao *Citrus*, constitui-se claramente um clado separado (WU et al., 2018).

Importância econômica

O relevante potencial econômico da cultura dos citros possui âmbito nacional e internacional, tendo grande importância na geração de renda. Somente na safra 2018 a produção mundial de citros foi de mais de 138 milhões de toneladas, tendo o

Brasil participado como o segundo maior produtor, com 19,3 milhões de toneladas, perdendo apenas para a China (FAO, 2019).

O Brasil possui ainda maiores destaques na produção de laranja, na qual ocupa posição como maior produtor, com mais de 24% do total produzido mundialmente e no processamento e exportação de suco concentrado da fruta, detendo 62% desse mercado. Dessa forma, o setor citrícola do País é responsável pela movimentação de bilhões de dólares todos os anos e pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos. (FAO, 2017).

Ainda que o Brasil ocupe posição de destaque na produção cítrica, especialmente de laranja, e disponha de condições favoráveis de clima e solo, a produtividade dos pomares brasileiros é reduzida em comparação aos Estados Unidos. Fatores como: deficiência hídrica, principalmente em regiões citrícolas no Nordeste brasileiro; susceptibilidade das cultivares utilizadas a inúmeras pragas e doenças que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar danos à produção e à qualidade das frutas; e o limitado número de cultivares copa e porta-enxerto; são responsáveis por essa baixa na produtividade (MACHADO et al., 2005; SUASSUNA et al.; 2012). Esses fatores limitantes à produção dos citros traduzem a importância da conservação dos recursos genéticos para aplicação no melhoramento da cultura, a fim de obter a diversificação de cultivares tolerantes a estresses hídricos e resistentes a pragas e doenças que acometem a cultura, para se alcançar ainda maiores ganhos na produção.

Melhoramento genético

Embora os citros apresentem grande diversidade genética, os plantios comerciais da cultura limitam-se a um pequeno número de cultivares, sendo importante a ampliação dessa base genética em busca da sustentabilidade da cadeia produtiva (OLIVEIRA et al., 2014). A base do melhoramento genético de qualquer espécie está na sua diversidade genética, o que traduz em respostas às melhores práticas agronômicas e resistência/tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos. Dessa forma, o germoplasma vegetal de citros indispensável para a geração de novas cultivares (SOUZA et al., 2011).

Os métodos convencionais de melhoramento de citros baseiam-se na seleção clonal, mediante a ocorrência de mutações somáticas espontâneas em gemas e ramos, induções de mutações e hibridação sexual (MOREIRA; PIO, 1991). No entanto, os problemas fitossanitários e as barreiras impostas pela biologia reprodutiva dos citros como a poliembrião e o longo período juvenil são fatores que dificultam seu melhoramento pelo método convencional.

Nesse sentido, a utilização de técnicas biotecnológicas tem contribuído com os grandes avanços e ganhos obtidos por meio do melhoramento genético convencional, na melhoria e geração de cultivares cítricas. As técnicas de cultura de tecidos atuam como grandes ferramentas nesses programas, promovendo, além da limpeza clonal, a obtenção de híbridos somáticos por fusão de protoplastos (CALIXTO et al., 2004; SORIANO et al., 2012) e de plantas transgênicas (MENDES et al., 2009; CARDOSO et al., 2010).

Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Programa de Melhoramento genético

A Embrapa Mandioca e Fruticultura mantém um banco ativo de germoplasma de citros em campo (ex situ) que dá suporte aos programas de melhoramento genético. A criação do BAG teve início nos anos 50, com a introdução de cultivares copas e porta-enxertos, notadamente da Estação Experimental de Limeira - EEL, pertencente ao Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo - CCSM, e posteriormente do IPEACS - instituto congênere da Região Centro-Sul, do Estado da Califórnia, EUA, além de coletas locais, e de várias partes do mundo. Em 2015, o BAG Citros possuía mais de 750 acessos e reúne espécies que incluem *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, que correspondem em maior número as laranjeiras, os híbridos, as tangerineiras, as limeiras, os pomeleiros, os limoeiros e os trifoliatas, dentre outros grupos (PASSOS et al., 2007; SANTOS et al., 2015).

Com objetivos de selecionar genótipos tolerantes à seca e ao alumínio, resistentes à gomose de *Phytophthora* spp., ao complexo do Vírus da Tristeza dos

Citros e adaptados a altas densidades populacionais, o programa de melhoramento genético da Embrapa teve início em 1988 com os trabalhos de hibridação por meio de polinização controlada e fusão de protoplasto, tendo como base seu Banco Ativo de Germoplasma em campo (SOARES FILHO et al., 2003). Nesse intuito diversas ações de pesquisas foram desenvolvidas, dentre as quais: a) hibridações abrangendo variedades com potencial agrônomo e/ou adaptadas a condições de estresse bióticos e abióticos; b) análises morfológicas e moleculares para identificação precoce de seedlings zigóticos; c) cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de variedades utilizadas como parentais femininos em hibridações controladas; d) identificação de parentais com elevado valor comercial a serem utilizados na hibridação; e) estudos de métodos de seleção precoce de híbridos promissores; f) determinação de metodologias aplicadas a indução precoce de florescimento; g) fusão de protoplastos para obtenção de híbridos somáticos (PASSOS et al, 2007).

O banco tem tido papel fundamental dentro do programa de melhoramento genético institucional auxiliando na identificação de variedades potenciais, nele introduzidas, na criação de novas cultivares copas e porta-enxertos, além de constituir-se como fonte de introdução de variedades promissoras, em diversas regiões do país, contribuindo, assim, para a diversificação do pomar citrícola nacional (PASSOS et al., 2007). Além de variedades copas, esse programa tem estudado diversos porta-enxertos, ganhando destaque entre eles, a tangerineira 'Sunki Tropical' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], os citrandarins 'San Diego', 'Índio' e 'Riverside', e os híbridos recentemente registrado BRS Bravo, BRS Donadio, BRS Cunha Sobrinho, BRS Pompeu, BRS L Navarro, BRS P Ollitrault, BRS Bandeirante, BRS O S Passos, BRS Victoria, BRS Ody R, BRS S Moreira, BRS Matta e BRS J Furr, resultantes de cruzamentos envolvendo os limoeiros 'Cravo' (LCR) (*C. limonia* Osbeck) e 'Rugoso' da Flórida (LRF) (*C. jambhiri* Lush.), *Poncirus trifoliata* (TR) (L.) Raf., citrumelo 'Swingle' (CTSW) (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) e tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) (*C. sunki*). Esses genótipos apresentam diversas características que os tornam potenciais porta-enxertos, como alta eficiência de produção de frutos com boa qualidade, alta tolerância a seca, produção precoce, resistência a doenças, sobressaindo-se em relação à porta-enxertos tradicionais como o limoeiro 'Cravo' (RAMOS et al., 2012); teores elevados de sólidos solúveis totais, redução no tamanho da muda, alto vigor e uniformidade

(OLIVEIRA et al., 2014), além de elevadas taxas de germinação, poliembrionia e volume de raiz, características de grande importância para a produção de porta-enxertos nucelares (RODRIGUES et al., 2015).

A Embrapa tem ainda disponibilizado aos citricultores diversas variedades de laranja e porta-enxertos objetivando a diversificação da citricultura. Essas variedades têm sido introduzidas em áreas comerciais, principalmente de pequenos citricultores, por meio da constituição de lotes básicos, implantados em diversos estados, dentre os quais o Maranhão, o Piauí, o Ceará, a Paraíba, o Pernambuco, o Alagoas, o Sergipe e a Bahia (PASSOS, 2012).

Conservação de germoplasma de citros

O interesse pela conservação de germoplasma vegetal surgiu como medida de prevenção do processo de erosão genética, que consiste na perda de genes ou de combinações genicas de plantas que possuem valor atual ou potencial para a agricultura. Nessa ocasião, foram propostas duas estratégias básicas de conservação de germoplasma, a conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural, em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. A conservação *ex situ* é a preservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, mediante coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes ou de coleções de plantas em bancos *in vitro* (SOUZA et al, 2009; IBPGR, 1993).

Inúmeras culturas de interesse comercial utilizam o método de conservação *ex situ*. Em citros a manutenção dos recursos genéticos ocorre geralmente na forma de bancos de germoplasma a campo, por instituições de pesquisa ou em jardins botânicos (DURAN-VILLA et al., 2005). O Brasil possui, na Embrapa Mandioca e Fruticultura e no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, dois dos principais bancos ativos de germoplasma de citros existentes no mundo (OLIVEIRA, 2006).

No entanto, a manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagem a sua vulnerabilidade a uma série de fatores, tais como a erosão genética devido a não adaptação das espécies às novas condições ambientais, à contínua exposição ao ataque de pragas, doenças e predadores eventuais, intempéries climáticas, problemas edáficos e vandalismo (MROGINSKI et

al., 1991, BRISON et al., 1995; EIRA, 2001). Aliado a tudo isso, 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 subseqüentes replantios, bem como nas capinas, podas, fertilização e tratamentos contra pragas e doenças (SOUZA et al., 2009).

Todos estes aspectos tornam importante a prioridade de desenvolver 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, a exemplo da preservação *in vitro* e a criopreservação.

Conservação *in vitro* de citros

A conservação *in vitro* baseia-se em manter por período prolongado de tempo, um crescimento reduzido de plantas micropropagadas a partir da diminuição da temperatura, radiação fotossintética ativa e fotoperíodo, além do uso de retardantes osmóticos e hormonais (CANTO et al., 2004).

Essa técnica vem sendo utilizada com êxito em muitas espécies de importância econômica, como café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.], mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), batata (*Solanum* spp.), batata-doce (*Ipomea batatas* L.) e videira (*Vitis* spp.) (BAJAJ, 1995; HASSAN, 2004; SOUZA et al., 2004, 2006b). Em citros, alguns trabalhos com conservação indicam temperatura, luminosidade (CARVALHO et al., 2016) e concentração do meio de cultura para a conservação do seu germoplasma (SAMARINA et al., 2014), porém, não há o estabelecimento de um protocolo completo para a preservação *in vitro* das espécies cítricas.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, já iniciou os trabalhos de conservação *in vitro* de germoplasma, com uma coleção inicialmente estabelecida sob condições controladas de luminosidade ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (22 °C) de acordo com trabalho desenvolvido por Carvalho et al. (2016) e que conta com mais de 400 acessos do gênero citros e afins. Contudo, a manutenção dos acessos já demanda grande mão de obra pela necessidade de subcultivos recorrentes, evidenciando a importância de definir um protocolo para um crescimento reduzido.

Altas taxas de multiplicação, produção de matrizes livres de patógenos, redução da erosão genética, da demanda por espaço e dos custos com mão de obra, e simplificação do intercâmbio internacional de germoplasma, são algumas das vantagens de um banco de germoplasma *in vitro* (ENGELMANN, 1991; STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995), além de ser considerada como uma duplicata de segurança, uma das premissas básicas para a conservação de germoplasma vegetal.

Entretanto, existem desvantagens relacionadas à técnica, principalmente a necessidade de subcultivos periódicos. Dessa forma, as condições de cultivo normalmente estabelecidas para a conservação *in vitro* visam à redução do metabolismo celular, influenciando nas taxas de crescimento das plantas, que tem por objetivo aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão de obra, os custos e os riscos de variação somaclonal, decorrentes da excessiva manipulação do tecido vegetal (SANTOS, 2008), que também fica exposto a eventuais contaminações fúngicas e/ou bacterianas.

O paclobutrazol (PBZ), é um retardante de crescimento que interfere na síntese do ácido giberélico, o qual atua no alongamento celular, e, portanto, no crescimento da planta, inibindo o desenvolvimento em algumas espécies. Ele vem sendo utilizado em estudos há mais de 30 anos como uma substância alternativa aos convencionais fitoreguladores para redução do porte em lenhosas, abacaxi e orquídeas conservadas *in vitro* (STERREFTT, 1985; CANTO et al., 2004; GIMENES et al., 2018). Trata-se de um composto cíclico que contém um nitrogênio em sua composição e, além do seu efeito na inibição da giberelina, o PBZ atua também no aumento das concentrações de ácido abicísico e de citocinina, sendo relatados efeitos no incremento da produção e qualidade de frutos e da atividade radicular (KISHORE et al., 2015), todavia, seu uso bastante comum em muitas espécies vegetais se dá com o objetivo principal de induzir a floração e de promover um crescimento reduzido *in vitro*, efeito esse resultante de sua atuação sobre a enzima P450 mono-oxigenases, inibindo a formação do GA12-aldeído, precursor da giberelina (BISHT et al., 2018).

Além de redutores de crescimento, a composição nutritiva também deve ser considerada na conservação *in vitro*, no sentido de manter o vigor e a capacidade regenerativa na retomada de crescimento da planta, após conservação. Estudos têm

sido desenvolvidos com a finalidade de desenvolver um protocolo para micropropagação de citros, estudando-se os meios de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MT (MURASHIGE e TUCKER, 1969), WPM (LLOYDE McCOWN, 1980) e DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984) e que divergem entre si quanto a determinação de uma composição nutritiva no processo de propagação da espécie, sendo o meio MS o mais apontado nas pesquisas (OLIVEIRA et al., 2010; NAVARRO-GARCÍA, et al., 2016), enquanto poucos estudos indicam a utilização do meio DKW ou do WPM (TALLÓN et al., 2013), apesar deste, assim como o RMAN, serem formulados especialmente para espécies arbóreas (LLOYDE McCOWN, 1980; GROSSER e GMITTER JUNIOR, 1990).

Para conservação *in vitro* de citros não há um meio de cultura estabelecido, sendo utilizados diferentes meios, como o WPM (CARVALHO et al., 2016) e o MS (GORSHKOV et al., 2019). A definição do meio de cultura a ser utilizado é de grande importância na determinação do protocolo de conservação da espécie, de forma a abranger o maior número de genótipos possíveis ou pelo menos de grupos específicos. Nesse sentido, a manutenção do vigor e do crescimento completo da planta são fatores a serem analisados também ao longo dos subcultivos, no qual é possível avaliar a capacidade morfogenética provida por cada composição nutricional. Esses fatores, embora inerentes à propagação *in vitro*, não são avaliados em estudos que objetivam a determinação do meio para micropropagação em citros.

Geralmente os explantes mais indicados para a conservação *in vitro* são os de origens meristemáticas, já que suas células são mais resistentes às baixas temperaturas e esses tecidos também apresentam maior estabilidade genética e qualidade fitossanitária (AMARAL et al., 2007). Por outro lado, a conservação *in vitro* a partir de explantes obtidos de sementes de citros cultivadas *in vitro* permite que a variabilidade genética da espécie seja representada, além de manter a identidade genética no caso de sementes poliembriônicas.

O ápice meristemático de plantas jovens permite a limpeza de doenças e patógenos sistêmicos. No entanto, a técnica não é empregada satisfatoriamente para a maioria das 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.

Outro aspecto que deve ser considerado na conservação *in vitro* é a viabilidade, com a posterior micropropagação das plantas conservadas, principalmente se a condição de conservação se baseia no estabelecimento de taxas de crescimento mínimo ou reduzido. A retomada do crescimento das microplantas após o período de conservação sob crescimento lento deve ser restabelecida nas condições normais de cultivo (LEMOS et al., 2002), sem que haja a ocorrência de variações somaclonais.

Identificação de indivíduos zigóticos e nucelares

A poliembrionia é um atributo comum a muitas espécies cítricas e caracteriza-se pela presença de mais de um embrião em uma única semente. A maioria desses embriões são de origem nucelar, formados a partir de células do nucelo (apogâmicos), sendo o embrião zigótico, geralmente único. No melhoramento genético de citros quando se almeja a obtenção de híbridos em cruzamentos utilizando parentais femininos poliembriônicos, principalmente quando se trata de uma elevada porcentagem de poliembrionia (>70%) se faz necessário a excisão e o cultivo *in vitro* dos embriões das sementes obtidas dos cruzamentos realizados, para garantir a germinação e o desenvolvimento das plântulas, separando, os indivíduos híbridos dos nucelares (SOARES FILHO et al., 2002).

Porém, quando se deseja a manutenção da identidade genética, ou seja, a propagação ou conservação de clones, a poliembrionia pode constituir-se uma característica favorável. Os embriões nucelares apresentam maior competência de desenvolvimento do que os zigóticos, em função da competição entre os vários embriões nucelares presentes na semente ou ainda pela superação e germinação em relação ao embrião zigótico, o qual normalmente é de baixo vigor (RAMOS et al., 2006). Assim, Passos et al. (2006) afirmam que a existência de uma elevada taxa de poliembrionia nas sementes confere maior propensão ao porta-enxerto de gerar plântulas nucelares, ou seja, idênticas a planta mãe, trazendo como vantagem a garantia da fidelidade genética e a homogeneidade nos pomares, sendo, portanto,

essa característica de grande relevância na seleção de porta-enxertos, uma vez que esses são propagados via sementes.

Entretanto, pode haver ainda a ocorrência de embriões zigóticos. Segundo Sharma et al. (2009), na propagação de porta-enxertos via sementes, ocorre a germinação de 1% a 40% de plântulas zigóticas. Esse fato pode comprometer a manutenção da fidelidade genética das plantas conservadas, o que não é de interesse quando se objetiva manter clones *in vitro*. Dessa forma, a seleção prévia de plântulas germinadas com base nas características fenotípicas da planta mãe, como aspectos inerentes a folha e ao pecíolo pode favorecer a conservação de plantas nucelares.

A confirmação de indivíduos nucelares pode ser feita através da caracterização molecular, fundamental tanto para determinar a conformidade quanto evitar duplicações dos genótipos. Vários marcadores moleculares estão disponíveis para a caracterização molecular. De acordo com Barkley et al. (2006), Simple Sequence Repeats (SSR), um tipo de microssatélite, são particularmente úteis para a caracterização de coleções de germoplasma, por serem altamente polimórficos e codominante. Esses marcadores moleculares apresentam vantagens por permitir a análise de marcas polimórficas, em um curto espaço de tempo, de um número ilimitado de genótipos, sem a influência do ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Trabalhos realizados em citros evidenciam a eficiência desses marcadores na identificação de indivíduos nucelares e zigóticos, com diferentes objetivos, dentre os quais, a seleção de novas variedades a partir de cruzamentos (YILDIZ et al., 2013) e a detecção de variações entre acessos de um genótipo (SHARAFI et al., 2016).

HIPÓTESE

A biotecnologia pode oferecer, como complemento ou opção à conservação tradicional, a conservação do germoplasma de citros *in vitro*, garantindo a segurança deste recurso genético e mantendo a viabilidade das plantas conservadas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estabelecer condições para conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros, mantendo a viabilidade e estabilidade genética dos acessos.

Objetivos Específicos

- Definir dentre composições nutricionais de uso comum (MS) e as desenvolvidas para espécies arbóreas (RMAN e WPM), a formulação do meio de cultura ideal para estabelecimento e conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros.
- Avaliar o efeito do paclobutrazol sobre a morfogênese de porta-enxertos de citros, visando determinar uma concentração adequada desse inibidor de crescimento na conservação *in vitro*.
- Conservar *in vitro* a longo prazo plantas nucelares de porta-enxertos de citros, mantendo a viabilidade e a constituição genética dos acessos ao longo dos subcultivos.

REFERÊNCIAS

AHMED, D.; COMTE, A.; CURK, F.; COSTANTINO, G.; LURO, F.; DEREPPER, A.; MOURNET, P.; FROELICHER, Y.; OLLITRAULT, P. Genotyping by sequencing can reveal the complex mosaic genomes in gene pools resulting from reticulate evolution: a case study in diploid and polyploid citrus. **Annals of Botany**, v. 123, p. 1231-1251, 2019.

ALMEIDA, C. O.; PASSOS, A. O. **Citricultura brasileira**: em busca de novos rumos desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 160 p.

AMARAL, L.; VEIGA, R. F. A.; TOMBOLATO, A. C. F.; BARBOSA, W.; CONAGIN, A. Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de amarílis

(*Hippeastrum Herb.*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 113-120, 2007.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. v. 32. Cryopreservation of plant germplasm I. New York: Springer Verlag, 1995. p. 3-28.

BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1519-1531, 2006.

BISHT, T. S.; RAWAT, L.; CHAKRABORTY, B.; YADAV, V. A recent advances in use of plant growth regulators (PGRs) in fruit crops - A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 5, p. 1307-1336, 2018.

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

CALIXTO, M. C.; MOURAO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J.; VIEIRA, M. L. C. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 7, p. 721-724, 2004.

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**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARDOSO, S. C.; MENDES, J. M. B.; CAMARGO, R. L. B.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M. L. C.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin A

gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 185-192, 2010.

CARVALHO, M. de J. da S. de; SOUZA, A. da S.; SANTOS, E. B.; SOARES FILHO, W. dos S.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, F. V. D. Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 129-137, 2016.

CALABRESE F. Origin and history. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A. (Ed.). **Citrus: the genus *Citrus*** (medicinal and aromatic plants - industrial profiles). London and New York, v. 26, p. 1-15, 2002.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-550, 1984.

