

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (3)

March 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1332020831>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=831&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Biometria de frutos, germinação e morfogênese *in vitro* de citros após assepsia de sementes em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio

## Biometry of fruit, germination and morphogenesis *in vitro* of citros after assepsia of seeds in different concentrations of sodium hypochlorite

D. Santos<sup>1</sup>, W. J. Pereira<sup>1</sup>, D. S. Miranda<sup>1</sup>, J. L. C. Souza<sup>2</sup>, L. A. Borges<sup>3</sup>, M. S. P. Paula<sup>4</sup>, M. C. Vieira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup> Centro de Citricultura Sylvio Moreira

<sup>4</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Wehrmann Agrícola

Author for correspondence: [mcmuza@gmail.com](mailto:mcvmuza@gmail.com)

**Resumo.** Na cultura de tecidos é necessário utilizar sementes de boa qualidade e livres de patógenos visando evitar prejuízos no trabalho a ser realizado no laboratório. É fundamental a realização de limpeza rigorosa nas sementes destinadas ao cultivo *in vitro* para evitar problemas com contaminação. O objetivo deste estudo foi avaliar a biometria de frutos, a germinação e morfogênese de sementes de Limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e Lima da Persia (*Citrus aurantium*) *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de NaClO para a assepsia. Foram coletados frutos de limão 'Cravo' e lima da pérsia. Posteriormente, foram transportados ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO, onde foram realizadas as caracterizações biométricas dos frutos. As sementes desses frutos foram submetidas a tratamentos com soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações: 0,0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% por 10 minutos, constituindo então cinco tratamentos para cada variedade e colocadas em sala de crescimento aclimatizada para análise dos resultados. As variáveis avaliadas foram: biometria dos frutos e das plântulas; índices de oxidação; germinação; contaminação; e tipos de contaminação. As doses de NaClO foram comparadas a partir de intervalos de 95% de confiança. As análises foram realizadas usando a função glm() do software R versão 3.4.1. Constatou-se que o tratamento asséptico com NaClO para lima e limão foi promissor para os processos morfológicos de germinação e desenvolvimento de plântulas, bem como para o controle de agentes contaminantes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Cultivo *in vitro*, lima, limão.

**Abstract:** In tissue culture it is necessary to use seeds of good quality and free of pathogens in order to avoid damages in the work to be carried out in the laboratory. Therefore, strict cleaning of the seeds intended for *in vitro* cultivation is essential. Thus, the objective of this study was to evaluate fruit biometry, germination and morphogenesis of 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) and Persia Lima (*Citrus aurantium*) seeds *in vitro* submitted to different concentrations of NaClO for asepsis. Fruits of 'Cravo' lemon and Lima of Persia. Subsequently, they were transported to the Biotechnology Laboratory of the Goiano Federal Institute Campus Urutaí-GO, where they performed the biometric characterization of the fruits. The seeds of these fruits were submitted to treatment with sodium hypochlorite solution in different concentrations: 0.0; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5% for 10 minutes, constituting then five treatments for each variety and placed in an acclimatized growth room to analyze the results. The variables evaluated were: biometry of fruits and seedlings; oxidation indexes; germination; contamination; and types of contamination. NaClO doses were compared from 95% confidence intervals. The analyzes were performed using the glm () function of software R version 3.4.1. It was verified that the aseptic treatment with NaClO for lime and lemon was promising for the morphological processes of germination and development of seedlings, as well as for the control of contaminating agents *in vitro*.

**Keywords:** *In vitro* culture, lime, lemon.

## Introdução

A cultura de tecidos é uma ferramenta que pode ser utilizada no melhoramento genético de

plantas e na recuperação de genótipos livres de vírus e outros agentes fitopatogênicos. Este método por meio do cultivo *in vitro* tem sido aplicado na

formação e intercâmbio de germoplasmas, produção de sementes sintéticas, microenxertia e em estudos de biologia vegetal (Cançado et al., 2009).

