

**Estabelecimento de Protocolo  
Simplificado para a Germinação  
in vitro de Sementes de *Citrus  
sinensis* L. Osbeck var. Pera**

Foto: Antonieta Nassif Salomão



ISSN 0102-0110  
Junho, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*** 325

## **Estabelecimento de Protocolo Simplificado para a Germinação in vitro de Sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. Pera**

Antonieta Nassif Salomão  
Izulmé Rita Imaculada Santos  
Rosângela Caldas Mundim

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF  
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte  
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917  
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624  
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>  
E-mail (sac): [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato  
Secretária-Executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes  
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols  
          Lígia Sardinha Fortes  
          Lucas Machado de Souza  
          Márcio Martinelli Sanches  
          Rosamares Rocha Galvão  
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes  
          João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Editoração eletrônica e tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

**1ª edição (online)**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

Salomão, Antonieta Nassif

Estabelecimento de protocolo simplificado para a germinação in vitro de sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. Pera. Antonieta Nassif Salomão, Izulmé Rita Imaculada Santos e Rosângela Caldas Mundim – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

21 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 325).

1. *Citrus sinensis*. 2. Criopreservação. 3. Germinação. I. Santos, Izulmé Rita Imaculada. II. Mundim, Rosângela Caldas. III. Série.

581 – CDD 21

# Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>05</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>07</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>09</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>17</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>19</b>

# Estabelecimento de Protocolo Simplificado para a Germinação in vitro de Sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. Pera

---

*Antonietta Nassif Salomão*<sup>1</sup>

*Izulmé Rita Imaculada Santos*<sup>2</sup>

*Rosângela Caldas Mundim*<sup>3</sup>

## Resumo

Um dos objetivos do projeto Desenvolvimento de metodologias para criopreservação e crioterapia de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* e *Poncirus trifoliata*, componente do Arranjo HLB – Soluções inovadoras e integradas para a superação da doença huanglongbing (HLB, *ex greening*) dos citros, é desenvolver ou adaptar protocolos de criopreservação para sementes, gemas laterais e ápices caulinares das três espécies de citros. Buscou-se, assim, estabelecer um protocolo simplificado para a germinação in vitro de sementes de *C. sinensis*, tanto para avaliação do material quanto para a formação de estoque de plântulas in vitro a ser utilizado em atividades propostas no projeto. Sementes de *C. sinensis* com teor inicial de água de 52% foram desidratadas em cabine de fluxo laminar por cinco períodos, atingindo teores de água de 39,7%, 30,9%, 27,8%, 25,5% e 24,5%. Após descontaminação com solução de detergente e solução de hipoclorito (2,3 - 2,5% de cloro ativo) em agitação por 5 min., as sementes foram mantidas em água sob agitação (80 rpm) por 1 h. A germinação in vitro foi conduzida em meio de cultura WPM acrescido de carvão ativado. O material foi acondicionado sob temperatura de

25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05\%$ ) entre os percentuais de germinação do controle (98%) e das sementes com 39,7% e 30,9% de teor de água (98% e 89% de germinação, respectivamente). Em contraste, esses percentuais de germinação diferiram significativamente daqueles obtidos das sementes com teor de água de 27,8%, 25,5% e 24,5%, com germinação de 51%, 71% e 60%, respectivamente. Em 41% das sementes germinadas houve desenvolvimento de mais de uma plântula por semente. O protocolo simplificado foi adequado para a germinação de sementes de *C. sinensis*.

Palavras-chave: citros, desidratação, germinação.

---

<sup>1</sup> Engenheira Florestal, MsC, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup> Geógrafa, Graduação, técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