DURAN-VILA, N.; ORTEGA, C.; OLIVARES-FUSTER, O.; NAVARRO, L. Crioconservación de germoplasma de cítricos. **Phytoma**, 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.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2020.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GIMENES, R.; PIVETTA, K. F. L.; MAZZINI-GUEDES, R. B.; FERRAZ, M. V.; PEREIRA, S. T. S.; SANTOS, A. S.; FARIA, R. T. de; ALMEIDA, L. C. P. de. Paclobutrazol on *in vitro* growth and development of *Zygopetalum crinitum* orchid, and on seedling acclimatization. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 1029-1036, 2018.

GORSHKOV, V. M.; SAMARINA, L. S.; KULYAN, R. V.; MALYAROVSKAYA, V. I.; RYNDIN, A. V.; RAKHMANGULOV, R. S.; ORLOV, Y. L. Challenges of *in vitro* conservation of *Citrus* germplasm resources. **Vavilov Journal of Genetics and Breeding**. v. 23, n. 1, p. 24-28, 2019.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, v. 8, p. 339-374, 1990.

HASSAN, N. S. Storage of *in vitro* banana shoot cultures at low temperature or under mineral oil layer. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 2, p. 303-306, 2004.

IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). **Geneflow**: a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, 1993. 19 p.

KISHORE, K.; SINGH, H. S.; KURIAN, R. M. Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 85, n. 7, p. 863-72, 2015)

LEMOS, E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416-417, 1980.

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

MENDES, J. M. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S. B.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 109-115, 2009.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M.; KARTHA, K. K. Crioconservación del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 715-730.

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

MURASHIGE, T; TUCKER, D. R. H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1969, Riverside. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. p. 1155-1169.

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

NAVARRO-GARCÍA, N.; MORTE, A.; PÉREZ-TORNERO, O. *In vitro* adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of Citrus limon. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. n. 52, p. 161-173, 2016.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 137 p.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

OLIVEIRA, R. P. **Biotecnologia em citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 36 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160).

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V.; OTONI, W. C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OLIVEIRA, R. P. de; SOARES FILHO, W. dos S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. da S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

PASSOS, O. S. 50 anos de P&D em citros no Nordeste Brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.

PASSOS, O. S.; PEIXOUTO, L. S.; SANTOS, L. C.; CALDAS, R. C.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 410-413, 2006.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Origem, classificação botânica e distribuição geográfica. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. v. 1, p. 15-23.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; SOUZA, A. S.; SANTOS, L. C.; 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, 2007. 61p. (Documentos 163).

RAMOS, J. D.; ARAÚJO NETO, S. E.; CASTRO, N. E. A.; MARTINS, P. C. C.; CORREIA, M. G. Poliembrionia e caracterização de frutos de citrumelo swingle e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 88-91, 2006.

RAMOS, Y. C.; STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; LEÃO, H. C.; GESTEIRA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. Dwarfing rootstocks for 'Valencia' sweet orange In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 12, 2012, Valencia. **Book of Abstracts**... Valencia: International Society of Citriculture, 2012. p. 324 - 325.

RODRIGUES, M. J. S.; LEDO, C. A. da S.; GIRARDI, E. A.; ALMEIDA, L. A. H.; SOARES FILHO, W. dos S. Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 457- 470, 2015.

SAMARINA, L. S.; CHOUDHARY, R.; KOLOMIETS, T. M.; ABILFAZOVA, Y. S.; SARAN, P. L. *In vitro* conservation technique for Russian *Citrus limon*. **Agricultural Research**, v. 3, n. 4, p. 279-283, 2014.

SANTOS, A. R. A. dos; SOUZA, E. H. de; SOUZA, F. V. D.; FADINI, M.; GIRARDI, E. A.; SOARES FILHO, W. dos S. Genetic variation of *Citrus* and related genera with ornamental potential. **Euphytica**, v. 205, p. 503-520, 2015.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. 2008. 57 f. Dissertacao (Mestrado em Ciencias Agrarias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - BA.

SHARAFI, A. A.; ABKENAR, A. A.; SHARAFI, A.; MASAELI, M. Genetic variation assessment of acid lime accessions collected from south of Iran using SSR and ISSR molecular markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 1 p. 87-95, 2016.

SHARMA, S.; PRAKASH, A.; TELE, A. *In vitro* propagation of citrus rootstocks. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca**, v. 37, n. 1, p. 84-88, 2009.

SOARES FILHO, W. dos S.; MEDRADO, A. C. de M.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Freqüência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes versus cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; 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. 32 p. (Embrapa-CNPMF. Documentos, 106).

SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New york: John Wiley, 1996. v. 1, p. 257-323.

SORIANO, L.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; LATADO, R. R.; PACHECO, C. A.; AZEVEDO, F. A. de; MENDES, B. M. J. Regeneration and characterization of somatic hybrids combining sweet orange and mandarin/mandarin hybrid cultivars for citrus scion improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 385-392, 2012.

SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES-FILHO, V. dos S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S. do; CARVALHO, M. J. S.; SANTOS, E. B. **Estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**.

Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 103).

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.; CABRAL, J. R. S. *In vitro* conservation of pineapple germplasm at Embrapa Cassava and Fruits. **Pineapple News**, n. 11, p. 21-22, 2004.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Minimum growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 702, p. 41-47, 2006.

SPURLING, M. B. Citrus in the Pacific area. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 93-101.

STERREFTT, J. P. Paclobutrazol: a promising growth inhibitor for injection into woody plantas. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p. 4-8, 1985.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Berlin: Heidelberg, 1995. p. 87-101.

SUASSUNA, J. F.; FERNANDES, P. D.; NASCIMENTO, R. do; OLIVEIRA, A. C. M. de; BRITO, K. S. A. de; MELO, A. S. de. Produção de fitomassa em genótipos de

citros submetidos a estresse hídrico na formação do porta-enxerto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 12, p. 1305–1313, 2012.

SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and their wild relatives as a guide to their use in breeding. **Florida State Horticultural Society**, v. 1, p. 156-164, 1943.

TALLÓN, C. I.; PORRAS, I.; PÉREZ-TORNERO, O. High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. **InVitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. v. 49, p. 145-155, 2013.

TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Study in Citrologia**, v. 14, p. 1-6, 1977.

VOLK, G. M.; BONNART, R.; SHEPHERD, A.; YIN, Z.; LEE, R.; POLEK, M.; KRUEGER, R. Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 128, p. 327-334, 2017.

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

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; SCHWARZ, S. F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1523-1529, 2010.

WU, G. A.; TEROL, J.; IBANEZ, V.; LÓPEZ-GARCÍA, A.; PÉREZ-ROMÁN, E.; BORREDÁ, C.; DOMINGO, C.; TADEO, F. R.; CARBONELL-CABALLERO, J.; ALONSO, R.; CURK, F.; DU, D.; OLLITRAULT, P.; ROOSE, M. L.; DOPAZO, J.; GMITTER JÚNIOR, F. G.; ROKHSAR, D. S.; TALON, M. Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature**, v. 554, p. 311-316, 2018.

YILDIZ, E.; KAPLANKIRAN, M.; DEMİRKEŞER, T. H.; UZUN, A.; TOPLU, C. Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several *Citrus* crosses using SSRs markers. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic**, v. 41, n. 2, p. 478-484, 2013.

ZHANG, J.; XIN, X.; YIN, G.; LU, X.; CHENA, X. *In vitro* conservation and cryopreservation in national genebank of China. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p. 309-318, 2014.

CAPÍTULO 1

Meio de cultura no estabelecimento e conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros**

Maria Inês de Souza Mendes^{1*}, Denise dos Santos Vila Verde², Camila Rodrigues Pinto², Leila Costa Vasconcelos Nobre², Abelmon da Silva Gesteira³, Walter dos Santos Soares Filho³, Antônio da Silva Souza³

Resumo

A cultura de tecidos pode constituir uma eficiente ferramenta na conservação de porta-enxertos de citros. Diversos meios nutritivos têm sido utilizados para regeneração *in vitro* da cultura. Nesse sentido, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de definir dentre composições de uso comum (MS) e as desenvolvidas para espécies arbóreas (RMAN e WPM), a formulação ideal para estabelecimento e conservação *in vitro* de diferentes porta-enxertos de citros. Plântulas de 10 porta-enxertos de citros obtidas nos meios básicos MS, RMAN e WPM foram micropropagadas e conservadas *in vitro* por três subcultivos com intervalo de seis meses entre eles. Os dados coletados foram submetidos a análises estatísticas pelo software R. As formulações RMAN e WPM proporcionaram maior porcentagem de germinação de sementes dos porta-enxertos (62,92% e 60,91%, respectivamente), porém a análise da resposta morfogênica ao longo dos subcultivos revelou que a composição do RMAN resultou em perda de 65% da capacidade regenerativa dos explantes no segundo subcultivo, inviabilizando seu uso na conservação *in vitro* de germoplasma. Assim como aconteceu no meio RMAN, foi observado redução no desenvolvimento das plantas cultivadas no MS a cada novo subcultivo. O WPM, por sua vez, manteve ou superou a capacidade regenerativa das plantas ao longo dos subcultivos. Dentre os meios estudados, a formulação WPM foi a mais eficiente para a conservação *in vitro*, enquanto o uso do RMAN limitou-se à germinação *in vitro* de sementes dos porta-enxertos estudados.

Palavras-Chave: *Citrus*, cultura de tecidos, meio nutritivo, subcultivo.

**Artigo submetido ao periódico *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*

* Maria Inês de Souza Mendes; inessm.123@gmail.com; Tel.: +55-75-98128-9348

1 Campus Soane Nazaré de Andrade, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil

2 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil

3 Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil

Abstract

Tissue culture can be an efficient tool in the conservation of citrus rootstocks. Several nutritional media have been used for *in vitro* regeneration of the culture. In this sense, this study was developed with the objective of defining, among compositions of common use (MS) and those developed for tree species (RMAN and WPM), the ideal formulation for the establishment and *in vitro* conservation of different citrus rootstocks. Seedlings of 10 citrus rootstocks obtained from the basic MS, RMAN and WPM were micropropagated and preserved *in vitro* by three subcultures with an interval of six months between them. The collected data were submitted to statistical analysis by software R. The RMAN and WPM formulations provide a higher percentage of germination of rootstock seeds (62.92% and 60.91%, respectively), however the analysis of the morphogenetic response along of the subcultures revealed that the composition of RMAN resulted in a loss of 65% of the regenerative capacity of the explants in the second subculture, preventing its use in the *in vitro* conservation of germplasm. As in the RMAN environment, a reduction in the development of plants grown in MS was observed with each new subculture. The WPM, in turn, maintained or exceeded the regenerative capacity of the plants throughout the subcultures. Among the studied media, the WPM formulation was the most efficient for *in vitro* conservation, while the use of RMAN was limited to the *in vitro* germination of seeds of the studied rootstocks.

Keywords: *Citrus*; tissue culture; nutritive medium; subculture.

1. Introdução

A grande diversidade genética apresentada pelos citros fornece uma valiosa base para os programas de melhoramento genético, que a partir da disponibilização de cultivares copas e porta-enxertos melhoradas, têm dado grande suporte à produção de frutos e suco concentrado. Para a exploração a longo prazo desses recursos genéticos, eles precisam se manter conservados e, para isso, existem vários bancos ativos de germoplasma (BAG) de citros no mundo, que contam com milhares de acessos em campo. Dentre esses BAGs, cita-se o da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Santos et al., 2015); o do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (Oliveira, 2006); o do Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (Zhang et al., 2014); e o dos United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), National Plant Germplasm System (NPGS) (Volk et al., 2017).

Entretanto, esse tipo de conservação pode tornar os recursos vulneráveis a fatores como os desastres naturais, pragas e doenças (Engelmann, 1991), além de

adversidades climáticas e vandalismo, que podem levar à erosão genética das espécies. Nesse sentido, a conservação *in vitro* surge como uma alternativa complementar à manutenção do germoplasma em campo, garantido sua segurança quanto aos fatores ambientais.

Na conservação *in vitro*, podemos destacar dois pontos importantes, sendo um deles o requerimento de um crescimento mínimo para que a planta possa ser mantida por um período longo, sem a necessidade de um grande número de subcultivos, que acarretaria em maiores gastos com reagentes e mão-de-obra (Engelmann, 1991). O outro ponto refere-se a manutenção do vigor e de um crescimento balanceado de parte aérea e raiz ao longo dos subcultivos que se façam necessários, o que resultará em um maior espaçamento entre os subcultivos por indicar estabilidade hormonal e nutricional da planta. Esse vigor também influenciará no processo de micropropagação, possibilitando uma eficiente regeneração *in vitro* e *in vivo*, em posterior procedimento de aclimatização de mudas.

Para um crescimento e desenvolvimento ideal, a planta requer nutrientes minerais em concentrações ótimas (Zeng et al., 2014). No cultivo *in vitro*, o meio de cultura é um dos fatores de grande relevância na germinação e manutenção das plantas, uma vez que irá fornecer os componentes nutricionais necessários para a morfogênese. Várias formulações têm sido utilizadas na regeneração *in vitro* dos citros, e alguns estudos com a cultura (Oliveira et al., 2010; Navarro-García, et al., 2016) destacam o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) em relação a outros meios como o MT (Murashige e Tucker, 1969), o WPM (Lloyd e McCown, 1980) e o DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), apesar das formulações do WPM e do RMAN (Grosser e Gmitter Junior, 1990) serem específicas para o desenvolvimento de espécies cítricas.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar, dentre os meios de cultura MS, RMAN e WPM, a formulação eficaz na manutenção da capacidade regenerativa e do vigor durante o processo de estabelecimento e conservação *in vitro* de plantas de diferentes porta-enxertos de citros.

2. Material e métodos

2.1 Experimento I: Meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de citros

Frutos maduros dos porta-enxertos tangerineira 'Sunki Tropical' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka]; citrandarins 'San Diego', 'Índio' e 'Riverside' e os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia, resultantes de cruzamentos envolvendo os limoeiros 'Cravo' (LCR) e 'Rugoso' da Flórida (LRF) (*C. limonia*), o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (TR), o citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) (CTSW) e a tangerineira 'Sunki' comum (TSKC), introduzidos e produzidos pelo Programa de Melhoramento Genético (PGM) de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG), em campo, na referida instituição, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Os frutos foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos, onde as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente e desprovidas da testa.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 5 minutos, seguindo-se de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, com duas gotas do detergente Tweem 20[®], durante 20 minutos. Em seguida, as sementes foram enxaguadas por três vezes, com água de osmose reversa, e colocadas em frascos, contendo 30 mL dos meios de cultura básicos MS, RMAN e WPM (Tabela 1), gelificados com 2 g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação das sementes, os frascos foram mantidos em sala de crescimento durante 60 dias, sob temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹. As plântulas obtidas foram micropropagadas por três subcultivos com intervalos de 6 meses.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), RMAN (Grosser e Gmitter Junior, 1990) e WPM (Lloyd e McCown, 1980), utilizados na germinação e regeneração *in vitro* de porta-enxertos de citros.

Componentes (mg L ⁻¹)	Meios de cultura		
	MS	RMAN	WPM
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	1.650,0	825,0	400,0
KNO ₃	1.900,0	950,0	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556,0

CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	440,0	96,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	185,0	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0	75,0	170,0
K ₂ HPO ₄	-	10,0	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
K ₂ SO ₄	-	-	990,0
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3	37,3
Micronutrientes			
KI	0,830	0,415	-
H ₃ BO ₃	6,200	3,100	6,200
MnSO ₄ .H ₂ O	16,800	8,400	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	4,300	8,600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,125	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,013	0,250
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,013	-
Vitamina + Hexitol			
Tiamina-HCl	0,1	5,0	1,0
Piridoxina-HCl	0,5	5,0	0,5
Ácido nicotínico	0,5	2,5	0,5
Inositol	100,0	50,0	100,0
Outros suplementos			
Glicina	2	1	2
Carvão ativado	-	500	-
Sacarose	30.000	25.000	30.000
Phytigel®	2.000	2.000	2.000

As avaliações foram realizadas observando-se as seguintes variáveis: porcentagem de germinação, altura de parte aérea (cm), número de folhas verdes, número de miniestacas com 1 cm de comprimento, contendo ao menos uma gema, e número de plântulas.

2.2 Experimento II: Meios de cultura na conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros

Miniestacas com 1 cm de tamanho, oriundas de plântulas germinadas *in vitro*, selecionando-se os indivíduos nucelares, com base no vigor das plantas e nas características fenotípicas (tipo, tamanho e coloração das folha, formato e tamanho do pecíolo) dos genótipos citrandarins ‘San Diego’, ‘Índio’ e ‘Riverside’, híbridos LRF (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, ‘HTR - 069’, ‘TSKC x (LCR x TR) - 059’, ‘TSK x TRBK - Colômbia’ e tangerineira ‘Sunki Tropical’, provenientes do

experimento anterior, foram introduzidas nos meios de cultura MS, RMAN e WPM (Tabela 1), gelificados com 2 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação das miniestacas, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹ até o início do enraizamento. Após 30 dias, as plantas enraizadas foram transferidas para sala de conservação com temperatura de 22 ± 1°C, sob fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons de 20 μmol m⁻² s⁻¹, conforme condições de redução de metabolismo *in vitro* de citros definida por Carvalho et al. (2016), sendo este considerado o primeiro subcultivo.

As plantas obtidas passaram por mais dois subcultivos nas mesmas condições descritas para o primeiro período de cultivo, com intervalo de 6 meses entre eles. Ao final de cada período de cultivo foram coletados os dados de altura de parte aérea (cm), número de folhas verdes, número de folhas senescentes, número de miniestacas com 1 cm de comprimento, contendo ao menos uma gema, e número de raízes.

2.3 Análises estatísticas

Em ambos os experimentos o delineamento foi inteiramente casualizado. O primeiro experimento foi realizado em esquema fatorial 3 x 10 (3 meios de cultura e 10 genótipos), com 6 repetições, cada uma representada por 4 sementes cultivadas em um frasco. O Segundo experimento foi desenvolvido em esquema fatorial 3 x 3 x 10 (3 meios de cultura, 3 subcultivos e 10 genótipos), com 20 repetições, cada uma representada por um explante cultivado em um tubo de ensaio.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância pelo software R, versão 3.4 (R Core Team, 2016), e as médias dos fatores meio e genótipo comparadas, respectivamente, pelos testes de Tukey e Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de valores de contagem foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

3. Resultados

3.1 Experimento I: Meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de citros

Os meios MS, RMAN e WPM forneceram respostas variadas quanto à porcentagem de germinação, altura de parte aérea (cm), número de folhas verdes, número de miniestacas e número de plântulas. Houve variação altamente significativa entre os genótipos para todas as variáveis analisadas. A interação entre meio de cultura e genótipo foi significativa apenas para número de folhas verdes e número de plântulas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância das variáveis de germinação e crescimento de porta-enxertos de citros cultivados nos meios de cultura MS, RMAN e WPM.

Fator de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio				
		PG	APA	NFV	NM	NP
Meio	2	2076,20 *	65,31 **	34,99 **	1,67 **	0,24 ^{ns}
Genótipo	9	2811,20 **	20,17 **	15,90 **	0,75 **	1,03 **
Meio x Genótipo	18	853,70 ^{ns}	2,82 ^{ns}	4,04 *	0,10 ^{ns}	0,14 *
Erro	143	573,30	3,11	2,08	0,07	0,08
CV (%)		40,91	27,53	24,85	13,57	15,85
Média		58,53	6,41	5,81	3,39	2,92

PG = porcentagem de germinação; APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NM = número de miniestacas; NP = número de plântulas.

**significativo (P<0,01), *significativo (P<0,05), ^{ns} não significativo (P<0,05).

O meio RMAN proporcionou o maior percentual de germinação de sementes dos porta-enxertos (62,92%), tendo o meio WPM apresentado média de germinação de 60,91%, que não diferiu estatisticamente da observada no RMAN, enquanto a composição do meio MS apresentou apenas 51,72% de germinação, que por sua vez não diferiu da observada no meio WPM (Tabela 3). No que tange à altura de parte aérea e número de miniestacas, os meios MS e RMAN se destacaram, apresentando médias superiores às observadas no WPM (Tabela 3).

Tabela 3. Médias de porcentagem de germinação (PG), altura de parte aérea (APA, em cm) e número de miniestacas (NM) de porta-enxertos de citros em função do meio de cultura e do genótipo utilizados, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meio de cultura	PG	APA	NM
MS	51,72 b	7,01 a	4,01 a

RMAN	62,92 a	7,05 a	3,54 a
WPM	60,91 ab	5,10 b	2,62 b
Genótipo	PG	APA	NM
Citrandarin 'San Diego'	59,72 b	6,01 b	3,82 b
Citrandarin 'Índio'	77,77 a	6,82 b	3,79 b
Citrandarin 'Riverside'	46,66 c	6,87 b	4,28 a
LRF (LCR x TR) - 005	56,94 b	7,26 a	4,16 a
HTR - 051	66,17 a	7,52 a	4,22 a
TSKC x CTSW - 028	75,00 a	4,56 c	1,88 d
HTR - 069	34,72 c	6,48 b	2,81 c
TSKC x (LCR x TR) - 059	55,55 b	6,32 b	3,29 b
TSK x TRBK - Colômbia	54,68 b	7,99 a	3,43 b
Tangerineira 'Sunki Tropical'	56,94 b	4,72 c	2,32 d

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey para meio de cultura e Scott-Knott para genótipo ($P < 0,05$).