Para que se alcance a transgenia é necessário um protocolo eficiente que atenda regeneração e a sobrevivência das plantas no decorrer do processo biotecnológico de plantas (Sairam et al., 2008).

Para tanto é necessário definir metodologias para a germinação e desenvolvimento de material vegetal *in vitro* o que vai depender além do ambiente, tipo de explante e meio de cultura, da assepsia realizada nos propágulos para que eles se desenvolvam sem a ação de agentes contaminantes.

Atualmente vem aumentando as pesquisas de citros utilizando-se técnicas da biotecnologia. Porém, para que ela possa ser realizada, é necessário ter protocolos de cultivo *in vitro* bem estabelecidos e até o presente momento são poucos os trabalhos com biometria de frutos e plântulas oriundas de protocolos para cultivo *in vitro* da lima da Pérsia (*Palestine Sweet lime*) e de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) visando a utilização para transformação genética.

Na cultura de tecidos é fundamental que as sementes sejam de boa qualidade e livres de patógenos para que não haja prejuízos no trabalho a ser realizado no laboratório. Por isso, deve-se realizar uma limpeza rigorosa nas sementes destinadas ao cultivo *in vitro*. Nesse sentido, é que se propõe criar um protocolo para assepsia das sementes que serão utilizadas na produção de porta enxertos para enxertias *in vitro* (Prado et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar biometria de frutos e a germinação e morfogênese *in vitro* após utilizado diferentes concentrações de NaClO na assepsia de sementes de Limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e Lima da Pérsia (*Citrus aurantium*).

## Métodos

### Biometria de frutos

Foram coletados 20 frutos de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) de dois limoeiros na fazenda Firmeza no município de Orizona-GO e 20 frutos de lima da pérsia (*Citrus aurantium*) provenientes de plantas de um pomar doméstico no município de Pires do Rio-GO.

No Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO, foram realizadas caracterizações biométricas dos frutos, aferindo-se a massa (g) e os diâmetros longitudinal e transversal por paquímetro analógico (cm). Para a obtenção das sementes, o corte nos frutos foi transversal, de forma que a lâmina cortasse o epicarpo e mesocarpo. Depois a parte superior do fruto foi girada em sentido horário e a inferior em sentido anti-horário, para que o fruto liberasse as sementes sem prejuízo mecânico pelo contato com

a lâmina, o que poderia causar oxidação do tecido, como afirma Cid & Teixeira (2014).

### Germinação e desenvolvimento *in vitro*

A assepsia das sementes foi realizada utilizando-se água com detergente, e álcool 70% por 3,0 minutos, conforme Prado et al. (2014). Posteriormente, foram submetidas ao tratamento com solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações: 0,0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% por 10 minutos, constituindo então 5 tratamentos para cada espécie estudada.

Em câmara de fluxo, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada por quatro vezes e inoculadas em frascos de 264 mL, contendo 20 mL de meio básico Murashige & Skoog MS (Caldas et al. 1998). Este meio foi constituído de 50% da concentração dos sais, acrescidos de tiamina a 0,1 mg L<sup>-1</sup>, Benzylaminopurina (BAP) a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, sacarose a 15 g L<sup>-1</sup> e carvão ativado a 1,0 g L<sup>-1</sup>.

Cada tratamento constou de uma parcela de cinco sementes (*Citrus limonia* Osbeck) e outra de lima da pérsia (*Citrus aurantium*) por vidro, totalizando 25 sementes por tratamento.

O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 1 antes da esterilização a 1,5 atm, utilizando temperatura de 120°C por 20 minutos. Após a inoculação os frascos foram colocados na sala de crescimento, em ambiente de luz indireta por 12 horas para indução de germinação. Em seguida foram estabelecidas em temperatura de 24°C ± 2°C e luminosidade de 40 micro Mols, de 40 W, a qual foi fornecida por lâmpadas fluorescentes, luz do dia, com fotoperíodo de 12 horas (Prado et al., 2014).