Os genótipos citrandarin 'Índio', TSKC x CTSW - 028 e HTR - 051 produziram os maiores percentuais de germinação de sementes (77,77%, 75,00%, e 66,17%, respectivamente), em relação aos demais genótipos (Tabela 3).

As maiores alturas de parte aérea foram observadas para os híbridos TSK x TRBK - Colômbia (7,99 cm), HTR - 051 (7,52 cm) e LRF (LCR x TR) - 005 (7,26 cm), os quais apresentaram médias que não diferiram estatisticamente entre si. Já para a variável número de miniestacas, os porta-enxertos LRF (LCR x TR) - 005 e HTR - 051 novamente se destacaram, juntamente com o citrandarin 'Riverside', em comparação aos demais (4,16; 4,22 e 4,28, respectivamente) (Tabela 3).

A formulação MS agrupou todos os demais genótipos com médias de folhas verdes superiores às observadas para os porta-enxertos TSKC x CTSW - 028, HTR - 069 e tangerineira 'Sunki Tropical'. No meio RMAN apenas os citrandarins 'Índio', 'Riverside' e LRF (LCR x TR) - 005 se destacaram. A composição WPM não apresentou diferença estatística entre os genótipos. O meio de cultura MS apresentou número elevado de folhas verdes em todos os genótipos estudados, havendo médias inferiores para os genótipos HTR - 051 e TSKC x (LCR x TR) - 059 nos meios RMAN e WPM, além do citrandarin 'Riverside' e do híbrido TSK x TRBK - Colômbia, para o meio WPM (Tabela 4).

Tabela 4. Médias de número de folhas verdes e número de plântulas por semente de porta-enxertos de citros em função da interação entre meio de cultura e genótipo após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Meio de cultura		
	MS	RMAN	WPM
Número de folhas verdes			
Citrandarin ‘San Diego’	6,61 aA	6,15 bA	4,75 aA
Citrandarin ‘Indio’	7,47 aA	7,33 aA	5,99 aA
Citrandarin ‘Riverside’	7,50 aA	8,00 aA	4,83 aB
LRF (LCR x TR) – 005	6,60 aA	7,44 aA	5,85 aA
HTR – 051	7,93 aA	5,65 bB	5,37 aB
TSKC x CTSW – 028	3,89 bA	4,50 bA	4,35 aA
HTR – 069	4,93 bA	5,12 bA	3,87 aA
TSKC x (LCR x TR) – 059	8,43 aA	4,96 bB	4,22 aB
TSK x TRBK – Colômbia	7,44 aA	5,53 bAB	5,37 aB
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	4,83 bA	5,17 bA	4,22 aA
Número de plântulas			
Citrandarin ‘San Diego’	3,47 aA	3,08 aA	2,86 bA
Citrandarin ‘Indio’	5,25 aA	3,50 aB	5,72 aA
Citrandarin ‘Riverside’	3,54 aA	3,25 aA	2,67 bA
LRF (LCR x TR) – 005	2,33 bA	2,58 aA	3,33 bA
HTR – 051	2,34 bA	2,86 aA	2,12 cA
TSKC x CTSW – 028	3,49 aA	2,67 aA	3,18 bA
HTR – 069	1,63 bA	1,50 bA	1,43 cA
TSKC x (LCR x TR) – 059	1,10 bB	1,68 bB	3,19 bA
TSK x TRBK – Colômbia	4,06 aA	3,42 aA	4,20 aA
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	2,25 bA	1,58 bA	2,44 bA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e Tukey, respectivamente ($P < 0,05$).

Dentre os genótipos estudados, os maiores números de sementes germinadas no meio MS foram obtidos pelos três citrandarins e pelos híbridos TSKC x CTSW - 028 e TSK x TRBK - Colômbia. No meio RMAN, além desses genótipos, se destacaram também os híbridos LRF (LCR x TR) - 005 e HTR - 051. Já no meio WPM, apenas o citrandarin ‘Indio’ e o TSK x TRBK - Colômbia apresentaram números de plântulas superiores aos demais genótipos. Dentre os diferentes meios de cultura trabalhados, as variações no número de plântulas ocorreram para o citrandarin ‘Indio’, que se destacou nos meios MS e WPM (5,25 e 5,72, respectivamente) e para o híbrido TSKC x (LCR x TR) - 059, cuja média alcançada

no meio WPM (3,19) foi estatisticamente superior às obtidas nos outros dois meios nutritivos (Tabela 4).

3.2 Experimento II: Meios de cultura na conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros

Nas condições experimentais estudadas, os meios de cultura MS, RMAN e WPM proporcionaram porcentagens de regeneração de explantes que não diferiram estatisticamente entre si no primeiro período de cultivo, 98,0%; 78,0% e 97,5%, respectivamente, assim como ocorreu para os meios MS e WPM, no segundo e terceiro subcultivos (Figura 1). O RMAN, no segundo período de cultivo, propiciou média de regeneração de explantes consideravelmente inferior aos demais meios (35%), inviabilizando a multiplicação dos genótipos no terceiro período de subcultivo.

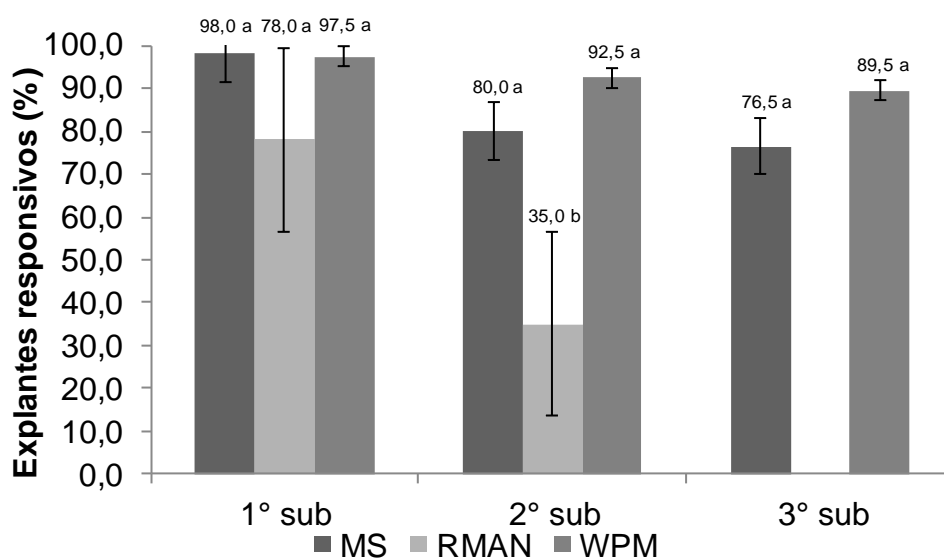


Figura 1. Porcentagem de explantes responsivos de porta-enxertos de citros submetidos a três subcultivos, com intervalo de seis meses entre eles, em meios de cultura MS, RMAN e WPM. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna de mesma cor não difere estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além da grande redução no número de explantes regenerados, na Figura 2 é possível visualizar a perda da viabilidade das plantas cultivadas no meio RMAN, a

partir de características como redução do número de folhas e coloração amarelada, o que já torna o meio inviável para uso na conservação *in vitro* de germoplasma de citros.

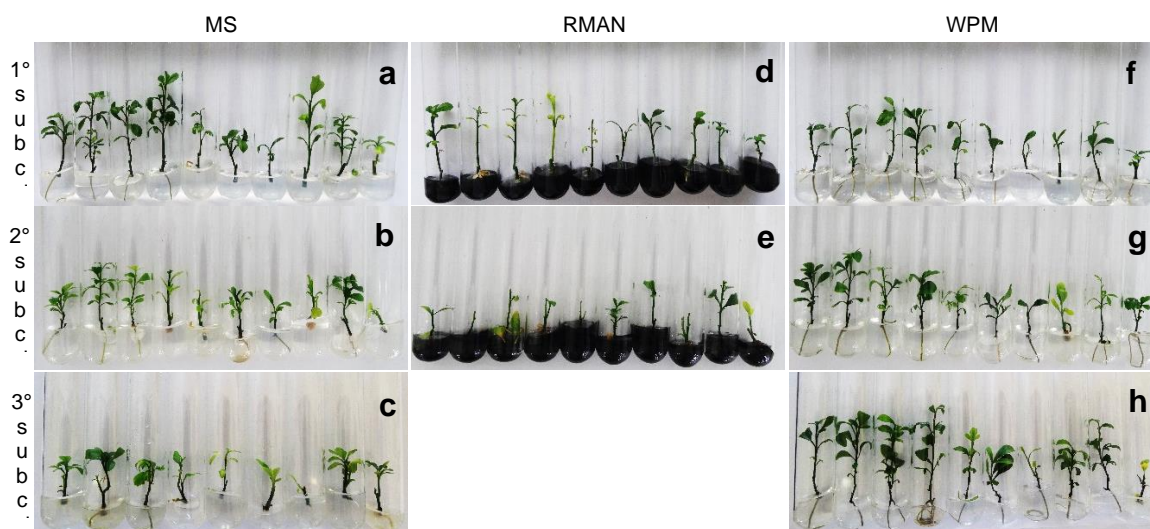


Figura 2. Plantas dos porta-enxertos citrandarins ‘San Diego’, ‘Indio’ e ‘Riverside’, híbridos LRF (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, TSK x TRBK - Colômbia e tangerineira ‘Sunki Tropical’, em uma parcela representativa de cada genótipo, da esquerda para a direita, respectivamente, micropropagadas nos meios MS (A, B e C), RMAN (D e E) e WPM (F, G e H), ao final de três subcultivos (1°: A, D e F; 2°: B, E e G e 3°: C e H), com intervalos de 6 meses entre eles.

Os fatores de variação subcultivo, meio e genótipo apresentaram significância a 1% de probabilidade ($P < 0,01$) em todas as interações estudadas, bem como para os fatores isolados, revelando que os diferentes meios de cultura conduzem à respostas variadas no decorrer dos períodos de subcultivos, podendo manifestar um provável efeito residual tóxico de alguns dos seus componentes do meio de cultura na morfogênese *in vitro* dos porta-enxertos estudados (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância de variáveis de crescimento de porta-enxertos de citros submetidos a três subcultivos em meios de cultura MS, RMAN e WPM, com intervalo de seis meses entre eles.

Fator de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio				
		AP	NFV	NFS	NM	NR

Subcultivo (SUB)	2	51,54 **	9,22 **	0,61 **	3,53 **	0,82 **
Meio	2	12,38 **	14,69 **	3,57 **	1,11 **	10,32 **
Genótipo (GEN)	9	70,24 **	13,06 **	0,43 **	5,55 **	1,00 **
SUB x Meio	3	85,92 **	7,08 **	3,20 **	5,32 **	0,42 **
Meio x GEN	18	5,23 **	1,65 **	0,68 **	0,33 **	0,40 **
SUB x GEN	18	5,79 **	1,15 **	0,87 **	0,61 **	0,45 **
SUB x Meio x GEN	27	4,19 **	1,20 **	0,35 **	0,30 **	0,21 **
Erro	1213	1,13	0,30	0,12	0,01	0,09
Média		2,98	5,89	0,50	2,79	0,91
CV (%)		35,63	22,73	37,4	17,69	26,97

APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NFS = número de folhas senescentes; NM = número de miniestacas; NR = número de raízes.

** significativo ($P < 0,01$).

No primeiro subcultivo, o híbrido LRF (LCR x TR) - 005 foi o único genótipo que apresentou significância estatística nos três meios de cultura, apesar de não diferir do híbrido TSKC x (LCR x TR) - 059, no meio MS, do citrandarin 'Riverside', no RMAN, e dos citrandarins 'Índio' e 'Riverside' no WPM, em relação à altura de parte aérea (Tabela 6).

Tabela 6. Médias de altura de parte aérea (cm) e número de miniestacas dos porta-enxertos de citros citrandarins ‘San Diego’ (CS), ‘Indio’ (CI) e ‘Riverside’ (CR), LRF (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, TSK x TRBK - Colômbia (CO) e tangerineira ‘Sunki Tropical’ (TST), submetidos a subcultivos, com intervalos de 6 meses entre eles, em diferentes meios de cultura.

Genótipo	1° Subcultivo			2° Subcultivo			3° Subcultivo	
	MS	RMAN	WPM	MS	RMAN	WPM	MS	WPM
Altura de parte aérea (cm)								
CS	3,20 CaA	3,76 BaA	2,87 BaAB	2,88 CaA	2,23 AaB	2,38 BaB	2,02 AbB	3,32 CaA
CI	4,39 BaA	3,83 BaA	3,88 AaAB	4,88 AaA	2,50 AbA	3,47 AabB	2,62 AbB	4,38 BaA
CR	3,98 BaA	4,76 AaA	3,90 AaA	3,46 BaA	3,10 AaB	2,64 BaB	2,29 AbB	4,58 BaA
005	5,31 AaA	4,56 AabA	3,84 AbB	3,22 BaB	3,15 AaB	3,27 AaB	2,16 AbC	5,19 AaA
051	3,51 CaA	3,98 BaA	3,25 BaA	2,50 CaB	1,51 AbB	1,90 CabB	2,12 AbB	3,18 DaA
028	2,51 DaA	2,37 CaA	1,80 CaA	1,89 DaAB	2,03 AaA	1,64 CaA	1,62 AaB	1,90 DaA
069	2,17 DbA	3,61 BaA	1,97 CbAB	1,67 DbA	2,79 AaB	1,67 CbB	1,40 AbA	2,53 CaA
059	5,06 AaA	3,09 CbA	2,15 CbA	2,45 CaB	1,97 AaB	2,68 BaA	2,44 AaB	2,95 DaA
CO	3,59 CaA	3,44 BaA	2,50 CbB	3,64 BaA	3,37 AabA	2,56 BbB	2,05 AbB	4,18 BaA
TST	2,28 DaA	2,00 CabA	1,41 CbA	1,40 DaA	1,87 AaA	1,83 CaA	1,20 AaA	2,00 DaA
Número de miniestacas								
CS	2,58 DaA	3,20 BaA	2,58 BaA	2,23 CaA	2,00 AaA	2,40 BaA	2,41 AaA	3,15 CaA
CI	4,11 BaB	3,44 BaA	3,58 AaA	5,37 AaA	2,50 AbA	3,25 AbA	2,90 AbC	3,89 BaA
CR	3,60 BaA	4,47 AaA	3,60 AaA	3,64 BaA	3,00 AaA	2,26 BaB	2,45 AbB	4,26 BaA
005	4,80 AaA	3,80 AabA	3,55 AbB	3,12 BaB	3,25 AaA	3,00 AaB	2,00 AbC	4,90 AaA
051	3,70 BaA	3,95 AaA	3,20 AaA	2,50 CaB	1,44 AbB	1,60 CabB	2,11 AbB	3,20 CaA
028	2,20 DaA	2,00 DaA	1,50 DaA	1,80 CaAB	1,90 AaA	1,15 CaA	1,47 BaB	1,47 EaA
069	2,15 DbA	3,05 BaA	1,50 DbAB	1,30 DbB	2,32 AaB	1,26 CbB	1,00 BbB	2,22 DaA
059	4,80 AaA	2,78 CbA	1,89 CbB	2,54 CaB	1,67 AaA	2,50 BaAB	2,57 AaB	3,06 CaA
CO	4,37 BaA	2,70 CbA	2,30 CbB	3,45 BaB	3,37 AabA	2,40 BbB	2,25 AbC	3,90 BaA
TST	3,05 CaA	1,53 DbA	1,15 DbB	1,00 DaB	2,00 AaA	1,18 CaAB	1,00 BaB	2,17 DaA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna, para genótipos dentro de cada meio e subcultivo; minúscula em cada linha, para meios dentro de cada subcultivo e genótipo; e maiúscula em cada linha, para subcultivos dentro de cada meio e genótipo, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (genótipos) e Tukey (meios e subcultivos) ($P < 0,05$).

No segundo subcultivo essa resposta foi apresentada pelo citrandarin 'Índio', que, entretanto, foi estatisticamente superior aos demais genótipos no meio MS, não diferiu dos outros porta-enxertos no RMAN e, juntamente com o híbrido LRF (LCR x TR) - 005, foi superior aos outros genótipos no meio WPM.

O porta-enxerto LRF (LCR x TR) - 005 também se destacou no terceiro subcultivo em meio WPM, produzindo uma altura de parte aérea de 5,19 cm e foi significativamente superior aos demais genótipos.

Esse porta-enxerto também apresenta um comportamento superior aos outros genótipos na variável número de miniestacas.

As maiores plantas no primeiro período de subcultivo foram obtidas nos meios MS e RMAN, com apenas um genótipo exibindo média estatisticamente inferior em cada um desses meios, respectivamente o HTR - 069 e o TSKC x (LCR x TR) - 059 (Tabela 6). Metade dos genótipos estudados apresentou médias significativamente inferiores quando cultivadas no WPM, em comparação com os outros dois meios. No segundo período de cultivo, o MS apresentou médias elevadas para 90% dos genótipos, enquanto nos meios RMAN e WPM essa porcentagem foi de 80%. Novamente o HTR - 069, no MS, o citrandarin 'Índio' e o HTR - 051, no RMAN, e o HTR - 069 e o TSK x TRBK - Colômbia, no WPM, foram estatisticamente inferiores na comparação entre os três meios de cultura. Já no terceiro subcultivo, o WPM superou o MS, alcançando em todos os genótipos médias superiores, a exceção do TSKC x CTSW - 028, do TSKC x (LCR x TR) - 059 e da tangerineira 'Sunki Tropical' para os quais não houve diferença estatística (Tabela 6).

O meio MS também proporcionou um elevado número de miniestacas nos primeiros subcultivos para a maioria dos genótipos que diferiram entre si nos diferentes meios (Tabela 6). Entretanto, no último período de cultivo analisado, a formulação WPM proporcionou maiores números de miniestacas em 60% dos genótipos, quando comparado ao MS (Tabela 6).

É importante ressaltar que as formulações MS e RMAN apresentaram maiores altura de planta e número de miniestacas no primeiro subcultivo, sendo que a partir da segunda multiplicação esses valores sofreram redução. Por outro lado, o meio WPM, apesar de obter médias de altura de planta e número de segmentos

nodais inferiores no primeiro subcultivo, alcançou no terceiro período as maiores médias (Tabela 6).

O número de folhas verdes foi bastante variável entre os genótipos ao longo dos subcultivos. No primeiro período, o citrandarin 'Riverside' e o LRF (LCR x TR) - 005 foram os únicos porta-enxertos estatisticamente superiores em todos os meios. No segundo subcultivo, o citrandarin 'Indio' se destacou nos meios de cultura utilizados, e no terceiro período os citrandarins 'San Diego', 'Indio' e 'Riverside', e os híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia alcançaram as maiores médias nos meios MS e WPM (Tabela 7).

Tabela 7. Médias de número de folhas verdes e senescentes dos porta-enxertos de citros citrandarins ‘San Diego’ (CS), ‘Indio’ (CI), e ‘Riverside’ (CR), LRF (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, TSK x TRBK - Colômbia (CO) e tangerineira ‘Sunki Tropical’ (TST) submetidos a subcultivos, com intervalos de 6 meses entre eles, em diferentes meios de cultura.

Genótipo	1° Subcultivo			2° Subcultivo			3° Subcultivo	
	MS	RMAN	WPM	MS	RMAN	WPM	MS	WPM
Número de folhas verdes								
CS	5,37 BaAB	4,20 BabA	3,32 BbB	4,00 BaB	4,00 AaA	5,60 BaA	7,18 AaA	7,20 AaA
CI	9,55 AaAB	5,37 BbA	6,53 AbB	11,05 AaA	4,00 AbA	8,05 AaAB	7,70 AaB	9,21 AaA
CR	9,45 AaA	7,53 AabA	6,70 AbAB	8,57 AaA	0,00 BbB	6,47 BaB	7,55 AaA	8,89 AaA
005	7,90 AaA	5,60 AbA	6,28 AabAB	4,81 BabB	2,50 AbB	5,44 BaB	3,94 BbB	8,45 AaA
051	6,30 BaA	4,16 BbA	5,85 AabA	3,95 BaB	0,33 BbB	3,40 CaB	5,39 AaAB	5,90 BaA
028	5,20 BaA	4,00 BaA	3,75 BaA	5,85 BaA	5,50 AaA	4,15 CaA	5,21 AaA	3,95 CaA
069	4,85 BaA	4,44 BabA	2,80 BbA	2,25 BaB	2,68 AaB	2,63 CaA	2,12 BbB	3,89 CaA
059	8,65 AaA	3,33 BbA	2,26 CbB	4,15 BabB	1,33 BbA	6,05 BaA	8,50 AaA	7,59 AaA
CO	8,74 AaA	4,20 BbA	5,80 AbAB	8,00 AaAB	5,81 AaA	5,70 BaB	5,75 AbB	8,25 AaA
TST	10,15 AaA	4,93 BbA	7,65 AaA	5,00 BaAB	5,33 AaA	5,73 BaA	2,00 BbB	6,50 BaA
Número de folhas senescentes								
CS	0,58 BaAB	1,00 AaA	1,16 BaB	0,88 AaB	0,33 AaA	0,20 AaA	0,18 AaA	0,00 AaA
CI	0,05 AaA	2,50 CbA	0,16 AaA	0,58 AaA	1,00 AaA	0,05 AaA	0,40 AaA	0,00 AaA
CR	0,05 AaA	1,26 BbA	0,05 AaA	1,07 AaB	6,00 BbB	0,37 AaA	0,35 AaA	0,37 BaA
005	0,05 AaA	0,15 AaA	0,00 AaA	2,00 BbB	0,50 AaA	0,39 AaA	0,62 AbA	0,00 AaA
051	0,40 BaAB	2,42 CbB	0,05 AaA	0,90 AbB	0,11 AaA	0,50 AabA	0,17 AaA	0,05 AaA
028	0,00 AaA	0,45 AaA	0,20 AaA	0,45 AaA	0,00 AaA	0,20 AaA	0,37 AaA	0,53 BaA
069	0,30 AaA	0,50 AaA	0,25 AaA	0,60 AbA	0,53 AabA	0,00 AaA	1,75 BbB	0,00 AaA
059	0,20 AaA	1,55 BbB	1,10 BbA	1,92 BbB	0,00 AaA	0,50 AabA	0,36 AaA	0,59 BaA
CO	0,10 AaA	0,90 AbB	0,05 AaA	0,55 AaA	0,19 AaA	0,20 AaAB	0,45 AaA	0,85 BaB
TST	0,75 BaA	0,67 AaA	0,30 AaA	0,00 AaA	0,33 AaA	1,00 AaAB	1,00 BaA	1,83 CaB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna, para genótipos dentro de cada meio e subcultivo; minúscula em cada linha, para meios dentro de cada subcultivo e genótipo; e maiúscula em cada linha, para subcultivos dentro de cada meio e genótipo, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (genótipos) e Tukey (meios e subcultivos) ($P < 0,05$).