As variáveis avaliadas foram: Biometria e pH dos frutos, obtendo-se a massa (g) e diâmetros transversal e longitudinal (cm); número e massa das sementes pH do suco de limão e lima da pérsia.

Para a Germinação e desenvolvimento das plântulas *in vitro* foram determinadas as taxas de contaminação e tipo (bactérias ou fungos), oxidação e esverdecimento das sementes. A germinação foi determinada pela protrusão radicular. A identificação dos agentes etiológicos foi realizada com base na morfologia das estruturas reprodutivas e extração manual e descarte por análise macroscópica de indivíduos atacados ou inviabilizados (Prado et al., 2014).

Para o desenvolvimento foram verificados os índices de emissão de parte aérea.

A caracterização biométrica das plântulas cultivadas *in vitro* foi realizada aos 138 dias após a inoculação. As variáveis analisadas foram: Altura (cm), número de folhas, taxa de raiz (%) e massa fresca total (g).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram analisados com o auxílio da estatística descritiva e análise de variância para verificar possíveis diferenças entre os tratamentos. Os dados

de proporção de oxidação, contaminação bacteriana, contaminação fúngica, esverdeamento da semente, protrusão radicular e emissão de parte aérea foram submetidos a análise de deviance a partir de um modelo linear generalizado binomial. As doses de NaClO foram comparadas a partir de intervalos de 95% de confiança. As análises foram realizadas usando a função glm() do software R versão 3.4.1 (R Core Team, 2018).

## Resultados e Discussão

### Biometria de frutos

A massa média dos frutos de limão e lima coletado em matrizes estudadas foram de 83,82 g e 142,96, respectivamente (Tabela 1). Estes valores foram inferiores ao encontrado por Figueiredo et al. (2005) em avaliação de 14 diferentes porta-enxertos para o limão Eureka km 47 no qual obtiveram valor médio de 172 g sobre o porta enxerto de limão 'Cravo' na região de Araraquara-SP. Já Figueiredo et al. (1975) observaram valor próximo ao deste estudo em frutos de tangor-murcote utilizando como porta-enxerto a lima da pérsia ao qual foi 131,3 g.

Na caracterização biométrica dos frutos, foram observadas variações entre as duas espécies, para todos os parâmetros, exceto para a relação de diâmetros (transversal/longitudinal), a qual apresentaram valores médios próximos, (0,97; e 0,98). Segundo Schwarz et al. (2010) ambos os frutos são classificados como esferoide.

O valor médio de diâmetro transversal apresentado pelos frutos da lima (6,12 cm) foi 17,32% maior comparado aos do limão (5,06 cm). Esta também se destacou por obter maiores valores

quanto ao diâmetro longitudinal, no qual foi 15,98% superior ao do limão.

Constata-se que os frutos de lima utilizados neste estudo são maiores que os do limão, sendo que tal fato é atribuído às diferenças existentes nas características genéticas da espécie, bem como a nutrição efetiva presente no solo.

Na avaliação da quantidade de sementes, a lima apresentou superioridade em 26,42% de sementes ao se comparar ao limão. Este fator torna-se importante na escolha de uma variedade de porta enxerto, pois de acordo com Guerra et al. (2012) devem ser levados em consideração características como elevada produção de frutos, com grande número de sementes e que estas apresentem alta poliembrionia nucelar.

Constatou-se que houve diferença de 71,22% na massa de sementes entre as duas espécies estudadas, sendo que a lima apresentou valor superior com média de 2,12 g, enquanto o limão 0,61 g conforme pode ser observado na Tabela 1. Segundo Carvalho & Nakagawa (2000) as sementes de maior tamanho ou densidade, normalmente tem embriões mais bem formados e maior quantidade de reservas, sendo potencialmente as mais vigorosas. Portanto, é de se esperar que a lima tenha um sucesso maior no estabelecimento de plântulas em relação ao limão.

O valor médio de pH dos frutos de lima (5,46) foram maiores que o do limão (2,05) (Tabela 1), sendo portanto menos ácidos e próximo ao obtido por Adams & Klein (2018), cujo encontraram valor de 5,80.