A formulação MS proporcionou o maior número de folhas verdes no primeiro subcultivo para a grande maioria dos genótipos. No segundo subcultivo, os meios MS e WPM se igualaram, apresentando médias superiores as do RMAN para metade dos genótipos. Já no terceiro subcultivo o WPM se apresentou superior ao MS, com maiores números de folhas verdes para os genótipos que se apresentaram estatisticamente diferentes nos referidos meios (Tabela 7).

Para o número de folhas senescentes, as menores médias foram consideradas superiores, por ser uma característica desfavorável ao cultivo de plantas *in vitro*. No primeiro subcultivo, as menores médias de número de folhas senescentes nos três meios de cultura foram apresentadas pelos genótipos LRF (LCR x TR) - 005, TSKC x CTSW - 028 e HTR - 069. No segundo subcultivo, a maioria dos genótipos manteve um baixo número de folhas senescentes em todos os meios, com exceção dos híbridos LRF (LCR x TR) - 005 e TSKC x (LCR x TR) - 059 para o meio MS e do citrandarin 'Riverside' para o meio RMAN, quando diferiram estatisticamente dos demais porta-enxertos. E, no terceiro subcultivo, se destacaram os genótipos citrandarins 'San Diego' e 'Índio' e os híbridos LRF (LCR x TR) - 005 e HTR - 051, com menor número de folhas senescentes nos meios MS e WPM.

Os meios de cultura MS e WPM apresentaram, estatisticamente, menor número de folhas senescentes em relação ao meio RMAN para 50% e 40% dos genótipos avaliados, respectivamente, no primeiro subcultivo. Para os demais genótipos, não houve diferença estatística entre os meios. No segundo período de subcultivo, a formulação WPM levou a um menor número de folhas senescentes que o observado para os meios RMAN e MS em 10% e 20% dos genótipos estudados, respectivamente. No terceiro subcultivo, o WPM foi estatisticamente superior ao meio MS também em 20% dos porta-enxertos (Tabela 7).

Um número mais elevado de raízes em todos os meios, para o primeiro subcultivo, apenas foi alcançado pelo genótipo LRF (LCR x TR) - 005. No segundo subcultivo, não houve diferença entre os genótipos quando cultivados nos meios MS e WPM; já no RMAN, os porta-enxertos citrandarin 'San Diego', LRF (LCR x TR) - 005, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSK x TRBK - Colômbia e a tangerineira 'Sunki Tropical' apresentaram médias estatísticas superiores aos demais, variando

de 1,30 a 2,33. No terceiro subcultivo, os citrandarins 'Indio' e 'Riverside' e o híbrido LRF (LCR x TR) - 005 foram superiores aos demais nos meios MS e WPM (Tabela 8).

Tabela 8. Médias de número de raízes dos porta-enxertos de citros citrandarins ‘San Diego’ (CS), ‘Índio’ (CI), e ‘Riverside’ (CR), LRF (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, TSK x TRBK - Colômbia (CO) e tangerineira ‘Sunki Tropical’ (TST) submetidos a subcultivos, com intervalos de 6 meses entre eles, em diferentes meios de cultura.

Genótipo	1° Subcultivo			2° Subcultivo			3° Subcultivo	
	MS	RMAN	WPM	MS	RMAN	WPM	MS	WPM
Número de raízes								
CS	0,89 BbA	2,00 AaA	1,42 AabA	0,41 AbAB	1,33 AaA	1,00 AabA	0,06 BbB	1,30 AaA
CI	0,72 BaA	0,69 BaA	1,10 AaA	0,79 AaA	0,50 BaA	1,00 AaA	0,60 AbA	1,47 AaA
CR	0,85 BabA	0,79 BbA	1,25 AaA	0,64 AaA	0,00 BbA	1,10 AaA	0,65 AbA	1,21 AaA
005	2,00 AaA	1,70 AabA	1,11 AbB	0,31 AbB	1,75 AaA	1,28 AaB	0,44 AbB	2,55 AaA
051	0,45 BbA	0,84 BabA	1,15 AaA	0,40 AabA	0,22 BbB	0,90 AaA	0,11 BbA	0,95 BaA
028	0,55 BbA	1,35 AaA	1,20 AaA	0,60 AbA	1,30 AaA	0,75 AabAB	0,00 BbB	0,63 BaB
069	0,75 BbA	1,44 AaA	1,05 AabA	0,40 AbAB	1,63 AaA	0,79 AbA	0,00 BbB	0,72 BaA
059	0,35 BaAB	0,89 BaA	0,47 BaA	0,08 AaB	0,67 BaA	0,61 AaA	0,85 AaA	0,82 BaA
CO	0,63 BbA	0,80 BabB	1,20 AaA	0,65 AbA	1,44 AaA	1,00 AabA	0,60 AaA	0,95 BaA
TST	0,45 BcA	2,07 AaA	1,20 AbA	0,00 AbA	2,33 AaA	1,36 AabA	0,00 BbA	1,33 AaA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna, para genótipos dentro de cada meio e subcultivo; minúscula em cada linha, para meios dentro de cada subcultivo e genótipo; e maiúscula em cada linha, para subcultivos dentro de cada meio e genótipo, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (genótipos) e Tukey (meios e subcultivos) ($P < 0,05$).

As formulações RMAN e WPM se destacaram na formação de raízes, com quase todos genótipos apresentando número elevado de raízes, em comparação ao meio MS, onde apenas quatro genótipos propiciaram médias estatísticas semelhantes as observadas nos meios RMAN e WPM no primeiro e segundo períodos de subcultivo. No terceiro subcultivo, o WPM apresentou médias superiores às do MS em oito genótipos.

4. Discussão

4.1 Meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de citros

A propagação via sementes apresenta vantagens como a aquisição de plântulas livres de doenças e com a mesma constituição genética da planta mãe se originada por apomixia (George e Debergh, 2008). Esse método de reprodução assexuada ocorre no gênero *Citrus*, para o qual a obtenção de plantas *in vitro* se dá geralmente via sementes, em função da complexidade de regeneração de meristemas apicais - método de propagação vegetativa que garante a limpeza clonal de genótipos, e mesmo da dificuldade na descontaminação e regeneração de brotos maduros, como destaca Gorshkov et al. (2019) em seu trabalho com diferentes genótipos de limoeiros [*Citrus limon* (L.) Osbeck].

No processo de estabelecimento *in vitro*, via sementes, conforme pode ser observado no presente estudo, o meio de cultura e o genótipo são fatores que influenciam diretamente na germinação e no desenvolvimento *in vitro* dos porta-enxertos de citros estudados. Apesar do meio MS ser de uso comum no cultivo *in vitro* de embriões de citros (Jajoo, 2010; Sepehrtaj e Shahsavari, 2017), foi a composição do meio RMAN que forneceu o maior percentual de germinação, o qual não diferiu do observado para o meio WPM (Tabela 3), contudo este último também não diferiu do MS. Esses resultados podem estar relacionados a concentração de sais nesses meios, onde composições nutricionais inferiores às encontradas no MS podem ter favorecido a germinação dos porta-enxertos, conforme relata Sangma et al. (2018), ao obterem maiores percentuais germinativos de *Citrus indica* Tanaka no meio MS em metade de sua composição basal. Isso pode ser justificado pela reserva nutricional ainda presente

no embrião, tornando desfavorável maiores concentrações de nutrientes no processo de germinação.

Na fase de introdução *in vitro* dos porta-enxertos, os meios MS e RMAN se destacaram em relação ao WPM para altura de planta e número de miniestacas (Tabela 3), demonstrando, dessa forma, a formulação RMAN, eficiência tanto na germinação quanto no desenvolvimento de plântulas. Essas características são de suma relevância quando se almeja uma micropropagação em larga escala. Sangma et al. (2018) também alcançaram altura de planta mais elevada na formulação MS, quando comparada ao WPM, ao cultivarem *in vitro* sementes de *Citrus indica* Tanaka. Esse diferencial regenerativo após a germinação das sementes pode ser consequência de alguns dos elementos essenciais, comuns aos referidos meios em destaque, e presentes em maior concentração em relação ao meio WPM, como o nitrato, o amônio, o iodo e o cobalto, elementos esses envolvidos na composição de aminoácidos e proteínas e em funções enzimáticas, atuando dessa forma no desenvolvimento da planta.

As variações nas respostas regenerativas observadas para os diferentes porta-enxertos podem ser atribuídas às suas características genéticas particulares, tendo o genótipo forte influência no sucesso do cultivo *in vitro* (Schinor et al., 2011). Contudo, apesar do número de plântulas ser um atributo variável entre os genótipos - estando relacionado com a taxa de poliembrionia dos mesmos, pois quanto mais elevada essa taxa, maiores números de plântulas são esperadas -, o presente estudo demonstrou que o meio de cultura é um fator a se considerar ao avaliar a capacidade germinativa dos embriões em alguns porta-enxertos, como ocorre para o citrandarin 'Indio' e o TSKC x (LCR x TR) – 059. Estes mostraram número de plântulas variáveis nos diferentes meios, com o meio WPM apresentando médias superiores em ambos os genótipos (Tabela 4). Contudo, a média do número de plântulas de forma geral entre os meios estudados (1,10 a 5,72) (Tabela 4) encontra-se próxima aos números médios de embriões por semente, observados para alguns dos mesmos genótipos por Duarte et al. (2013) (1,88 a 6,02), sendo possível a obtenção *in vitro* de um elevado número de germinação de embriões por semente.

Esses dados são relevantes também quando se almeja micropropagar esses porta-enxertos a partir do estabelecimento *in vitro* por meio de sementes, garantindo por esse método, em relação ao sistema convencional, uma elevada produção de mudas uniformes e com qualidade fitossanitária (Sepehrtaj e Shahsavar, 2017), sem influência sazonal e superando limitações genéticas de porta-enxertos promissores, como baixa produção e/ou taxa de germinação de sementes.

4.2 Meios de cultura na conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros

As plantas cultivadas *in vitro* não são capazes de produzir a totalidade de sua própria exigência em matéria orgânica pela fotossíntese, sendo a composição nutricional do meio de cultura indispensável ao seu desenvolvimento e manutenção (George e Klerk, 2008). Nas condições experimentais estudadas para a conservação dos porta-enxertos, o meio RMAN não apresentou composição nutritiva eficaz à morfogênese *in vitro*, proporcionando porcentagens de regeneração de explantes reduzida a mais da metade já no segundo período de cultivo, em comparação aos meios MS e WPM, nos quais os percentuais de respostas dos explantes não diferiram entre si. É importante ressaltar ainda a grande redução da viabilidade das plantas observadas no meio RMAN (Figuras 1 e 2), o que limita o seu uso apenas à germinação *in vitro* de sementes.

Os resultados observados nesse estudo diferiram dos obtidos por Navarro-García et al. (2016), ao analisarem a regeneração *in vitro* de limoeiros em diferentes meios, encontrando um elevado percentual de explantes responsivos no MS (94,57% a 96,51%), em contraste a um percentual bem inferior no meio WPM (20,00% a 28,41%). Por outro lado, corroborando com os dados do presente estudo, Tallón et al. (2013), obtiveram uma baixa taxa de regeneração para o *Citrus macrophylla* em meio MS, comparado ao meio WPM, enquanto para o *C. aurantium* as respostas entre os meios não variaram. Esses resultados revelam a existência de respostas variadas a nível de genótipo, enfatizando a necessidade de determinação do meio ideal para cada genótipo ou para um grupo específico de genótipos.

No processo de subcultivo a altura de planta e o número de miniestacas obtidos *in vitro* podem refletir na taxa de micropropagação da cultura, sendo interessante que a

cada novo subcultivo eleve-se ainda mais o número de plantas cultivadas. Ao longo dos subcultivos, as melhores respostas para essas variáveis foram obtidas no meio WPM (Tabela 6). Semelhantes observações foram feitas por Oliveira et al. (2010), que obtiveram maiores brotações das cultivares Pera, Bahia, Valença e Cravo quando utilizaram a formulação WPM em comparação com o MS.

O meio de cultura WPM ainda se destacou ao longo dos subcultivos quanto ao número de folhas verdes e a produção reduzida de folhas senescentes (Tabela 7). Essas variáveis são características de grande relevância na conservação *in vitro* de germoplasma por estarem relacionadas ao vigor da planta, sendo a senescência foliar um processo de envelhecimento indesejável (Canto et al., 2004), indicando a necessidade de novos subcultivos, ao passo que o baixo vigor pode também dificultar a morfogênese em um novo processo de multiplicação.

Os meios WPM e RMAN obtiveram destaque no processo de rizogênese em todos os períodos de cultivo onde foram analisados (Tabela 8). A presença de um sistema radicular aumenta a capacidade de sobrevivência da planta *in vitro*, além de torná-la apta para a aclimatização (Engelmann, 1991; Ziv e Chen, 2008). Glimaldi et al. (2008) relatam a importância de concentrações adequadas de nutrientes minerais para um bom desenvolvimento de raiz, constatando que concentrações mais diluídas, em relação às presentes no meio MS, favorecem o processo de formação de raízes, como pôde ser constatado também nesse estudo para os meios WPM e RMAN. Souza e Pereira (2007) relatam que o carvão ativado, presente no meio RMAN, pode ser benéfico para o enraizamento, por promover a adsorção de componentes do meio que podem comprometer esse processo, como, por exemplo, citocininas e/ou giberelinas residuais, componentes tóxicos.

No geral, de acordo com as variáveis de crescimento dos porta-enxertos de citros estudadas, é possível observar grande variação na resposta morfogênética obtida em cada meio de cultura ao longo dos subcultivos, sendo evidente uma redução no desenvolvimento *in vitro* das plantas cultivadas nos meios MS e RMAN a cada novo subcultivo. A única exceção foi a variável número de folhas senescentes para o meio RMAN, a qual foi favoravelmente reduzida, provavelmente em função da regeneração de um menor número de folhas no segundo subcultivo. Já o número de raízes se

manteve estável para a maioria dos genótipos, mesmo as plantas regeneradas apresentando deficiência na morfogênese da parte aérea (Figura 2E), o que pode indicar um desbalanço hormonal ou nutricional, desfavorecendo apenas o desenvolvimento de parte aérea, uma vez que o RMAN é meio apropriado para desenvolvimento de raízes em citros (Grosser e Gmitter Junior, 1990). O WPM, por sua vez, produziu, no primeiro período de subcultivo, médias inferiores às obtidas nos demais meios, porém manteve ou superou a capacidade regenerativa das plantas no decorrer dos subcultivos (Figura 2F, G e H).

Tállon et al. (2013) também obteve com o meio WPM os melhores resultados na organogênese *in vitro* de porta-enxertos de citros. Em contrapartida, outros autores puderam observar, no meio MS, respostas mais favoráveis à morfogênese *in vitro* de cultivares cítricas de laranjeiras e de limoeiros (Oliveira et al., 2010; Navarro-García, et al., 2016). No entanto, além do grupo de genótipos trabalhados, o que possibilita nesse sentido, em combinação com os dados obtidos por Tállon et al. (2013), estabelecer a formulação WPM como base para regeneração do grupo de porta-enxertos estudados em ambos os trabalhos, é preciso considerar também o fator subcultivo, o qual foi o revelador de variações nas respostas obtidas nos diferentes meios, e que foi constatada apenas no presente estudo.

O efeito de redução nas variáveis de desenvolvimento dos porta-enxertos observado nos meios MS e RMAN pode ser considerado residual e ocorrer em função de concentrações diferenciadas de alguns nutrientes, os quais estão presentes em maior quantidade, no meio WPM, em comparação com o MS, a exemplo do sulfato, cobre e tiamina; em menores quantidades, como o nitrato, o amônio, o potássio e o cloreto; ou ausentes, como o iodeto e o cobalto (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações de alguns dos principais componentes minerais dos meios MS, RMAN e WPM calculados com base em suas formulações basais (MURASHIGE; SKOOG, 1962; LLOYD; McCOWN, 1980; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Componente (mM)	MS	RMAN	WPM	Componente (µM)	MS	RMAN	WPM
NH ₄ ⁺	20,61	10,31	5,00	Mn ⁺	100,00	50,00	130,00
NO ₃ ⁻	39,40	19,71	9,71	Zn ⁺	30,00	15,00	30,00

K ⁺	20,04	10,06	12,61	BO ₃ ⁻	100,00	50,00	100,00
Ca ⁺	3,00	3,00	3,00	I ⁻	5,00	2,50	-
Cl ⁻	6,00	6,03	1,31	Mo ⁺	1,00	5,00	1,00
Mg ⁺	3,07	1,54	3,07	Co ⁺	0,10	0,05	-
SO ₄ ⁻	3,30	1,70	9,10	Cu ⁺	0,10	0,05	1,00
PO ₄ ⁻	1,25	0,61	1,25	Tiamina	0,30	14,80	3,00
Fe ⁺	0,10	0,10	0,10	Piridoxina	2,40	24,30	2,40
Na ⁺	0,20	0,20	0,20	Ácido nicotínico	4,00	20,00	4,00
				Glicina	26,60	13,00	26,60
				Inositol	550,00	280,00	550,00

Efeitos tóxicos cumulativos observados no segundo subcultivo, tanto para o meio MS quanto para o meio RMAN, a partir da redução nas médias das variáveis de crescimento analisadas, podem convalidar os resultados obtidos por Tállon et al. (2013). Esses autores atribuem como causa desses efeitos a elevada concentração de cloro presente no MS (6,00 mM), concentração essa similar à encontrada no meio RMAN (6,03 mM) e bem superior à observada para a formulação WPM (1,31 mM). O relato de Amaral et al. (2007), de que a redução na concentração de sais do MS tem resultado em sucesso na conservação *in vitro* de várias espécies, o que não pôde ser observado no meio RMAN, cuja constituição é com a metade das concentrações dos nutrientes presentes no MS, com exceção do cálcio, ferro, cloro, sódio e da maioria das vitaminas (Tabela 9), corrobora também com essa hipótese, podendo, dentre os nutrientes também em elevada concentração, como no MS, ser o cloro o responsável pelo efeito tóxico observado.

In vitro, as plantas absorvem íons minerais a partir de suas raízes de forma passiva ou através de mecanismos ativos. George e Klerk (2008) afirmam que ambos os sistemas podem ser, no entanto, influenciados pela concentração de outros elementos e que, dessa forma, alguns deles em concentrações muito elevadas, podem inibir a absorção de outros pela competição que pode ocorrer, por exemplo, entre os íons de cátions, como K⁺ e NH₄⁺. Esses autores relatam ainda que há uma alta proporção de nitrogênio NH₄⁺ no meio MS [razão de NO₃⁻ para NH₄⁺, 66:34], sendo a quantidade de nitrogênio total muito elevada em relação a encontrada na maioria dos outros meios. No caso dos genótipos de citros estudados neste trabalho, o nitrogênio

total ou o equilíbrio entre as duas formas disponibilizadas no meio MS pode não ser o ideal para a manutenção da cultura.

Segundo George e Klerk (2008), os elementos cobalto e iodeto, ausentes no meio WPM, podem ser considerados essenciais ou benéficos para algumas espécies, mas sua essencialidade ainda não foi estabelecida. Todavia, perante os resultados obtidos nos diferentes meios estudados, esses podem ser elementos apenas benéficos para os citros, uma vez que a ausência dos mesmos no meio WPM não prejudicou a morfogênese *in vitro* dos porta-enxertos de citros ao longo dos subcultivos, quando comparado aos demais meios.

5. Conclusões

A formulação RMAN é a mais viável para o estabelecimento de plântulas dos porta-enxertos de citros em relação ao meio MS.

O meio WPM é indicado para a conservação *in vitro* dos porta-enxertos, por manter a viabilidade e um crescimento de parte aérea e raiz balanceado, mantendo o potencial morfogênico dos explantes ao longo, de pelo menos, três subcultivos.

6. Referências

AMARAL L, VEIGA RFA, TOMBOLATO ACF, BARBOSA W, CONAGIN A (2007) Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de Amarílis (*Hippeastrum Herb.*). Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 13:113-120

CANTO AMME, SOUZA FVD, COSTA MAPC, SOUZA AS, LEDO CAS, CABRAL JRS (2004) Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39:717-720

CARVALHO MJS, SOUZA AS, SANTOS EB, SOARES FILHO WS, LEDO CAS, SOUZA FVD (2016). Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. *Acta Scientiarum Agronomy* 381:129-137

DUARTE FEV, BARROS DR, GIRARDI EA, SOARES FILHO WS, PASSOS OS (2013). Poliembrionia e atributos morfológicos de sementes de porta-enxertos de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 351:246-254

DRIVER JA, KUNIYUKI AH (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 194:507-550

ENGELMANN F (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. *Euphytica* 57:227-243

GEORGE EF, DEBERGH PC (2008). Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE EF, HALL MA, KLERK GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 29-61

GEORGE EF, KLERK GJ (2008). The components of plant tissue culture media I: macro and micro-nutrients. In: GEORGE EF, HALL MA, KLERK GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 65-113

GLIMALDI F, GROHSKOPF MA, MUNIZ AW, GUIDOLIN AF (2008). Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 72:160-168

GORSHKOV VM, SAMARINA LS, KULYAN RV, MALYAROVSKAYA VI, RYNDIN AV, RAKHMANGULOV RS, ORLOV YL (2019). Challenges of *in vitro* conservation of Citrus germplasm resources. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 231:24-28.

GROSSER JW, GMITTER JUNIOR FG (1990). Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8:339-374

JAJOO A (2010). *In vitro* Propagation of *Citrus limonia* Osbeck through nucellar embryo culture. Current Research Journal of Biological Sciences 21:6-8

LLOYD G, McCOWN B (1980). Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience 153:416-417

MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

MURASHIGE T, TUCKER DRH (1969). Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, Riverside, University of California, pp 1155-1169

NAVARRO-GARCÍA N, MORTE A, PÉREZ-TORNERO O (2016). *In vitro* adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 52:161-173

OLIVEIRA MLP, COSTA MGC, SILVA CV, OTONI WC (2010). Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45:654-660

OLIVEIRA RP (2006). Biotecnologia em citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/745209/biotecnologia-em-citros>. Cited 20 janray 2019

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Cited 27 december 2018

SANGMA SYA, PEREIRA LS, DANG JC (2018). Effect of media and culture environment on *in vitro* seed germination of *Citrus indica* Tanaka. *Environment and Ecology* 364:959-963

SANTOS ARA, SOUZA EH, SOUZA FVD, FADINI M, GIRARDI EA, SOARES FILHO WS (2015). Genetic variation of *Citrus* and related genera with ornamental potential. *Euphytica* 205:503-520

SEPEHRTAJ A, SHAHSAVAR AR (2017). Uniform and virus-free citrus rootstocks production via nucellus culture. *Advances in Horticultural Science* 313:175-181

SCHINOR EH, AZEVEDO FA, MOURÃO FILHO FAA, MENDES BMJ (2011). *In vitro* organogenesis in some citrus species. *Revista Brasileira Fruticultura* 332:526-531

SOUZA AV, PEREIRA MAS (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 94:103-117

TALLÓN CI, PORRAS I, PÉREZ-TORNERO O (2013). High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49:145-155

VOLK GM, BONNART R, SHEPHERD A, YIN Z, LEE R, POLEK M, KRUEGER R (2017). Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128:327-334

ZENG H, WANG G, HU X, WANG H, DU L, ZHU Y (2014). Role of microRNAs in plant responses to nutrient stress. *Plant and Soil* 374:1005-1021

ZHANG J, XIN X, YIN G, LU X, CHENA X (2014). *In vitro* conservation and cryopreservation in national genebank of China. *Acta Horticulturae* 1039:309-318

ZIV M, CHEN J (2008). The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In: GEORGE EF, HALL MA, KLERK GJ (eds) Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht, pp 465-479

CAPÍTULO 2

Conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com uso de paclobutrazol e análise da viabilidade e estabilidade genética **

Maria Inês de Souza Mendes^{1*}, Denise dos Santos Vila Verde², Andresa Priscila de Souza Ramos³, Abelmon da Silva Gesteira³, Walter dos Santos Soares Filho³, Márcio Gilberto Cardoso Costa¹, Antônio da Silva Souza³

Resumo

As vulnerabilidades as quais os recursos genéticos de citros estão expostos em condições de conservação a campo tornam importante a garantia de uma cópia de segurança *in vitro* mantendo-se um crescimento mínimo e garantindo a viabilidade e a fidelidade genética dos clones. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para conservação *in vitro* de citros apartir do uso de paclobutrazol e do estabelecimento e conservação a longo prazo de plantas nucelares de porta-enxertos de citros com o estudo da viabilidade e da estabilidade genética. No primeiro experimento miniestacas apicais com 1 cm, oriundas de plantas cultivadas *in vitro* de cinco porta-enxertos foram introduzidas no meio WPM (Woody Plant Medium) basal e suplementado com 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ de paclobutrazol, e mantidas sob condições de conservação por 6 meses, sendo realizada a aclimatização de plantas oriundas do meio definido para conservação. Para o segundo experimento 10 plântulas nucelares (confirmadas via marcadores SSRs) de 10 porta-enxertos de citros foram multiplicadas e conservadas em meio WPM basal, conforme definido no primeiro experimento. Ao final de 12 meses de conservação, 12 plantas de cada acesso foram submetidas a três subcultivos para verificação da viabilidade. De plantas oriundas do terceiro subcultivo após conservação foram realizadas análises moleculares com o uso de 21 maradores SSRs para detecção de variantes somaclonais. O uso do paclobutrazol não mostrou eficiencia na manutenção do crescimento reduzido nos genótipos de citros estudados, sendo o meio WPM basal o mais indicado para conservação *in vitro*. Plantas aclimatizadas, oriundas da conservação *in vitro* apresentam 100% de sobrevivência. Os marcadores SSRs foram eficientes na caracterização dos porta-enexertos estudados, revelando indivíduos híbridos apenas o genótipo HTR - 051 (20%). De modo geral as condições de conservação *in vitro* estudadas não afetaram a viabilidade das plantas. Os três ciclos de subcultivos realizados após a conservação não resultaram em variantes somaclonais. O protocolo de conservação descrito nesse estudo pode ser utilizado para a conservação *in vitro* dos porta-enxertos analisados.

** Artigo a ser submetido à revista *Scientia Horticulturae*

*Maria Inês de Souza Mendes; inessm.123@gmail.com; Tel.: +55-75-98128-9348

¹Campus Soane Nazaré de Andrade, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil

³Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil

Palavras-chave: *Citrus*, recursos genéticos, cultura de tecidos, retardante de crescimento, variação somaclonal.

Abstract

The vulnerabilities to which the citrus genetic resources are exposed in conditions of conservation in the field make it important to guarantee an *in vitro* backup while maintaining minimal growth and guaranteeing the viability and genetic fidelity of the clones. In this sense, this work aimed to establish a protocol for *in vitro* conservation of citrus from the use of paclobutrazol and the establishment and long-term conservation of nucellar plants of citrus rootstocks with the study of viability and genetic stability. In the first 1 cm apical minicuttings experiment, from plants grown *in vitro* from five rootstocks, they were introduced into the basal WPM (Woody Plant Medium) medium and supplemented with 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 mg L⁻¹ of paclobutrazol and kept under conservation conditions for 6 months, with the acclimatization of plants from the medium defined for conservation. For the second experiment, 10 seedlings (confirmed via SSR markers) from 10 citrus rootstocks were multiplied and kept in basal WPM medium, as defined in the first experiment. At the end of 12 months of conservation, 12 plants from each access were submitted to three subcultures to verify viability. From plants from the third subculture after conservation, molecular analyzes were performed using 21 SSR markers to detect somaclonal variants. The use of paclobutrazol did not show efficiency in maintaining reduced growth in the studied citrus genotypes, with the basal WPM medium being the most suitable for *in vitro* conservation. Acclimatized plants from *in vitro* conservation have 100% survival. The SSRs markers were efficient in the characterization of the studied rootstocks, revealing hybrid individuals only the HTR - 051 genotype (20%). In general, the *in vitro* conservation conditions studied did not affect the viability of the plants. The three cycles of subcultures performed after conservation did not result in somaclonal variants. The conservation protocol described in this study can be used for *in vitro* conservation of the analyzed rootstocks.

Keywords: *Citrus*, genetic resources, tissue culture, growth retardant, somaclonal variation.

1. Introdução

Os citros são plantas eudicotiledoneas pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae. Além dos *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, que constituem os gêneros de importância econômica mundial, essa subtribo engloba ainda os gêneros *Severinia* Ten. ex Endl., *Pleiospermium* [(Engl.) Swingle];

Burkillantus (Swingle), *Limnocitrus* (Swingle), *Hesperetusa* (Roem.), *Citropsis* [(Engl.) Swingle; M. Kell.], *Atalantia* (Corrêa), *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia* (Swingle, 1967; Otriz Marcide, 1985; Weiler et al., 2010). Esse alto nível de diversidade genética presente nos citros pode constituir uma base para o uso sustentável e a conservação dos recursos genéticos (Barbhuiya et al., 2016).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura conta com um banco de germoplasma de citros em campo com mais de 750 acessos (Santos et al., 2015). Essa variabilidade existente constitui a base para o Programa de Melhoramento Genético de Citros dessa Instituição, fornecendo parentais para uso em hibridações controladas, gerando novas variedades copa e porta-enxerto.

Além da Embrapa Mandioca e Fruticultura, outras instituições mantêm bancos de germoplasma de citros em campo, como o Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, com 1.709 acessos (Oliveira, 2006), o Institute of Crop Science, da Chinese Academy of Agricultural Sciences, com 1.335 acessos (Zhang et al., 2014) e o United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS) National Plant Germplasm System (NPGS), com 1.372 acessos (Volk et al., 2017).

No entanto, a manutenção em campo torna o germoplasma vulnerável a diversos fatores abióticos e bióticos, como: erosão genética, pragas e doenças, predadores e condições climáticas extremas. Nesse sentido, a conservação *in vitro* constitui uma grande perspectiva mundial e um método que se tornará indispensável para a conservação de germoplasma, por promover maior segurança dos recursos genéticos e requerer um espaço limitado para a sua manutenção (Zhang et al., 2014).

Na conservação *in vitro*, além do uso de baixas temperaturas e luminosidade (Carvalho et al., 2016), o uso de substâncias inibidoras se faz necessário na promoção de um crescimento lento, de forma a aumentar o intervalo entre os subcultivos. Nesse sentido o paclobutrazol (PBZ), um bloqueador da oxidação do ent-caureno para GA12-aldeído, pela P450 mono-oxigenases durante a síntese de giberelina, a qual atua no alongamento celular, inibindo, dessa forma, o crescimento da planta (Kishore et al., 2015; Bisht et al., 2018) tem tido grande aplicação na indução da floração e na promoção de um crescimento reduzido *in vitro*, em diversas espécies, com dosagens que variam de acordo com as características fisiológicas de cada espécie (Bello-Bello et

al., 2015; Padilla et al., 2015; Deswiniyanti et al., 2018; Mog et al., 2019). Contudo, em citros, não há estudos acerca da aplicação do PBZ no cultivo *in vitro*, visando a conservação do germoplasma.

O estabelecimento *in vitro* de citros é feito geralmente via sementes, o que garante, além da qualidade fitossanitária, a fidelidade genética, por ser esta uma espécie que tem como característica a poliembrionia. No entanto, dependendo do genótipo, pode ser produzido um número considerável de plantas zigóticas, o que pode afetar a conservação de variedades existentes.

A identificação de indivíduos nucelares e zigóticos pode ser feita com auxílio de marcadores moleculares. Os marcadores SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites, são de fácil uso, codominantes, altamente polimórficos e podem ser usados em citros para identificação de diversidade intraespecífica, interespecífica e intrapopulacional (Froelicher et al., 2008).

Diversos estudos em citros utilizam marcadores SSRs para identificação e caracterização de variedades e clones em plantas obtidas de cruzamentos controlados (Ahmad, et al., 2003; Yildiz et al., 2013), além de outros objetivos, a exemplo da identificação de diversidade genética em coleção de germoplasma (Barkley et al., 2006) e a criação de mapas genéticos (Kijas et al., 1997).

Aliado à garantia da fidelidade genética, conferida pela utilização de plantas nucelares e qualidade fitossanitária, um protocolo completo de conservação *in vitro* deve levar em consideração a manutenção da viabilidade das plantas conservadas, o que permite o restabelecimento das mesmas em condições normais de cultivo.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo para conservação *in vitro* a partir do estudo do efeito do paclobutrazol sobre a morfogênese, a fim de determinar uma eficiente concentração desse inibidor na manutenção *in vitro* de germoplasma e do estabelecimento e conservação a longo prazo de plantas nucelares de porta-enxertos de citros, de forma a manter a viabilidade e a constituição genética dos acessos ao longo de sucessivos subcultivos, mediante confirmação por meio do uso de marcadores SSRs.

2. Materiais e Métodos

2.1 Experimento I: Estabelecimento de protocolo de conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com o uso de paclobutrazol

2.1.1 Determinação da concentração de paclobutrazol na conservação *in vitro* de germplasma de citros

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Ápices caulinares com 1 cm de tamanho, oriundos de plantas previamente cultivadas *in vitro* dos porta-enxertos híbridos produzidos na referida Instituição, o LCR x TR - 001, o LRF x (LCR x TR) - 005 e o HTR - 051, resultantes de cruzamentos envolvendo os limoeiros (*C. limonia* Osbeck) 'Cravo' (LCR) e 'Rugoso' da Flórida (LRF) e o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (TR), e dos citrandarins 'Índio' e 'Riverside', foram introduzidas no meio de cultura WPM (Lloyd; McCown, 1980), na sua composição basal e suplementado com paclobutrazol nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹; 0,4 mg L⁻¹; 0,6 mg L⁻¹; 0,8 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹. Todos os meios foram gelificados com 2,0 g L⁻¹ de Phytigel® e tiveram o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação das miniestacas apicais, os tubos foram mantidos em sala de crescimento durante o início do processo de enraizamento, com temperatura de 27 ± 1°C, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias, foram transferidas para sala de conservação, com temperatura de 22 ± 1°C, fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons de 20 μmol m⁻² s⁻¹, conforme condições de conservação *in vitro* de citros definida por Carvalho et al. (2016).

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 5 x 6 (5 genótipos e 6 concentrações de paclobutrazol), com 20 repetições. Após 6 meses de cultivo *in vitro*, as avaliações foram realizadas observando-se as seguintes variáveis: porcentagem de explantes responsivos; altura de parte aérea (cm); número de folhas verdes; número de folhas senescentes; número de miniestacas com 1 cm de comprimento, contendo ao menos uma gema; número de raízes e massas secas de parte aérea e de raízes (mg).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância pelo software R, versão 3.4 (R Core Team, 2016), utilizando o pacote ExpDes.pt. As médias das concentrações de paclobutrazol foram ajustadas para modelos de regressão polinomial e as médias dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores de contagem número de folhas verdes, número de folhas senescentes, número de miniestacas e número de raízes foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

2.1.2 Aclimatização

Para a avaliação da viabilidade das plantas obtidas *in vitro* após período de conservação foram aclimatizados em casa de vegetação 20 plantas obtidas *in vitro* dos porta-enxertos citrandarin 'Índio' e HTR - 051, selecionados com base nas suas características contrastantes de desenvolvimento (alto e baixo desenvolvimento, respectivamente) em meio WPM basal.

Decorridos 6 meses de cultivo *in vitro*, as plantas apresentavam uma altura média de 3,6 cm e foram transferidas para copos plásticos de 200 ml, contendo substrato comercial Vivatto® e mantidas em casa de vegetação, com temperatura de aproximadamente 27°C. Para estabelecimento de uma câmara úmida a fim de facilitar a adaptação às novas condições ambientais, as plantas foram cobertas com copos plásticos, os quais foram removidos após visualização do desenvolvimento das raízes na base ou na lateral dos copos. Após um período de 120 dias, foram coletados os dados de porcentagem de plantas sobreviventes e altura de parte aérea (cm).

2.2 Experimento II: Viabilidade e estabilidade genética de porta-enxertos nucleares de citros conservados e subcultivados *in vitro*

2.2.1 Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos nucleares de citros para conservação de germoplasma

Acessos da tangerineira 'Sunki Tropical' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], dos citrandarins 'San Diego', 'Índio', 'Riverside' e dos híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia, coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram introduzidos *in vitro* por meio de sementes, em meio de cultura RMAN (Grosser e Gmitter Junior, 1990), conforme resultado obtido em experimento anterior para germinação de sementes, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificado com 2,0 g L⁻¹ de Phytigel®, com pH 5,7. Após a inoculação das sementes, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Após 90 dias, foram selecionadas com base no vigor e características morfológicas da planta mãe (características inerentes a folha e ao pecíolo), 10 plântulas de cada acesso para detecção de indivíduos de origem nucelar, contrastados com seus respectivos parentais por meio do uso de 21 primers SSRs. Todas as plântulas de cada acesso que apresentaram as mesmas bandas do parental feminino foram consideradas nucleares e subcultivadas em meio de cultura Woody Plant Medium - WPM basal, conforme definido no experimento anterior. Essas plantas foram mantidas por 12 meses em condições de conservação *in vitro*, com temperatura de 22 ± 1°C, sob fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons de 20 μmol m⁻² s⁻¹, conforme condições definidas em estudos prévios (Carvalho et al., 2016). As plântulas que se diferenciaram dos parentais femininos foram excluídas do processo de multiplicação.

2.2.2 Viabilidade de plantas nucleares de citros conservadas *in vitro*

Para a avaliação da capacidade de regeneração após 1 ano na conservação *in vitro* as plantas dos porta-enxertos de citros conservados *in vitro*, foram submetidas a três novos subcultivos, com intervalo de 60 dias, a partir de miniestacas com um tamanho de aproximadamente 1 cm. Essas plantas foram crescidas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo o meio de cultura básico WPM, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado em 5,8. As mesmas foram mantidas em sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27°C ± 1°C. Ao final de cada subcultivo analisou-se o número de

segmentos nodais com 1 cm de tamanho, a altura da parte aérea, o número de folhas verdes e o número de raízes adventícias de cada planta.

A análise da viabilidade das plantas a partir dos dados de desenvolvimento decorreu em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial de 10 x 3 (10 genótipos e 3 subcultivos), com 12 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey (subcultivo) e Scott-Knott (genótipo), a 5% de significância utilizando o programa estatístico R, versão 3.4 (R Core Team, 2016), empregando o pacote ExpDes.pt.

2.2.3 Estabilidade genética de plantas nucelares de citros conservadas e subcultivadas *in vitro*

A análise da estabilidade genética foi conduzida em plantas dos diferentes porta-enxertos oriundas do terceiro subcultivo em meio de cultura WPM em sua composição basal, após conservação por 12 meses, a fim de analisar a ocorrência de variações genéticas.

As análises moleculares foram realizadas em quatro amostras por genótipo, sendo cada uma delas organizada em pools contendo material genético de cinco plantas. As amostras que não apresentaram conformidade de bandas com o parental foram individualizadas para novas análises.

As análises foram realizadas após a extração do DNA das folhas, baseado no protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) com modificações. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídio (10 mg mL^{-1}), visualizado em sistema de fotodocumentação Gel Logic Carestream 212 Pro Kodak e padronizado para a concentração de trabalho de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Foram testados 42 pares de iniciadores SSRs, onde apenas 21 pares apresentaram bandas nítidas nas amostras (Tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas utilizando um volume de $15 \mu\text{L}$, contendo 20 ng de DNA genômico, $1,5 \mu\text{L}$ 10X Buffer Taq, $1,5 \text{ mM}$ de MgCl_2 ; $100 \mu\text{M}$ de cada dNTPs; $0,2 \mu\text{M}$ de cada primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase, e preparadas em termociclador Veriti (Applied Biotechnologies) com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos, que consistiram em desnaturação a 94°C por

30 segundos, anelamento a 43°C - 58°C (a depender do primer), por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguido de uma extensão final em 72°C por 7 minutos. Os produtos das reações foram separados em gel de agarose 3% (p/v), durante 2,5 horas a 100 V e corado com brometo de etídio (10 mg mL⁻¹). O gel foi então visualizado em sistema de fotodocumentação Gel Logic Carestream 212 Pro Kodak. Os dados gerados foram avaliados quanto à presença e ausência de bandas e contrastadas com o perfil eletroforético dos parentais.

Tabela 1. Sequências de primers SSRs utilizados para identificação de indivíduos nucelares e zigóticos, e para detecção de variantes somaclonais nos porta-enxertos de citros.