**Tabela 1.** Valores de média, máximo e mínimo das características biométricas: Massa (g); Diâmetro Transversal (cm); Diâmetro longitudinal (cm); Número de sementes NS; e massa de sementes (MS) (g) de Limão 'cravo' e lima da pérsia. Urutai-GO, 2017.

	Limão		Lima	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Massa do Fruto (g)	83,82	12,25	142,96	25,58
Diâmetro Transversal (cm)	5,06	0,38	6,12	0,49
Diâmetro Longitudinal (cm)	5,26	0,47	6,26	0,49
Relação Diâmetros T/L	0,97	0,10	0,98	0,05
Número de Sementes (und)	7,10	2,92	9,65	4,57
NSC	0,90	1,02	0,90	1,29
Massa de Sementes (g)	0,61	0,30	2,12	0,63
pH	2,05	-	5,46	-

### Germinação e desenvolvimento *in vitro*

Foi constatado que o início da protrusão radicular (germinação) para o limão foi no tratamento T3 (Figura 01). Esse fato foi averiguado aos 16 dias após inoculação, com a presença de diferença estatística para esse evento quanto se utilizou a concentração de 1,5 de NaClO aos 08 dias após a inoculação. Na avaliação final da protrusão

aos 24 dias após a inoculação, a média de protrusão foi de: 04% para 0,00 de NaClO; 76% para 1,00% NaClO, 100% para 1,5% NaClO; 40% para 2,00% NaClO e 53,3% para 2,5% NaClO respectivamente.

Para a lima, foi constatado que o início da protrusão radicular aconteceu no tratamento com

1,00% NaClO aos 10 dias após a inoculação. Quanto ao índice de germinação foram de 40 e 92% para os tratamentos com 0,00; 1,00; 1,5; 2,00 e 2,5% NaClO. É possível que o NaClO possa estar agindo como agente que auxilia no índice geral de germinação em especial nas sementes de lima da pérsia conforme observado neste estudo. Rocha (2005) e Rocha et al. (2007) explica que o hipoclorito de sódio é um potente oxidante, e sua ação pode ser resultante de modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, aumentando, dessa forma, a porcentagem de germinação. Portanto, isso pode explicar os resultados obtidos neste estudo.

A oxidação na cultura do limão e da lima ocorreram apenas em sementes que não foram tratadas com hipoclorito de sódio. Este efeito ocorreu aos 48 dias após o estabelecimento das culturas (DAE) (Figura 02 - A) em sementes não tratadas.

As sementes de limoeiro foram infectadas mais rapidamente por microorganismos em relação as da lima, uma vez que aos 6 DAE já apresentavam fungos nos tratamentos 1 (0,0%); 2 (1,0%); 4 (2,0%) e 5 (2,5%). Observou-se bactérias aos 24 DAE, nos tratamentos 5 (2,5%) e 1 (0,0%); aos 32 DAE no 2 (1,0%) e aos 42 DAE no 4 (2,0%).

Sendo assim o tratamento 3, em que se utilizou 1,5% de hipoclorito de sódio se diferenciou dos demais pois não apresentou bactérias e fungos em nenhuma das avaliações realizadas. Estes resultados corroboram com Bianchi et al. (2003) que realizaram a imersão de meristemas de marmeleiro em hipoclorito de sódio a 1,5% por 10 minutos e obtiveram menor percentual de contaminação e as maiores taxas de sobrevivência, quando comparados com os outros tratamentos.