Primer	Ta (°C)	Sequência forward (5'-3')	Sequência reverse (5'-3')
TAA1	57	GACAAGCATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGGCCCCATTAGC ¹
TAA52	40	GAT CTT GAC TGA ACT TAA AG	ATG TAT TGT GTT GAT AAC G ¹
TAA45	54	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTTGAGTTGGTGACG ¹
TAA3	57	AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC	GAGATGGGACTTGGTTCATCACG ¹
CAC19	51	ACAACCTTCAACAAACTTAGG	AAGACTTGGTGCGACAGG ¹
CAC33	53	GGT GAT GCT GCT ACT GAT GC	CAA TTG TGA ATT TGT GAT TCC G ¹
Ci02B07	43	CAG CTC AAC ATC AAA GG	TTG GAC AAC AGG ATG G ²
Ci06A05b	50	TCTCTGGTTGGTTTTGTGA	ATGATGAAAAGCAAGGGG ²
Ci08C05	47	TCCACAGATTGCCCATTA	CCCTAAAACCAAGTGACA ²
mCrCIR01E02	53	TGAATGGTACGGGAAATGC	CAGGGTCGGTGGAGAGGAT ²
mCrCIR06B05	43	GAACGATGGAATGAAGTG	ATGTTGATTACGAGACTTT ²
CMS-4	52	CCTCAAACCTTCTTCCAATCC	CTGTAAAGTACATGCATGTTGG ³
CMS-14	52	GGCTTCTCTTCTACTAGAACGG	ACGCCACGTAAGCAATAACC ³
CMS-19	54	GGCTTTTGCCCAATGATG	GTTGACCTAAAAGGGGGCAG ³
CMS-20	52	GGAGCATATAAGCATAAACACC	AGGAAAACGCATAAACCGTG ³
CMS-30	53	AACACCCCTTGGACGGAG	GCTGTTACACACACAACCC ³
Liu 1	58	CCCGTTAAAATTGTAACCCACAG	TTTATAATACGGAACGTTGGGAGG ⁴
Liu 2	58	TGTTTGTTACAAGGCAAGGCAAG	CTGCAGAGGAGCTTCCTTACTCAA ⁴
Liu 3	58	CGAAGAAGAATTGAAAGAGCCAGA	CAACAGATTTGTTACTGGAAGGGG ⁴
CT02	53	ACG GTG CGT TTT GAG GTA AG	TGA CTG TTG GAT TTG GGA TG ⁵
SPCC1	48	CTT CCA AGC TAA CGA TCC	CTG TCC TAT CCA TTA GAC ATG ⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Primers desenvolvidos por Kijas et al. (1997), Froelicher et al. (2008), Ahmed et al. (2003), Liu et al. (2013) e Barkley et al. (2006), respectivamente.

3. Resultados

3.1 Experimento I: Estabelecimento de protocolo de conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com o uso de paclobutrazol

3.1.1 Determinação da concentração de paclobutrazol na conservação *in vitro* de germoplasma de citros

Nas condições experimentais estudadas, obteve-se resposta *in vitro* em 99,67% dos explantes submetidos aos tratamentos com e sem paclobutrazol.

Houve efeito altamente significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$), pelo teste F da ANAVA para todas as variáveis estudadas nos fatores isolados e nas interações entre eles, com exceção da interação entre os fatores na variável massa seca de parte aérea, na qual o efeito significativo foi a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) (Tabela 2).

A média geral de número de folhas senescentes alcançada para esse experimento foi de 0,15, não havendo variação nos dados obtidos para essa variável, que apresentou em grande parte das parcelas ausência e em alguns casos apenas 1 folha senescente.

Tabela 2. Análise de variância de variáveis de crescimento dos híbridos LCR x TR - 001, LRF x (LCR x TR) - 005 e HTR - 051, e citrandarins 'Índio' e 'Riverside' submetidos a diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) em meio WPM.

Fator de Variação	GL	Quadrado Médio					
		APA	NFV	NM	NR	MSPA	MSR
Genótipo	4	14,63**	27,86**	1,80**	3,69**	2014,08**	396,38**
PBZ	5	12,74**	4,22**	1,59**	0,22**	1156,39**	37,84**
Genótipo x PBZ	20	1,24**	0,73**	0,12**	0,12**	193,01*	39,68**
Erro	568	0,35	0,13	0,04	0,06	116,90	9,04
Média		2,14	5,38	1,85	0,94	15,18	4,26
CV (%)		27,56	15,21	14,07	21,29	71,20	70,64

GL = grau de liberdade; APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NFS = número de folhas senescentes; NM = número de miniestacas; NR = número de raízes; MSPA = massa seca de parte aérea (mg); MSR = massa seca de raízes (mg).

**significativo ($P < 0,01$). *significativo ($P < 0,05$), ^{ns} não significativo ($P < 0,05$).

Nos modelos de equações lineares e polinomiais ajustados, conforme a Tabela 3, foram obtidos coeficientes de determinação (R^2) que variaram de 54,16% para

número de folhas verdes, na interação de paclobutrazol dentro do genótipo LCR x TR - 001, a 92,65% para massa seca de parte aérea na interação de paclobutrazol dentro do genótipo citrandarin 'Riverside'.

Tabela 3. Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2), doses ótimas (DO) e valores estimados (VE) de variáveis de desenvolvimento dos porta-enxertos LCR x TR - 001, LRF x (LCR x TR) - 005 e HTR - 051, e citrandarins 'Índio' (CI) e 'Riverside' (CR) em função de concentrações de paclobutrazol (PBZ) em meio WPM.

Fatores	Genótipo	Equação	R^2 (%)	DO	VE
Altura de parte aérea (cm)					
PBZ (Genótipo)	001	$\hat{y}^{**} = -0,8257x + 2,4929$	69,61	1,00	1,67
	CI	$\hat{y}^{**} = -0,9371x + 2,9452$	73,07	1,00	2,01
	CR	$\hat{y}^{**} = -0,5171x + 2,7252$	62,13	1,00	2,21
	005	$\hat{y}^{**} = -1,5286x + 2,7676$	75,90	1,00	1,24
	051	$\hat{y}^{**} = -0,7471x + 2,0152$	88,99	1,00	1,27
Número de folhas verdes					
PBZ (Genótipo)	001	$\hat{y}^{**} = 6,875x^2 - 9,2607x + 7,2429$	54,16	0,67	4,12
	CI	$\hat{y}^{**} = -2,7071x + 8,9119$	55,78	0,00	8,91
	CR	$\hat{y}^* = 4,5759x^2 - 5,9616x + 8,9696$	71,22	0,65	7,03
	005	$\hat{y}^{**} = 6,3661x^2 - 9,7189x + 6,4236$	82,67	0,76	2,71
	051	$\hat{y}^* = 3,1473x^2 - 4,8116x + 3,9268$	88,99	0,76	2,09
Número de miniestacas					
PBZ (Genótipo)	001	$\hat{y}^{**} = 2,2991x^2 - 3,342x + 2,7446$	79,88	0,73	1,53
	CI	$\hat{y}^{**} = -1,0714x + 2,719$	73,84	0,00	2,72
	CR	$\hat{y}^* = 1,3839x^2 - 2,1125x + 2,7321$	81,91	0,76	1,93
	005	$\hat{y}^{**} = -1,4143x + 2,3238$	89,28	0,00	2,32
	051	$\hat{y}^{**} = -0,6929x + 1,6881$	75,16	0,00	1,69
Número de raízes					
PBZ (Genótipo)	001	\hat{y}^{ns}	-	0,00	0,89 ¹
	CI	\hat{y}^{ns}	-	0,00	1,11 ¹
	CR	\hat{y}^{ns}	-	0,00	1,28 ¹
	005	\hat{y}^{ns}	-	0,00	1,10 ¹
	051	$\hat{y}^{**} = -0,3429x + 0,4881$	61,71	0,00	0,48
Massa seca de parte aérea (mg)					
PBZ (Genótipo)	001	\hat{y}^{ns}	-	0,00	13,23 ¹
	CI	$\hat{y}^{**} = -16,59x + 27,147$	73,20	0,00	27,15
	CR	$\hat{y}^{**} = 25,295x^2 - 32,582x + 23,768$	92,65	0,64	13,28
	005	$\hat{y}^{**} = -10,721x + 23,536$	86,25	0,00	23,54

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F da ANAVA. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. ¹valor baseado na média dos valores observados.

Considerando a redução na altura de planta uma característica favorável à conservação *in vitro*, a partir dos valores estimados pelas equações, pode-se observar que as menores alturas de parte aérea foram obtidas na dose de 1,00 mg L⁻¹ de PBZ, havendo aumento dos valores médios com a redução da concentração do paclobutrazol. Contudo, as diferenças observadas entre os tratamentos foram muito pequenas (Figura 1 e Tabela 3).

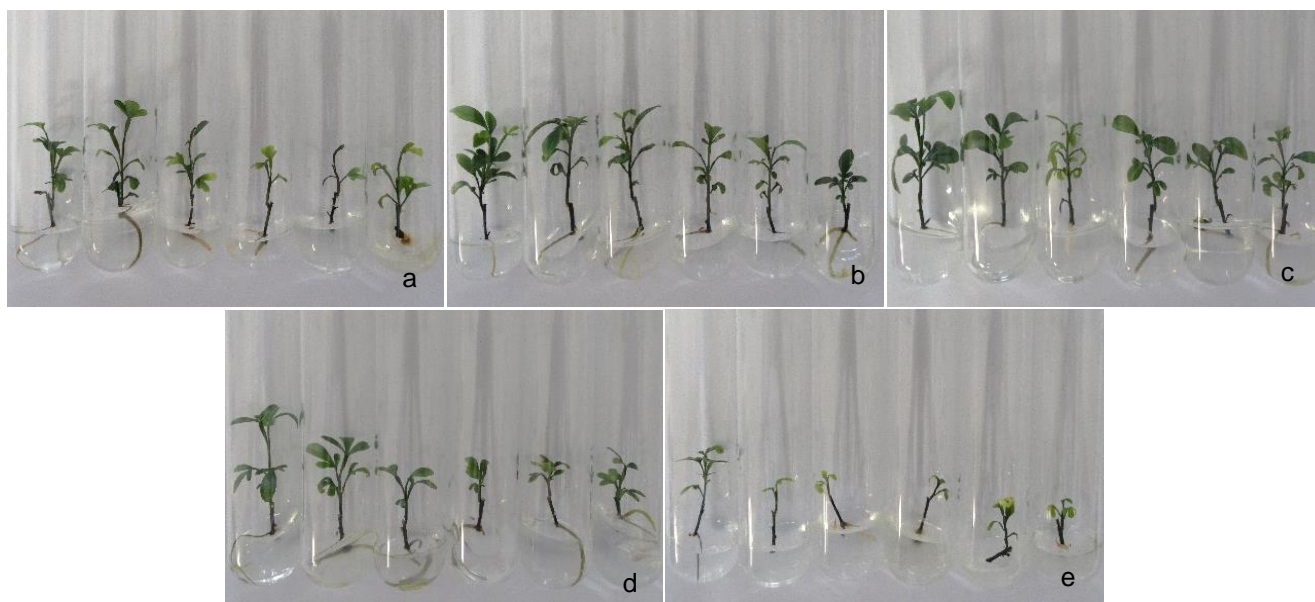


Figura 1. Plantas cítricas dos porta-enxertos LCR x TR - 001 (a), citrandarin 'Índio' (b), citrandarin 'Riverside' (c), LRF x (LCR x TR) - 005 (d) e HTR - 051 (e) aos 6 meses de cultivo, em meio WPM na sua composição basal e suplementado com concentrações de 0,2 mg L⁻¹; 0,4 mg L⁻¹; 0,6 mg L⁻¹; 0,8 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ de paclobutrazol (da esquerda para a direita)

As equações polinomiais ajustadas para as demais variáveis apresentaram na dose ótima os valores mínimos obtidos para cada genótipo. O número de folhas verdes

apresentou redução proporcional ao aumento da concentração de PBZ apenas para o genótipo citrandarin 'Índio'. Para os demais porta-enxertos essa redução ocorreu até as concentrações entre 0,65 mg L⁻¹ a 0,76 mg L⁻¹ de paclobutrazol, onde foram obtidos os menores valores (Tabela 3).

As maiores médias de número de miniestacas foram alcançadas na ausência de PBZ para os porta-enxertos citrandarin 'Índio', LRF x (LCR x TR) - 005 e HTR - 051, havendo redução dessas médias em função do aumento dos níveis de paclobutrazol. Para os genótipos LCR x TR - 001 e citrandarin 'Riverside' essa redução ocorreu até as concentrações entre 0,73 mg L⁻¹ e 0,76 mg L⁻¹, onde se obteve as menores médias (Tabela 3).

Para a variável número de raízes foi possível o ajuste de equação com efeito significativo apenas para o híbrido HTR - 051, sendo ajustado um modelo de equação linear (Tabela 3), apresentando redução no número de raízes com o aumento das concentrações de paclobutrazol.

O modelo de equação linear ajustado para os genótipos citrandarin 'Índio' e LRF x (LCR x TR) - 005 mostrou decréscimo em massa seca de parte aérea com o aumento das concentrações de paclobutrazol (Tabela 3). Para o genótipo citrandarin 'Riverside' esse decréscimo foi até a concentração de 0,64 mg L⁻¹ de PBZ, com ajuste de uma equação quadrática.

Na massa seca de raízes, apenas foi possível o ajuste de uma equação quadrática para o híbrido LRF x (LCR x TR) - 005, na qual obteve-se um baixo valor de coeficiente de determinação.

Em anuência com as variáveis de crescimento analisadas na Tabela 4, pode-se observar que os genótipos apresentaram comportamento variados entre si de acordo com a concentração de PBZ utilizada. As maiores alturas de planta foram observadas para o híbrido LRF x (LCR x TR) - 005 na ausência de PBZ, para o citrandarin 'Índio' na dose de 0,2 mg L⁻¹ a 0,8 mg L⁻¹, para ambos os citrandarins na concentração de 0,4 mg L⁻¹ e para o citrandarin 'Riverside' na concentração de 1,0 mg L⁻¹, sendo obtidos outros genótipos com médias que não diferiram estatisticamente das alcançadas por esses genótipos nas diferentes doses.

Tabela 4. Médias de variáveis de crescimento dos porta-enxertos LCR x TR - 001, citrandarins 'Índio' (CI) e 'Riverside' (CR), LRF x (LCR x TR) - 005 e HTR - 051 submetidos a diferentes concentrações de paclobutrazol.

Genótipo	Paclobutrazol (mg L ⁻¹)					
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Altura de parte aérea (cm)						
001	2,41 bc	2,55 ab	2,20 ab	1,83 bc	1,58 c	1,91 ab
CI	2,85 ab	2,95 a	2,36 a	2,40 a	2,50 a	1,80 bc
CR	2,87 ab	2,56 ab	2,49 a	2,30 ab	2,15 ab	2,43 a
005	3,24 a	2,19 bc	1,84 bc	1,61 c	1,70 bc	1,44 bc
051	2,13 c	1,86 c	1,55 c	1,54 c	1,42 c	1,35 c
Número de folhas verdes						
001	6,35 b	7,10 b	4,80 b	4,00 b	2,80 bc	5,75 b
CI	8,90 a	9,10 a	6,55 a	7,15 a	8,00 a	5,65 b
CR	8,80 a	7,95 ab	8,00 a	6,75 a	6,55 a	7,95 a
005	7,00 b	3,79 c	3,45 c	3,10 b	3,50 b	2,55 c
051	4,10 c	2,70 d	2,75 c	2,05 c	2,30 c	2,15 c
Número de miniestacas						
001	2,55 a	2,45 ab	1,90 ab	1,45 bc	1,25 c	1,90 a
CI	2,55 a	2,85 a	2,05 ab	2,05 a	2,10 a	1,50 ab
CR	2,80 a	2,15 b	2,30 a	2,00 a	1,80 ab	2,05 a
005	2,55 a	1,95 b	1,60 bc	1,25 c	1,35 bc	1,00 b
051	1,90 b	1,40 c	1,30 c	1,15 c	1,25 c	1,05 b
Número de raízes						
001	1,05 a	0,85 a	1,20 a	0,90 a	0,40 b	0,95 ab
CI	1,20 a	0,90 a	1,35 a	1,25 a	1,05 a	0,90 b
CR	1,10 a	1,10 a	1,40 a	1,35 a	1,25 a	1,47 a
005	1,20 a	1,26 a	1,20 a	0,85 a	1,15 a	0,95 ab
051	0,60 b	0,25 b	0,35 b	0,30 b	0,30 b	0,10 c
Massa seca de parte aérea (mg)						
001	15,50 ab	15,85 bc	14,35 ab	11,24 a	8,93 a	13,50 a
CI	23,22 a	30,87 a	18,77 a	15,74 a	13,47 a	11,04 a
CR	24,67 a	16,70 bc	14,91 ab	13,30 a	15,30 a	15,63 a
005	23,52 a	21,36 b	21,26 a	14,52 a	14,29 a	14,10 a
051	11,36 b	9,61 c	8,52 b	7,59 a	8,07 a	8,63 a
Massa seca de raízes (mg)						
001	2,26 a	4,66 b	3,05 c	3,29 b	2,24 b	4,07 b
CI	3,57 a	2,51 b	3,84 c	2,97 b	2,43 b	2,12 b
CR	3,11 a	3,08 b	2,99 c	2,50 b	3,90 b	2,59 b

005	4,29 a	9,84 a	7,27 a	7,94 a	8,67 a	7,85 a
051	2,21 a	3,88 b	3,65 b	4,10 b	3,00 b	2,63 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O número de folhas verdes foi superior para os citrandarins em todas as doses, com exceção da dose de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o citrandarin 'Índio', tendo o citrandarin 'Riverside' apresentado média estatisticamente igual a observada para o híbrido LCR x TR - 001. O citrandarin 'Índio' mostrou um comportamento semelhante ao 'Riverside', para o número de folhas verdes, a exceção da concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PBZ, na qual obteve-se média inferior (Tabela 4).

Em relação ao número de miniestacas, o híbrido HTR - 051 apresentou no meio WPM, sem a adição de PBZ, a menor média (1,90). Na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ o porta-enxerto citrandarin 'Índio' proporcionou a média mais elevada, que não diferiu estatisticamente da obtida para o LCR x TR - 001 (2,85 e 2,45 segmentos, respectivamente). Nas concentrações de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, o LCR x TR - 001 e os citrandarins apresentaram números superiores de miniestacas, enquanto nas doses de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de PBZ apenas os citrandarins se destacaram (Tabela 4).

O híbrido HTR - 051 produziu médias inferiores do número de raízes em todas as doses de PBZ estudadas, enquanto que os demais genótipos apresentaram médias estatisticamente superiores em todas as concentrações, com exceção do LCR x HTR - 001 na concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 4).

Os menores valores de massa seca de parte aérea foram observados no híbrido HTR - 051, os quais não diferiram estatisticamente dos demais porta-enxertos nos níveis de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$, $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de paclobutrazol. Na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de PBZ apenas o citrandarin 'Índio' mostrou média superior estatisticamente aos outros porta-enxertos (Tabela 4).

3.1.2 Aclimatização

Assim como observado *in vitro*, o citrandarin 'Índio' apresentou desenvolvimento superior em relação ao híbrido de trifoliata HTR - 051. As plantas oriundas do cultivo *in vitro* em meio WPM na sua composição basal apresentaram altura média de 9,30 cm e

mostraram 100% de sobrevivência após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação, sendo importante ressaltar que mesmo aquelas com pouca ou nenhuma formação de raízes (3%) sobreviveram e desenvolveram sistema radicular (Figura 2).

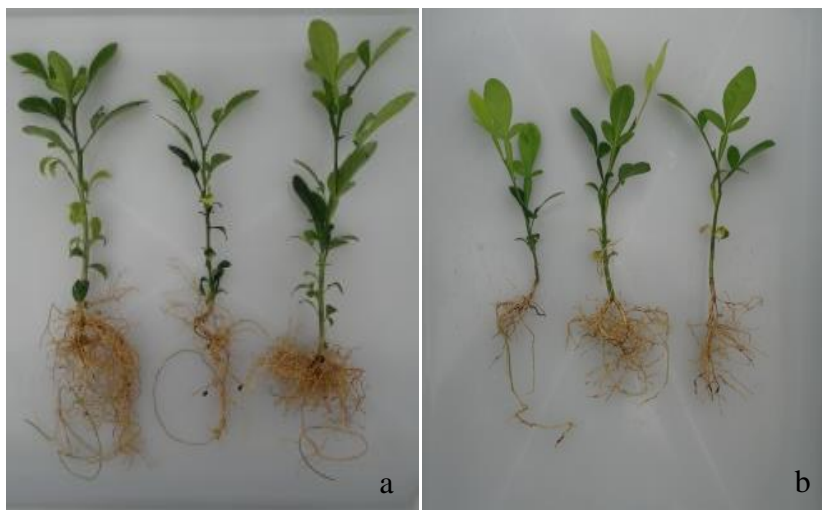


Figura 2. Plantas do porta-enxerto citrandarin 'Índio' (a) e HTR - 051 (b), aclimatizadas em casa de vegetação drante 120 dias, após cultivo *in vitro* em meio WPM na sua formulação basal.

3.2 Experimento II: Viabilidade e estabilidade genética de porta-enxertos nucelares de citros conservados e subcultivados *in vitro*

3.2.1 Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos nucelares de citros para conservação de germoplasma

Indivíduos zigóticos foram determinados pela presença de bandas amplificadas em 6 dos 21 iniciadores analisados. Dentre as 100 plântulas selecionadas com base nas características fenotípicas da planta mãe, foram identificados apenas dois indivíduos zigóticos para o porta-enxerto HTR - 051. Os demais genótipos apresentaram 100% de indivíduos nucelares, ou seja, indivíduos idênticos à planta mãe.

Os primers mCrCIR06B05, CAC19, CMS-14 e TAA1 revelaram padrões de bandas diferenciados para apenas um dos indivíduos do híbrido HTR - 051 em comparação com o parental (Figura 3a-3d), enquanto os primers CMS-19 e CMS-30 confirmaram esse resultado para os dois indivíduos zigóticos encontrados (Figura 3e e 3f).

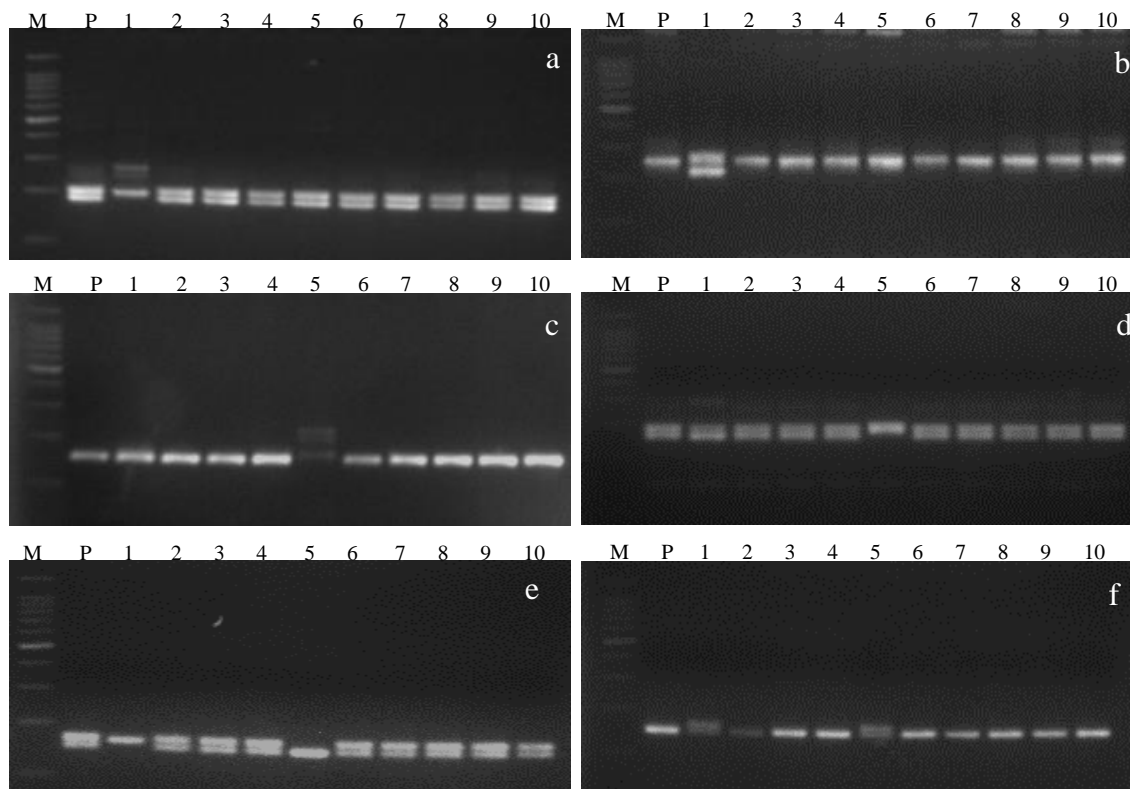


Figura 3. Plântulas zigóticas identificadas no indivíduo 1 pelos primers mCrCIR06B05 (a) e CAC19 (b), no indivíduo 5 pelos primers CMS-14 (c) e TAA1 (d) e em ambos os indivíduos do porta-enxerto HTR - 051 pelos primers CMS-19 (e) e CMS-30 (f) a partir do uso de marcadores SSRs. M = marcador de 100pb; P = parental feminino do HTR - 051; 1 a 10 = indivíduos selecionados do HTR - 051.

3.2.2 Viabilidade de plantas nucleares de citros conservadas *in vitro*

Após o período de 12 meses da conservação *in vitro* sob as mesmas condições de crescimento reduzido, os porta-enxertos de citros apresentaram variações entre si nas respostas de crescimento. Os porta-enxertos citrandarins 'Indio' e 'Riverside' e os híbridos LRF (LCR x TR) - 005, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia

apresentaram as maiores médias de altura de planta e número de folhas verdes, assim como ocorreu para as variáveis número de miniestacas, a exceção do citrandarin 'Índio', e número de raízes, com exceção do híbrido TSK x TRBK - Colômbia (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância e médias das variáveis altura de parte aérea, em cm (APA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM) e número de raízes (NR) de porta- enxertos de citros após 12 mese de conservação *in vitro* em meio WPM.

Fator de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio				
		APA	NFV	NFS	NM	NR
Genótipo	9	1,71 **	253,20 **	2,15 **	49,50 **	0,35 **
Erro	94	0,17	17,46	0,29	4,34	0,06
Média		5,9	11,89	1,55	5,64	1,57
CV (%)		16,7	35,13	42,47	36,93	17,57
Genótipo		APA	NFV	NFS	NM	NR
Citrandarin 'San Diego'		4,17 b	6,67 c	2,00 b	3,89 b	1,22 b
Citrandarin 'Índio'		5,71 a	15,17 a	0,83 a	5,08 b	2,25 a
Citrandarin 'Riverside'		7,03 a	16,82 a	0,45 a	7,09 a	2,09 a
LRF (LCR x TR) - 005		9,09 a	16,00 a	1,00 a	8,82 a	2,18 a
HTR - 051		4,79 b	6,09 c	4,09 c	4,36 b	0,91 b
TSKC x CTSW - 028		3,83 b	10,25 b	0,58 a	3,33 b	1,00 b
HTR - 069		3,70 b	5,42 c	0,33 a	3,42 b	1,08 b
TSKC x (LCR x TR) - 059		7,35 a	14,25 a	3,00 c	7,17 a	1,92 a
TSK x TRBK - Colômbia		7,90 a	16,92 a	2,08 b	8,17 a	1,50 b
Tangerineira 'Sunki Tropical'		2,25 c	2,30 c	4,50 c	1,50 c	1,00 b

** significativo ($P < 0,01$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Os porta-enxertos citrandarins 'Índio' e 'Riverside' e os híbridos LRF (LCR x TR) - 005, TSKC x CTSW - 028 e HTR - 069 apresentaram as menores médias número de folhas senescentes, sendo essas consideradas superiores por se tratar de uma característica indesejável ao cultivo *in vitro* (Tabela 5).

Médias superiores para número de miniestacas foram obtidas pelos genótipos citrandarin 'Riverside', LRF (LCR x TR) - 005, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia (Tabela 5).

Para o número de raízes se destacaram os porta-enxertos citrandarins 'Índio' e 'Riverside' e os híbridos LRF (LCR x TR) -005 e TSKC x (LCR x TR) - 059, com as maiores médias em relação aos demais genótipos.

Quanto aos subcultivos dos porta-enxertos de citros em meio WPM após 12 meses de conservação *in vitro*, houve significância para os fatores subcultivo e genótipo nas diferentes variáveis, bem como, para todas as interações analisadas entre esses fatores, revelando influência dos mesmos nas variadas respostas obtidas (Tabela 6).

Não houve grandes variações para o número de folhas senescentes, que apresentou média geral de 0,04, existindo na grande maioria das parcelas ausência de folhas senescentes.

Tabela 6. Análise de variância de variáveis de crescimento dos porta-enxertos citrandarins 'San Diego', 'Índio' e 'Riverside', híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia e tangerineira 'Sunki Tropical' subcultivados por três ciclos em meio WPM, com intervalo de 60 dias.

Fator de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio			
		APA	NFV	NM	NR
Subcultivo	2	3,93 **	1,43 **	0,84 **	1,66 **
Genótipo	9	3,49 **	2,45 **	0,51 **	0,40 **
Subcultivo x Genótipo	18	0,43 *	0,21 **	0,08 *	0,21 **
Erro	279	0,14	0,09	0,02	0,08
Média		2,09	3,83	1,71	1,02
CV (%)		18,04	15,11	10,71	24,46

**significativo (P<0,01), *significativo (P<0,05). APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NM = número de miniestacas e NR = número de raízes.

Os porta-enxertos apresentaram desenvolvimento variável entre si nos diferentes subcultivos, alcançando maiores altura de parte aérea no primeiro subcultivo os citrandarins 'San Diego', 'Índio' e 'Riverside' e os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia; no segundo subcultivo apenas o LRF (LCR x TR) - 005 e no terceiro período de cultivo o Citrandarin 'Riverside' (Tabela 7).

Tabela 7. Médias de variáveis de crescimento dos porta-enxertos citrandarins ‘San Diego’, ‘Índio’ e ‘Riverside’, híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, TSKC x CTSW - 028, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia e tangerineira ‘Sunki Tropical’ subcultivados por três ciclos em meio WPM, com intervalo de 60 dias.

Genótipos	1° Subcultivo	2° Subcultivo	3° Subcultivo
	Altura de parte aérea		
Citrandarin ‘San Diego’	2,33 aA	1,70 cB	1,93 cAB
Citrandarin ‘Índio’	2,62 aA	2,01 bB	2,43 bA
Citrandarin ‘Riverside’	2,61 aA	2,16 bB	2,95 aA
LRF (LCR x TR) - 005	2,49 aA	2,45 aA	2,68 bA
HTR - 051	2,23 aA	1,72 cB	1,83 cB
TSKC x CTSW - 028	2,00 bA	1,75 cAB	1,57dB
HTR - 069	1,75 bA	1,54 cA	1,46 dA
TSKC x (LCR x TR) - 059	2,35 aA	1,99 bAB	1,95 cB
TSK x TRBK - Colômbia	2,27 aA	1,83 cB	2,07 cA
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	1,95 bA	1,70 cA	1,20 dA
	Número de folhas verdes		
Citrandarin ‘San Diego’	3,90 aA	1,80 dB	2,84 bAB
Citrandarin ‘Índio’	4,83 aA	3,50 bB	5,17 aA
Citrandarin ‘Riverside’	5,08 aA	4,92 aA	5,92 aA
LRF (LCR x TR) - 005	4,64 aA	4,82 aA	5,45 aA
HTR - 051	2,92 bA	2,42 cA	2,90 bA
TSKC x CTSW - 028	2,50 bB	2,58 cAB	3,58 bA
HTR - 069	2,73 bA	1,54 dB	2,29 cAB
TSKC x (LCR x TR) - 059	4,58 aA	5,00 aA	4,67 aA
TSK x TRBK - Colômbia	4,25 aA	3,08 cA	4,17 aA
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	6,00 aA	5,00 aAB	4,00 aB
	Número de miniestacas		
Citrandarin ‘San Diego’	2,10 aA	1,20 bB	1,00 cB
Citrandarin ‘Índio’	2,17 aA	1,67 aB	2,25 aA
Citrandarin ‘Riverside’	2,25 aAB	1,83 aB	2,50 aA
LRF (LCR x TR) - 005	2,09 aA	2,00 aA	2,37 aA
HTR - 051	1,92 aA	1,25 bB	1,30 cB
TSKC x CTSW - 028	1,75 aA	1,25 bB	1,00 cB
HTR - 069	1,18 bA	1,00 bA	1,14 cA
TSKC x (LCR x TR) - 059	2,17 aA	1,50 aB	1,67 bB
TSK x TRBK - Colômbia	2,08 aA	1,25 bB	1,83 bA
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	1,50 bA	1,00 bA	1,00 cA
	Número de raízes		
Citrandarin ‘San Diego’	1,60 aA	0,60 bB	0,88 bAB
Citrandarin ‘Índio’	1,08 aB	1,08 aB	2,33 aA

Citrandarin 'Riverside'	0,75 bB	1,17 aAB	1,75 aA
LRF (LCR x TR) - 005	1,00 aA	1,27 aA	1,27 bA
HTR - 051	0,58 bA	0,75 bA	1,20 bA
TSKC x CTSW - 028	0,33 bB	0,42 bB	1,08 bA
HTR - 069	0,63 bA	0,72 bA	1,00 bA
TSKC x (LCR x TR) - 059	0,50 bB	1,58 aA	1,58 aA
TSK x TRBK - Colômbia	0,58 bA	1,00 aA	0,92 bA
Tangerineira 'Sunki Tropical'	0,50 bA	1,00 aA	0,50 cA

A média de número de folhas verdes foi superior para os genótipos citrandarin 'Riverside', híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, TSKC x (LCR x TR) - 059 e tangerineira 'Sunki Tropical' nos três períodos de cultivo; para o citrandarin 'Índio e TSK x TRBK - Colômbia nos primeiro e terceiro subcultivos e para o citrandarin 'San Diego' apenas no primeiro cultivo, tendo os demais porta-enxertos apresentado médias inferiores em todos os períodos (Tabela 7).

Apenas o HTR - 069 e a tangerineira 'Sunki Tropical' apresentaram número de miniestacas inferiores no primeiro subcultivo. Já no segundo subcultivo somente os citrandarins 'Índio' e 'Riverside', e os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e TSKC x (LCR x TR) - 059 foram superiores aos demais genótipos, e no último período de cultivo foram os citrandarins 'Índio', 'Riverside' e o híbrido LRF x (LCR x TR) - 005 a se destacarem nessa variável (Tabela 7).

O número de raízes foi elevado para o citrandarin 'Índio' nos três períodos de cultivo; para o citrandarin 'Riverside', e os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e TSKC x (LCR x TR) - 059 em dois dos subcultivos realizados, enquanto os demais genótipos apresentaram médias elevadas em apenas um ou nenhum dos subcultivos (Tabela 7).

Os genótipos que apresentaram diferenças estatísticas na altura de parte aérea ao longo dos períodos de cultivo (70%), alcançaram no primeiro subcultivo após a conservação as maiores médias. No segundo período apenas 2 desses genótipos mantiveram médias estatisticamente iguais, enquanto no terceiro período somente três dos genótipos apresentaram médias inferiores, tendo os demais porta-enxertos médias iguais ou superiores as observadas no segundo subcultivo (Tabela 7).

Metade dos porta-enxertos apresentaram variação no número de folhas verdes ao longo dos subcultivos, sendo que para o primeiro e terceiro subcultivo 80% desses

genótipos obtiveram médias superiores ou que não diferiram estatisticamente dos maiores valores alcançados nos subcultivos, e apenas 40% obtiveram médias estatísticas iguais as superiores para o segundo subcultivo (Tabela 7).

Para o número de miniestacas no primeiro subcultivo foram alcançadas médias superiores para os sete genótipos que diferiram entre si nos períodos de cultivo, sendo que para o citrandarin 'Riverside' essa média não diferiu estatisticamente da menor média obtida no segundo subcultivo, período no qual também se observou médias inferiores para os seis demais porta-enxertos, já no terceiro subcultivo houve um incremento nas médias, com três desses genótipos apresentando médias estatísticas superiores (Tabela 7).

O número de raízes apresentou comportamento diferente para 50% dos porta-enxertos estudados. No primeiro subcultivo apenas um deles alcançou média superior, no terceiro período de cultivo observou-se 1 genótipo com média superior e 1 com média estatística igual a média superior, enquanto no terceiro subcultivo, todos os genótipos alcançaram médias superiores, apesar da média obtida pelo citrandarin 'San Diego' não diferir da menor média, que foi observada no segundo período (Tabela 7).

3.2.3 Estabilidade genética de plantas nucelares de citros conservadas e subcultivadas *in vitro*

As plantas que passaram por quatro períodos de cultivos, sendo três subcultivos realizados em meio WPM em sua composição basal, após 12 meses de conservação *in vitro* não apresentaram variação de bandas com seus respectivos parentais. Por apresentar um reduzido número de folhas, o híbrido HTR - 051 não foi incluso nas análises moleculares (Figura 4).

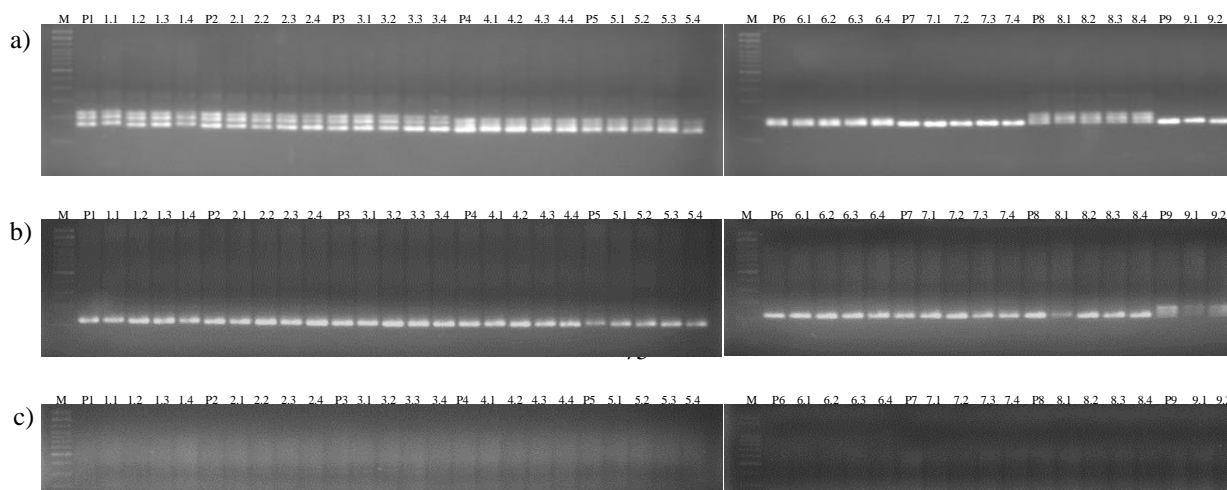


Figura 4. Ausência de polimorfismo revelado pelo uso dos marcadores SSRs TAA1 (a), Ci06A05b (b) e CAC33 (c), nas amostras em pools dos porta-enxertos de citros citrandarins ‘San Diego’ (1.1 a 1.4), ‘Índio’ (2.1 a 2.4) e ‘Riverside’ (3.1 a 3.4), LRF (LCR x TR) - 005 (4.1 a 4.4), HTR - 051 (5.1 a 5.4), TSKC x CTSW - 028 (6.1 a 6.4), TSKC x (LCR x TR) - 059 (7.1 a 7.4), TSK x TRBK - Colômbia (8.1 a 8.4) e tangerineira ‘Sunki Tropical’ (9.1 e 9.2), submetidos a três subcultivos, após 12 meses de conservação *in vitro*, em relação ao seu respectivo parental (P). M = marcador de 100pb; P = parental.

4. Discussão

4.1 Experimento I: Estabelecimento de protocolo de conservação *in vitro* de porta-enxertos de citros com o uso de paclobutrazol

A atuação do paclobutrazol na inibição da síntese de giberelina reduz o alongamento celular, o que induz a um menor crescimento da parte aérea, como foi observado nesse estudo, em porta-enxertos de citros, sendo esse efeito, apesar de mínimo, intensificado à medida que ocorreu aumento nas concentrações do inibidor (Tabela 3). A ação do paclobutrazol no retardamento do crescimento em plantas tem tido grande aplicação na conservação *in vitro* de germoplasma e diversos estudos reportam a atuação do referido redutor sobre o crescimento vegetal em várias espécies. Gimenes et al. (2018) observaram redução no comprimento de parte aérea, de acordo com o incremento de 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹ e 1,5 mg L⁻¹ de PBZ em orquídea (*Zygopetalum crinitum* Lodd.). Roussos et al. (2016), trabalhando com concentrações de 0,01 mg L⁻¹; 0,1 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ de PBZ, constataram que a adição desse retardante ao meio de cultura exibiu um forte efeito de supressão no alongamento de entrenós em castanheiro, sem afetar a formação de nós. Bello-Bello et al. (2015) observaram que tratamentos com 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ e 3 mg L⁻¹ de PBZ reduziram o crescimento *in vitro* de baunilha (*Vanilla planifolia* Jacks.). Padilla et al. (2015) notaram

que concentrações de 0,1 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ afetaram significativamente a altura da parte aérea em damasco (*Prunus armeniaca* L.), havendo drástica redução do crescimento conforme o aumento da dose de paclobutrazol. Deswiniyanti et al. (2018), aplicando paclobutrazol *in vitro* em *Vanda tricolor* Lind., também observaram que quanto maior foi sua concentração menor o crescimento das plantas, em níveis variando entre 2 mg L⁻¹ e 7 mg L⁻¹.