A contaminação fúngica na cultura da lima iniciou-se aos 16 DAE com a concentração de 0,0%, 21 DAE utilizando 2,5%, e aos 32 DAE com 2,0% de hipoclorito de sódio. A presença de bactérias foi observada em sementes em que não houve o tratamento com NaClO aos 21 DAE e no tratamento ao qual se utilizou a maior concentração (2,5%) aos 32 DAE. Portanto, o tratamento 2 (1,0%) e 3 (1,5%) mostraram ser mais eficientes a serem utilizados no controle de organismos que competem com a

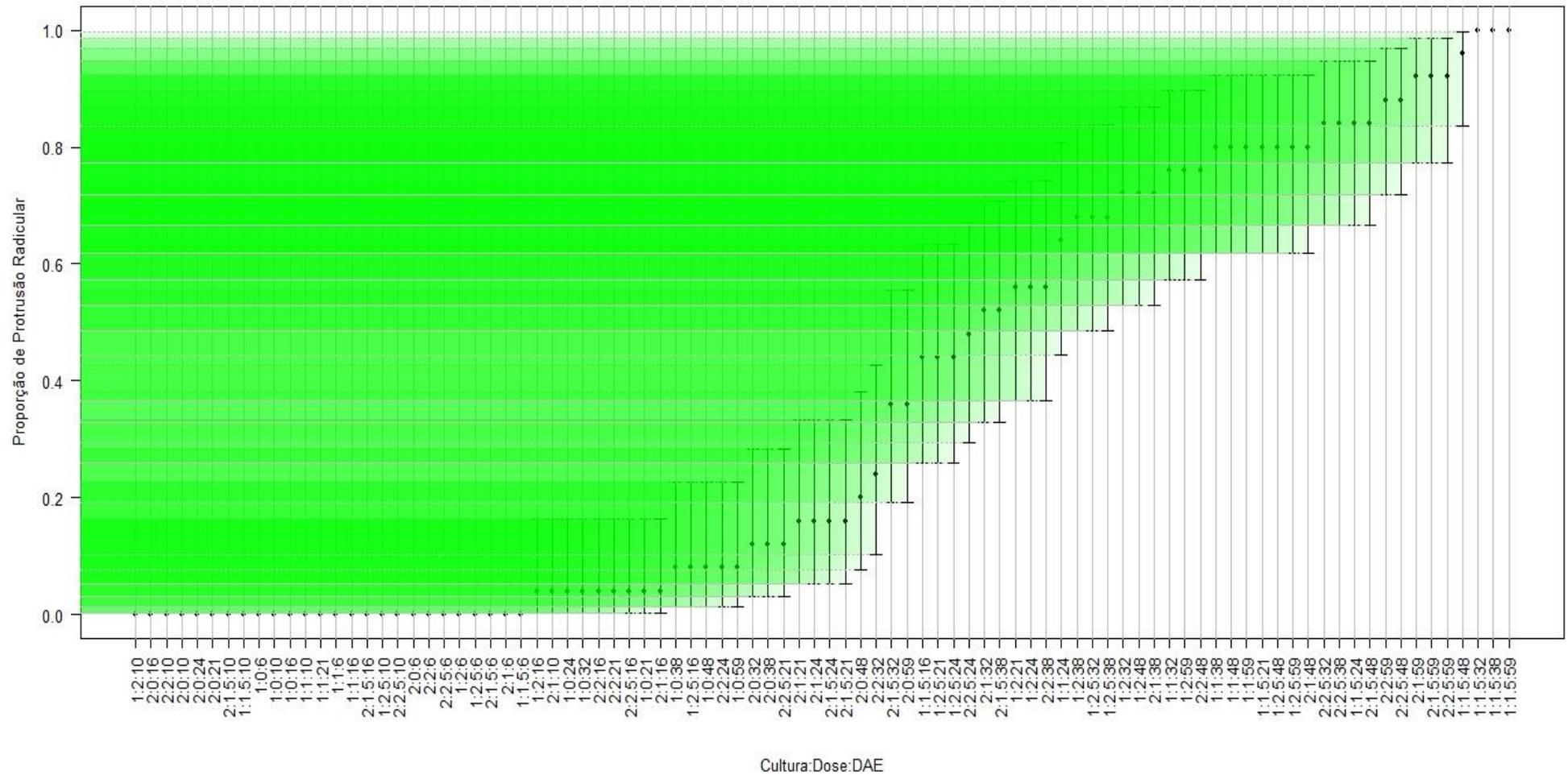
germinação das sementes e a emergência de plântulas de lima, por luz, espaço e nutrientes.