Para determinação da concentração de PBZ com fins de conservação *in vitro* de germoplasma é importante analisar ainda o seu efeito nas diversas variáveis de crescimento da planta, de forma que, a redução da altura, por exemplo, ocorra sem prejuízo do vigor da mesma e da sua regeneração completa. O número de folhas verdes, atributo importante na determinação do vigor, é também afetado com o aumento da concentração de PBZ (Tabela 3). Esse fato também foi constatado por outros autores, utilizando concentrações ainda mais elevadas do produto, como Bello-Bello et al. (2015), em baunilha, usando de 1 mg L⁻¹ a 3 mg L⁻¹; Padilla et al. (2015), em todas as concentrações de PBZ estudadas (0,1 mg L⁻¹; 1 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹), quando avaliaram o número de folhas em damasco, e por Wu et al. (2018) que relatam a existência de poucas folhas em lírio oriental (*Lilium speciosum* Thunb.) quando se adicionou PBZ no meio de cultra em concentrações de 1,47 mg L⁻¹ e 14,70 mg L⁻¹.

A redução obtida na massa seca de parte aérea é uma consequência da diminuição no crescimento da planta, assim como a redução no número de miniestacas. Com o aumento na concentração de PBZ, esses tornam-se resultados esperados, uma vez que, com uma altura de planta reduzida, menor será o número de miniestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento que essa planta irá fornecer, em uma nova micropropagação, ainda que não haja redução do número de nós, segundo observado por Roussos et al. (2016). Esses fatores são proeminentes na tomada do crescimento normal da planta, quando se objetiva a micropropagação.

As diferentes respostas apresentadas pelos porta-enxertos já eram esperadas, uma vez que cada genótipo possui características genéticas próprias, a exemplo do híbrido HTR - 051, que apresenta a qualidade de porte reduzido (Soares et al., 2015), o que irá resultar em comportamento variado entre eles, mesmo estando submetidos às mesmas condições ambientais de conservação *in vitro*. Esse fato é corroborado por

Grattapaglia e Machado (1998), quando afirmam que as condições para o desenvolvimento *in vitro* são variáveis entre os genótipos. Assim, o estabelecimento de um protocolo para uma espécie deve considerar respostas favoráveis que englobem o maior número de genótipos possível, a fim de que o mínimo ou nenhum ajuste seja necessário, o que facilita o controle do crescimento *in vitro* das plantas.

De acordo com os resultados observados neste estudo, de modo geral, todas as concentrações de PBZ utilizadas promoveram redução no crescimento dos genótipos de citros estudados. Contudo, apesar de se observar uma redução na altura das plantas dos porta-enxertos de citros, os resultados não evidenciaram vantagens em relação ao meio base, considerando as demais variáveis de crescimento, uma vez que a redução da altura foi baixa para um período de seis meses e essa redução foi condicionada a um baixo desenvolvimento do número de folhas verdes, número de miniestacas e de massas secas de parte aérea e raiz, o que se intensifica com o aumento da dose de PBZ. Essas características estão diretamente relacionadas com o vigor da planta, fator a se considerar na conservação *in vitro* de germoplasma, pois como afirma Canto et al. (2004), envolve a necessidade de realização de subcultivos mais frequentes, a fim de recuperar o vigor e não comprometer a capacidade de regeneração da planta.

Em citros não existem estudos acerca da concentração ideal de paclobutrazol para aplicação na conservação *in vitro*, uma vez que ainda não há bancos de germoplasma *in vitro* da cultura atuando como cópia de segurança e facilitando a disponibilização desses recursos para o melhoramento genético. A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui uma coleção *in vitro* que inclui acessos do gênero citros e afins, mas que conta apenas com condições de luminosidade ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) reduzidas ao metabolismo lento (Carvalho et al 2016). Associado a essas condições de temperatura, a adição do PBZ como redutor de crescimento, poderia tornar mais eficiente o processo de conservação *in vitro* dos citros, aumentando ainda mais o intervalo entre os subcultivos e, conseqüentemente reduzindo o custo com materiais e mão de obra. Porém, as doses de paclobutrazol estudadas não revelaram respostas eficientes, sendo dessa forma a não utilização do PBZ ainda o mais indicado para conservação *in vitro* dos porta-enxertos de citros analisados.

Além da manutenção do vigor das plantas durante a conservação *in vitro* é interessante que o tratamento ao qual foram condicionadas não comprometa o desenvolvimento das mudas obtidas, num posterior procedimento de aclimatização. Esse processo é geralmente prejudicado por altas taxas de mortalidade das plantas devido à perda excessiva de água e à fragilidade das raízes (Gimenes et al., 2018). No entanto, no caso dos citros, como observado neste estudo, não houve perdas de plantas durante o processo de aclimatização em casa de vegetação, tendo os genótipos apresentado 100% de sobrevivência.

4.2 Experimento II: Viabilidade e estabilidade genética de porta-enxertos nucelares de citros conservados e subcultivados *in vitro*

4.2.1 Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos nucelares de citros para conservação de germoplasma

Os citros são comumente estabelecidos *in vitro* por meio de sementes e, por se tratar de uma espécie poliembrionica, tende a manter a germinação dos embriões nucelares, ou seja, dos embriões com constituição genética idêntica à planta mãe, pela maior competição e capacidade de germinação destes em detrimento do embrião zigótico, conforme demonstra Zhu et al. (2013). No entanto, pode haver ainda a germinação de indivíduos híbridos, o que não é desejável quando se almeja a conservação de genótipos de interesse. A ocorrência desses indivíduos pode ser constatada por meio de ferramentas moleculares. Nesse aspecto, este estudo confirmou a eficiência dos marcadores SSRs na identificação de indivíduos nucelares, corroborando com resultados obtidos em trabalhos como os desenvolvidos por Weiler et al. (2010), Yildiz et al. (2013) e Woo et al. (2019) para identificação de híbridos em cruzamentos.

No presente estudo, a maioria dos porta-enxertos de citros introduzidos *in vitro* por meio de sementes não revelaram a presença de indivíduos zigóticos nas plântulas selecionadas, indicando que o método de classificação *in vitro* por meio de indivíduos nucelares selecionados pode ser útil na conservação desses genótipos, além de constituir uma alternativa viável para propagação em larga escala de porta-enxertos

com garantia da fidelidade genética. A exceção ocorreu apenas para o híbrido de trifoliata HTR - 051, no qual houve 20% de embriões zigóticos dentre as plântulas selecionadas. De acordo com Soares Filho et al. (2000), a frequência de híbridos é inversamente relativa à taxa de poliembrião. No entanto, Rodrigues et al. (2015) constataram, para o híbrido TSKC (LCR x TR) - 059, uma taxa de poliembrião inferior à encontrada para o HTR - 051 (73,33 e 87,50, respectivamente), o qual, por sua vez, não apresentou indivíduos zigóticos dentre as plântulas selecionadas.

4.2.2 Viabilidade de plantas nucelares de citros conservadas *in vitro*

Após período de 12 meses de conservação *in vitro* sobre as condições estabelecida, metade dos porta-enxertos apresentaram desenvolvimento baixo em comparação aos demais, podendo permanecer por tempo ainda mais elevado em relação a esses, sem a necessidade de subcultivos. Essas variações nas respostas observadas pelos porta-enxertos podem refletir na necessidade de adaptações no protocolo de conservação para os genótipos com maior desenvolvimento. Outro fator que pode ser utilizado para a conservação *in vitro* é a redução da concentração do meio de cultura. No entanto, no caso do meio WPM, definido previamente como o mais adequado para conservação desses porta-enxertos são necessários mais estudos, uma vez que, de acordo com Rocha et al. (2007), se trata de um meio com concentrações de nutrientes já reduzidas conforme adaptações ao desenvolvimento da espécie.

Os diferentes porta-enxertos conservados *in vitro* apresentaram respostas variadas de desenvolvimento nos diferentes subcultivos efetuados, resultado que era esperado uma vez que apresentam constituições genéticas diferentes. É importante ressaltar que o híbrido HTR - 069 apresentou média de número de folhas verdes inferior aos demais genótipos, principalmente no terceiro subcultivo, o que limitou a análise molecular a partir de plantas obtidas *in vitro* para esse genótipo. Esse fato deve-se à características genéticas particulares de alguns híbridos trifoliatas que apresentam porte reduzido e baixo vigor em campo (SOARES et al., 2015), corroborando os resultados encontrados por Salis et al. (2017).

A tangerineira 'Sunki Tropical' também se distinguiu dos demais porta-enxertos, mantendo um baixo percentual de explantes sobreviventes ao longo dos subcultivos

(20%). Essa característica foi igualmente observada *ex vivo* em estudos anteriores, como o desenvolvido por Oliveira et al. (2014), ao analisarem o crescimento de 15 porta-enxertos de citros propagados por meio de estaquia. Os dados sugerem que um protocolo específico deve ser desenvolvido para a regeneração *in vitro* da tangerineira ‘Sunki Tropical’ a partir de miniestacas, a fim de se obter sucesso na sua conservação e propagação em meio de cultura, uma vez que se trata de um relevante porta-enxerto para a citricultura.

Os dados das variáveis observados ao longo dos subcultivos revelam para algumas características e genótipos uma redução no desenvolvimento, mas que tende a ser superada ao longo dos períodos de cultivos, como também foi observado no estudo anterior de definições de meios de cultura na conservação *in vitro*. Dessa forma, os resultados observados implicam que o protocolo para conservação mediante condições ambientais já estabelecidas por Carvalho et al. (2016) e o uso do meio WPM em sua composição basal, conforme anteriormente definido no mesmo estudo citado acima pode ser utilizado com sucesso na conservação *in vitro* dos porta-enxertos de citros estudados, empregando-se normalmente o processo de micropropagação e/ou aclimatização de mudas, sem danos ao seu desenvolvimento.

4.2.3 Estabilidade genética de plantas nucelares de citros conservadas e subcultivadas *in vitro*

No cultivo *in vitro* a ocorrência de variações somaclonais é um fato que pode ser comum a depender da espécie e das condições de cultivo (Ziv, 1991; Yang et al., 1999), o que pode constituir um sério problema na manutenção da integridade genética da planta regenerada (Siragusa et al., 2007). Esse fato requer uma análise da confiabilidade do protocolo a ser utilizado quando se almeja conservar clones.

O subcultivo excessivo é também um fator a se considerar ao micropropagar mudas *in vitro*, devido ao risco de variações somaclonais. Goswami et al. (2013) relatam que além da exposição prolongada a reguladores de crescimento, ciclos sucessivos de subcultivos podem acarretar em alterações genéticas, mesmo sendo o método de regeneração de brotos menos propenso a essas variações. Os mesmos autores não identificaram alterações genéticas em dois ciclos de multiplicação de *Citrus*

limon L. cv. Kaghzi Kalan com o uso de marcadores RAPD. Corroborando com esse resultado, o presente estudo, a partir do uso de marcadores SSRs não revelou alterações genéticas nas plantas microporpagadas de porta-enxertos de citros por três períodos de cultivos precedidos de 12 meses de conservação *in vitro* (Figura 4). Dessa forma, induz-se que sucessivos subcultivos em citros, utilizando os meios e protocolos propostos, em até três ciclos, não levam ao aparecimento de variantes genéticas.

5. Conclusões

O meio WPM sem a adição de PBZ é o mais indicado para a conservação *in vitro* dos porta-enxertos de citros estudados.

Plantas dos porta-enxertos citrandarin 'Índio' e HTR - 051 oriundas da conservação *in vitro* por 6 meses em meio WPM propiciam 100% de sobrevivência após aclimatizadas.

Os híbridos de citros avaliados nesse estudo, com exceção do HTR - 051, podem ser estabelecidos *in vitro* por meio de sementes a partir da seleção de plântulas vigorosas e com características da planta mãe, garantindo a fidelidade genética.

A conservação *in vitro* dos porta-enxertos estudados por 12 meses não reduziu a viabilidade das plantas em posteriores subcultivos.

A realização de três ciclos de subcultivos após a conservação *in vitro* por 12 meses não apresenta variação somaclonal nos porta-enxertos de citros analisados via marcadores SSRs.

6. Referências

Ahmad R, Struss D, Southwick SM (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. Journal of the American Society for Horticultural Science 128 (4): 584-590

Barbhuiya AR, Khan ML, Dayanandan S (2016) Genetic structure and diversity of natural and domesticated populations of *Citrus medica* L. in the Eastern Himalayan region of Northeast India. *Ecology and Evolution* 6(12): 3898-3911

Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1519-1531

Bello-Bello JJ, García-García GG, Iglesias-Andreu L (2015) Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(2):165-171

Bisht TS, Rawat L, Chakraborty B, Yadav V (2018) A recent advances in use of plant growth regulators (PGRs) in fruit crops - A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (5): 1307-1336

Brison M, Boucaud MT, Dosba F (1995) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interespecific *Prunus* rootstocks. *Plant Science* 105 (2): 235-242

Canto AMME, Souza FVD, Costa MAPC, Souza AS, Ledo CAS, Cabral JRS (2004) Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(7):717-720

Carvalho MJS, Souza AS, Santos EB, Soares Filho WS, Ledo CAS, Souza FVD (2016) Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38(1):129-137

Deswiniyanti NW, Lestari NKD (2018) *In vitro* paclobutrazol application effects on *Vanda tricolor* orchid. *Jurnal Simbiosis* 6(1):16-19

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2020.

Fatonah S, Lestari W, Isda MN, Purba L (2018) *In vitro* shoot regeneration of *Citrus nobilis* Lour. from intact seed and cotyledon explants. SABRAO Journal of Breeding and Genetics 50 (2): 168-179

Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F, Ollitrault P (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). Molecular Ecology Resources 8: 119-122

Gimenes R, Pivetta KFL, Mazzini-Guedes RB, Ferraz MV, Pereira STS, Santos AS, Faria RT, Almeida LCP (2018) Paclobutrazol on *in vitro* growth and development of *Zygopetalum crinitum* Orchid, and on seedling acclimatization. American Journal of Plant Sciences 9:1029-1036

Goswami K, Sharma R, Singh PK, Singh G (2013) Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghazi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 19 (1): 137-145

Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (eds) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, 1° edn. Embrapa-SPI, Brasília; DF, pp. 183-260

Grosser JW, Gmitter Junior FG (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Reviews 8: 339-374

Kijas JMH, Thomas MR, Fowler JCS, Roose ML (1997) Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 701-706

Kishore K, Singh HS, Kurian RM (2018) Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 85 (7): 863-872

Liu SR, Li WY, Long D, Hu CG, Zhang JZ (2013) Development and characterization of genomic and expressed SSRs in *Citrus* by genome-wide analysis. *Plos One* 8 (10): 1-10

Lloyd G, McCown B (1980) Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 15 (3): 416-417

Mog B, Janani P, Nayak MG, Adiga JD, Meena R (2019) Manipulation of vegetative growth and improvement of yield potential of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by Paclobutrazol. *Scientia Horticulturae* 257:1-10

Oliveira ERM, Rodrigues MJS, Dantas ACVL, Soares Filho WS, Girardi EA (2014) Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento e o crescimento de quinze porta-enxertos de citros propagados por estaquia. *Citrus Research & Technology* 35 (1): 35-43

Oliveira RP (2006) Documentos 160: Biotecnologia em citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/745209/biotecnologia-em-citros>. Acesso em 23 de novembro de 2019

Otriz Marcide JM (1985) Nomenclatura botânica de los cítricos. *Levante Agrícola: Revista Internacional de Cítricos* 71:259-260

Padilla IMG, Fernandez-Garcia N, Olmos E, Burgos L, Piqueras A (2015) Effects of growth retardants on sprouting and development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and

neem (*Azarchta indica* A. Juss.) nodal buds. Plant Cell Tissue Organ Culture 122: 285-297

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Acesso em 27 de outubro de 2018

ROCHA SC, QUORIM M, RIBAS LLF, KOEHLER HS (2007) Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Árvore* 31 (1): 43-50

Rodrigues MJ, Ledo CAS, Girardi EA, Almeida LAH, Soares Filho WS (2015) Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37 (2): 457- 470

Roussos PA, Archimandriti A, Beldekou I (2016) Improving *in vitro* multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants. *Scientia Horticulturae* 198:254-256

Salis C, Papadakis IE, Kintzios S, Hagidimitriou M (2017) *In vitro* propagation and assessment of genetic relationships of citrus rootstocks using ISSR molecular markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 45 (2): 383-391

Santos ARA, Souza EH, Souza FVD, Fadini M, Girardi EA, Soares Filho WS (2015) Genetic variation of *Citrus* and related genera with ornamental potential. *Euphytica* 205:503-520

Siragusa M, Carra A, Salvia L, Puglia AM, Pasquale F, Carimi F (2007) Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. *Plant Cell Reports* 26: 1289-1296

Soares Filho WS, Moreira CS, Cunha MAP, Cunha Sobrinho AP, Passos OS (2000) Poliembrião e frequência de híbridos em *Citrus* spp.. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35 (4): 857-864

Soares LAA, Brito MEB, Fernandes PD, Lima GS, Soares Filho WS, Oliveira ES (2015) Crescimento de combinações copa - porta-enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 19 (3): 211-217

Sousa EM, Almeida LS, Sousa ARO, Silva MC, Ledo CAS, Almeida AA, Costa MG, Coelho Filho MA, Soares Filho WS, Gesteira AS (2018) Drought tolerance of a microcitrangemonia when treated with paclobutrazol and exposed to different water conditions. Scientia Horticulturae 19 (238): 75-82

Swingle WT (1967) The botany of Citrus and its relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds). The citrus industry, 1° edn. University of California, Berkeley, pp 190-430

Turner T, Burri BJ (2013). Potential nutritional benefits of current citrus consumption. Agriculture 3: 170-187

Volk GM, Bonnard R, Shepherd A, Yin Z, Lee R, Polek M, Krueger R (2017) Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. Plant Cell Tissue Organ Culture 128:327-334

Weiler RL, Brugnara EC, Schwarz SF, Bastianel M, Machado MC, Schifino-Wittmann MT (2010) Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. Ciência Rural 40 (7): 1523-1529

Woo JK, Park YC, Lee JW, Yun SH, Kim M, Park S, Lee Y, Song KJ, Kim HB (2019) Evaluation of polyembryony for genetic resources and efficacy of simple sequence

repeat markers for the identification of nucellar and zygotic embryo-derived individuals in citrus. *Applied Biological Chemistry* 62 (30): 1-11

Wu Y, Sun M, Zhang J, Zhang L, Ren Z, Min R, Wang X, Xia Y (2018) Differential effects of paclobutrazol on the bulblet growth of oriental lily cultured *in vitro*: growth behavior, carbohydrate metabolism, and antioxidant capacity. *Journal of Plant Growth*

Yang H, Tabei Y, Kamada H, Kayano T (1999) Detection of somaclonal variations in cultured rice cells using digoxigeninbased random amplified polymorphic DNA. *Plant Cell Reports* 18: 520-526

Yildiz E, Kaplankiran M, Demirköser TH, Uzun A, Toplu C (2013) Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several citrus crosses using SSRs markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic* 41 (2): 478-484

Zhang J, Xin X, Yin G, Lu X, Chena X (2014) *In vitro* conservation and cryopreservation in national genebank of China. *Acta Horticulturae* 1039:309-318

Zhu S, Wu B, Ma Y, Chen J, Zhong G (2013) Obtaining citrus hybrids by *in vitro* culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCRS. *Scientia Horticulturae* 161: 300-305

Ziv M (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation: technology and applications*. Kluwer, Dordrecht, pp 45-70

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A manutenção dos recursos genéticos de citros é indispensável para o melhoramento genético da cultura, elevando ainda mais a sua produção e garantindo ganhos econômicos não somente para o Brasil, mas a nível mundial, além de se tratar de uma cultura que trás benefícios a saúde humana por sua riqueza nutricional.

Diversas instituições atuam na conservação desse germoplasma em campo. A Embrapa Mandioca e Fruticultura é uma delas, que conta com centenas de acessos disponíveis ao Programa de Melhoramento Genético de citros desta Instituição. Esse programa vem gerando diversas variedades copas e porta-enxertos que tem agregado tolerância/resistência a estresses bióticos/abióticos, além do aumento da qualidade e produtividade para a cultura.

Todavia, a manutenção do germoplasma em campo o torna exposto aos diversos fatores ambientais, sendo necessário, portanto, a associação desse tipo de conservação a um método que garanta a segurança desses recursos. Assim, a conservação *in vitro* torna-se uma grande alternativa para conter esses fatores limitantes. Essa técnica, porém, precisa garantir também a manutenção da qualidade genética, fitossanitária e da viabilidade das plantas conservadas *in vitro*, uma vez que fatores associados a esse método, como a manipulação do material através de

subcultivos e a permanência por longo período sob condições de crescimento reduzido podem influenciar na estabilidade genética do material vegetal.

Nesse intuito, porta-exertos produzidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram analisados nesse estudo com o objetivo de estabelecer condições para conservação e micropropagação *in vitro* a partir do estudo de composições nutricionais e diferentes concentrações de paclobutrazol, como inibidor de crescimento, mantendo a viabilidade e estabilidade genética dos acessos.

Os dados obtidos por meio dessa pesquisa permitiram estabelecer um protocolo de conservação dos porta-enxertos estudados a partir de sementes, definindo o meio de cultura WPM como o mais apropriado dentre as formulações estudadas para o cultivo *in vitro* de citros e a ausência de paclobutrazol para uso na conservação dos genótipos analisados.

O protocolo aqui desenvolvido torna-se de grande aplicação na conservação *in vitro* dos porta-enxertos estudados, bem como pode ser aplicado ou adaptado para outras variedades cítricas, permitindo a conservação das espécies por longo período com garantia da qualidade fitossanitária e da fidelidade genética de clones a serem conservados.