A utilização de hipoclorito de sódio constituiu-se como um fator importante a ser empregado no processo de micropropagação de ambas as espécies, uma vez que auxiliou no controle de bactérias e fungos nas sementes, tornando-as viáveis por mais tempo. Em tratamentos sem o seu uso houve alto índice de contaminação nas primeiras e últimas observações como apresentada na Figura 2-B; C. Fermino Junior et al. (2009) também obtiveram menores índices de contaminações no estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de sementes de teca (*Tectona grandis* L.f.) utilizando NaClO.

O esverdecimento das sementes do limão ocorreu aos 16 DAE nas três maiores concentrações de hipoclorito de sódio (Figura 3-B). Na avaliação dos 21 DAE o tratamento de 1% de hipoclorito de sódio também se apresentou com esverdecimento e o tratamento com 0% apresentou esverdecimento apenas aos 48 DAE. Na cultura da lima este processo também se iniciou aos 16 DAE, mas nas concentrações de 1,5 e 2,5%, e aos 21 DAE todos os tratamentos apresentavam esverdecimento.

Na cultura do limão a emissão de parte aérea foi identificada inicialmente no tratamento 3 (1,5%) aos 24 DAE (Figura 03-A), deste modo diferenciou-se das outras e foi a melhor dose para esta variável. Na avaliação realizada aos 32 DAE constatou-se que as maiores concentrações utilizadas (2,0 e 2,5%) também apresentaram emissão de parte aérea. Já no tratamento 1 (0,0%) este fator foi observado mais tardiamente, somente aos 59 DAE, fazendo com que esta concentração seja considerada a que menos auxiliou no processo de germinação dentre as usadas neste trabalho.

A formação de parte aérea na lima ocorreu aos 16 DAE no tratamento 5; 24 DAE no 3 e 38 DAE em todos os demais estudados. Constata-se que tanto em sementes de lima como de limão a germinação e conseqüentemente a emissão de parte aérea ocorreu de forma mais rápida em tratamentos utilizando hipoclorito de sódio.



**Figura 1.** Intervalos de 95% de confiança de Proporção de Protrusão Radicular para a interação de 2 culturas cítricas (1: Limão; 2: Lima), 5 doses de NaClO em diferentes épocas de avaliação. Urutá-GO, 2017.





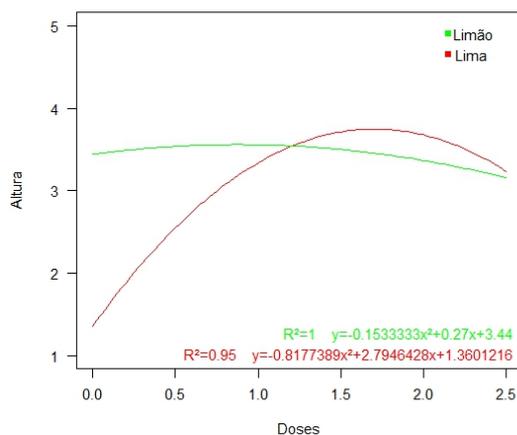
### Biometria das Plântulas de citros

A altura das plântulas avaliadas pouco variaram na cultura do limão (Figura 4, 5-A), com uma altura entre 3 e 4 cm, em que a dose ótima foi a de 0,88% de hipoclorito de sódio. Na cultura da lima (Figura 4, 5-B) a variação de altura das plântulas entre as concentrações de hipoclorito foi um pouco maior, sendo a altura crescente até 1,71% de hipoclorito de sódio (Figura 4-A).

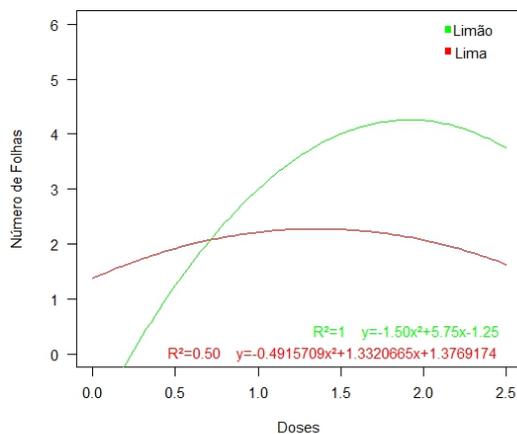
Em número de folhas o comportamento foi contrário, em que a cultura que apresentou maior

variação, atingindo um maior número de folhas foi o limão, com dose máxima de 1,92% de hipoclorito de sódio. A lima apresentou maior número de folhas na concentração de 1,35%, variando pouco nas doses menores e maiores (Figura 4-B).

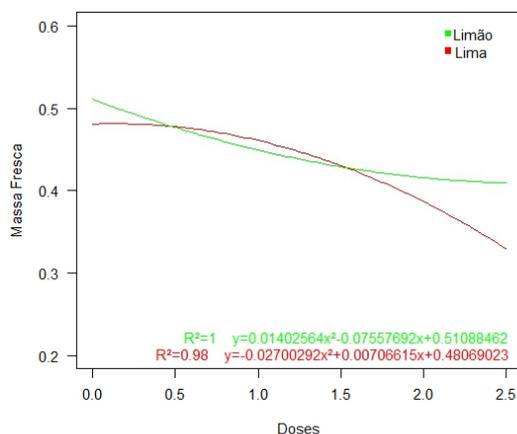
A matéria fresca em ambas as culturas apresentou um comportamento totalmente diferente das outras variáveis, reduzindo a matéria fresca de acordo com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio (Figura 4-C).



A



B



C

Figura 4. Regressão de (A) Altura; (B) Número de folhas e (C) massa fresca de plântulas (g) cultivadas *in vitro* para as culturas do limão e da lima com tratamento asséptico nas diferentes doses de NaClO. Urutai-GO, 2017.

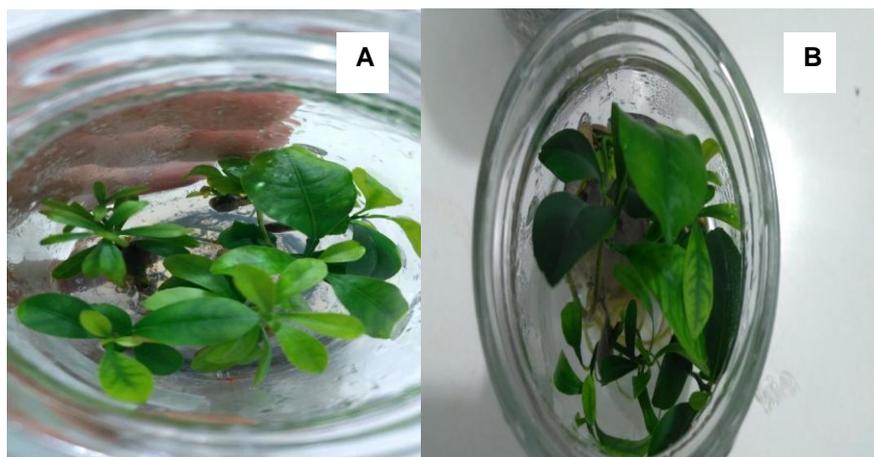


Figura 5. Plântulas desenvolvidas *in vitro* de (A) limão e (B) lima. Urutaí-GO, 2017.

### Conclusão

A massa média dos frutos de limão e lima coletado foram de 83,82 g e 142,96 g;

O início da protrusão radicular (germinação) para o limão foi no tratamento T3 (1,5 de NaClO) aos 16 dias após inoculação;

Quanto ao índice de germinação para a lima constatou-se 92% para os tratamentos com 1,00; 1,5; 2,00 e 2,5% NaCl;

Para o desenvolvimento do limão a maior proporção de emissão de parte aérea foi identificada no tratamento 3 (1,5% NaClO). Para a lima, esse evento ocorreu aos 16 DAE no tratamento 5; 24 DAE no 3 e 38 DAE em todos os demais estudados.

A altura das plântulas cultura do limão ficou de 3 a 4 cm, em que a dose ótima foi a de 0,88% de hipoclorito de sódio. Na cultura da lima a variação de altura das plântulas entre as concentrações de hipoclorito foi um pouco maior, sendo a altura crescente até 1,71% de hipoclorito de sódio.

O tratamento asséptico com NaClO para lima e limão é promissor para os processos morfológicos de germinação e desenvolvimento de plântulas, bem como para o controle de agentes contaminantes *in vitro*.

### Referências

ADAMS, C. R., KLEIN, C. Uso de biofilmes na conservação pós-colheita de lima-da-pérsia (*Citrus limettoides* Tnanaka). Unoesc & Ciência – ACET 9: 85-92, 2018.

BIANCHI, V. J., CHAVES, A. C., SCHUCH, M. W., FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em Hipoclorito de Sódio. Revista Brasileira de Agrociência 9: 177-179, 2003.

CALDAS, L. S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M. E. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, Brasil, p.87-116, 1998.

CANÇADO, G. M. A., RIVEIRO, A. P., FREITAS, G. F., SÁ, M. E. L., SILVA, H. E., PASQUAL, M., VAL, A. D. B., NUNES, C. F. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. Informe Agropecuário 30: 64-74, 2009.

CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. FUNEP, Jaboticabal, Brasil.. 588 p. 2000.

CID, L. P. B., TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, Vitrificação e Variação Somaclonal. In: CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brasil, p. 51-66, 2014.

FERMINO JUNIOR, P. C. P., NAGAO, E. O., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. Scientia Forestalis 37: 427-435, 2009.

FIGUEIREDO, J. O., NEGRI, J. D., MATTOS JUNIOR, D., PIO, R. M., LARANJEIRA, F. F., GARCIA, V. X. P. Comportamento de catorze porta-enxertos para o limão eureka KM 47 na região de Araraquara-SP. Revista Brasileira de Fruticultura 27: 73-76, 2005.

FIGUEIREDO, J. O., POMPEU JÚNIOR., RODRIGUEZ, O., IGUE, T. Estudo das características físicas e químicas de tangor-murcote em cinco porta-enxertos. Bragantia 34: 39-42, 1975.

GUERRA, D., SCHIFINO-WITTMANN., SCHWARS, S. F., SOUZA, P. V. D., WEILER, R. L. Caracterização morfológica, determinação do número de embriões e taxa de poliembrião em três porta-enxertos híbridos de citros. Bragantia 71: 196-201, 2012.

PRADO, J. B.; SANTOS, T. G.; VIEIRA, C.; ATAIDES, A. S. C.; SOUZA, E. R. B. Desenvolvimento de Protocolo de Assepsia Para Cultivo *In Vitro* de Lima da Pérsia. In: Anais...XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Cuiabá-MT, 2014

R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, (2018).

ROCHA, S. C. Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*). 74f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2005.

ROCHA, S. C., QUORIM, M., RIBAS, L. L. F., KOEHLE, H. S. Micropropagation of *Cabralea canjerana* Revista Arvore. Viçosa-MG, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

SCHWARZ, S. F., SOUZA, E. L. S., OLIVEIRA, R. P. Características das variedades copa. In: SOUZA, P. V. D., SOUZA, E. L. S., OLIVEIRA, R. P., BONINE, D. P. (Ed.). Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Fepagro, 2010. p. 31-43.

SAIRAM, R., AL-ABED, D., JOHNSON, J., MUSZYNSKI, M. G., RAAB, M., REDDY, V., T. , GOLDMAN, S. In: KOLE, C., HALL, T. C. Compendium of transgenic crop plants: transgenic cereals and forage grasses. Wiley-Blackwell, Oxford, USA. p.49-82, 2008.