# Establishment of a Simplified Protocol for in vitro Germination of *Citrus sinensis* L. Osbeck var. Pear. Seeds

---

## Abstract

One of the objectives of the project Development of methodologies for cryopreservation and cryotherapy of *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*, component of the HLB Arrangement - Innovative and integrated solutions for overcoming citrus huanglongbing disease (HLB, ex greening) is to develop or adapt cryopreservation protocols for seeds, lateral buds and shoot apices of plants of the three citrus species. Thus, it sought to establish a simplified protocol for in vitro germination of *C. sinensis* seeds both for the evaluation of the material and for the formation of in vitro seedling stock to be used in the activities proposed in the project. Seeds of *C. sinensis* with initial moisture content of 52% were dehydrated in a laminar flow cabin for five periods reaching 39.7%, 30.9%, 27.8%, 25.5% and 24.5% moisture contents. After decontamination of the seeds with detergent solution and hypochlorite solution (2.3 - 2.5% active chlorine) under agitation for 5 minutes, these were kept in water under agitation (80 rpm) for 1 h. In vitro germination was conducted in WPM culture medium plus activated charcoal. The material was cultivated in a growth room at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , photoperiod of 12 h light and 12 h dark. There was no significant difference ( $P < 0.05\%$ ) between the germination percentages of the control and the seeds with 39.7% and 30.9% of

moisture content (98%, 98% and 89%, respectively). Seeds with 27.8% 25.5% and 24.5% of moisture content presented 51%, 71% and 60% of germination respectively, differing ( $P < 0.05$ ) from the values obtained for seeds with 52%, 39,7% and 30.9%. In 41% of the inoculated seeds, more than one seedling developed per seed. The decrease in the percentages of germination is due to the intermediate behavior of the seeds. The simplified protocol was adequate for the germination of *C. sinensis* seeds.

Keywords: citrus, dehydration, germination.



## Introdução

Sementes de *Citrus sinensis* são ricas em ácidos graxos insaturados, como ácido linoleico (36.6%), ácido  $\alpha$ -linoleico (25.3%), ácido oleico (17.8%), ácido palmítico (9.7%) e ácido esteárico (3.3%) (NUNES et al., 2015). Têm longevidade moderada e comportamento intermediário para fins de conservação (ROHINI, 2017; GRAIVER et al., 2011). Essas características impedem sua conservação em longo prazo, adotando-se metodologia convencional de banco de germoplasma. Isto porque sementes de comportamento intermediário são tolerantes ao dessecação parcial, ou seja, a teores de água incompatíveis com exposição a temperaturas subzero ( $-18^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Além disso, nessas temperaturas ocorre mais prontamente a rancificação de seus ácidos graxos insaturados, resultando em perda de viabilidade do material.

Outra característica das sementes de *C. sinensis* é que elas são poliembriônicas, isto é, produzem, além do embrião zigótico, embriões nucelares com formas e tamanhos variados, derivados de células somáticas ou nucelares que compartilham a constituição genética da planta-mãe (MENDES-DA-GLORIA et al., 2001; OCHOA et al., 2012). A poliembrião é um fator limitante em programas de melhoramento genético de citros. Esse evento dificulta a sobrevivência da plântula zigótica devido à competição com aquelas nucelares e a identificação de indivíduos zigóticos em cruzamentos controlados (SOUZA et al., 2013; SOARES FILHO et al., 2013). Os benefícios da poliembrião são a germinação de embriões nucelares vigorosos, com a mesma constituição genética da planta-mãe e livres dos principais patógenos, permitindo, assim, seu uso para a “renovação clonal” de variedades comerciais (DOMINGUES et al., 1998).

Um protocolo padrão para a germinação de sementes de *C. sinensis* in vitro foi proposto por Niedz (2008). O protocolo consistiu nas seguintes etapas: a) remoção da testa das sementes; b) imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio (5,25% m/v de cloro

ativo) por 30 min.; c) imersão das sementes em água por 24 h; d) inoculação do material em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) solidificado com 8% de ágar; e e) incubação sob temperatura de 27°C, no escuro.

O Arranjo HLB – Soluções inovadoras e integradas para a superação da doença huanglongbing (HLB, *ex greening*) dos citros, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, tem como um dos projetos constituintes Desenvolvimento de metodologias para criopreservação e crioterapia de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* e *Poncirus trifoliata* (03.13.03.004.00.00). O objetivo geral do projeto é desenvolver e/ou adaptar metodologias de criopreservação para germoplasma sadio e de matrizes elite de citros e de crioterapia para material infectado por HLB. Os objetivos específicos são: desenvolver e adaptar protocolos de crioterapia para material infectado por HLB de diferentes espécies de citros coletadas em pomares no estado de São Paulo; estabelecer coleções de germoplasma de espécies de citros em criogenia no Banco Genético da Embrapa, para viabilizar a conservação em longo prazo destas espécies; estabelecer uma rede de cooperação técnica no tema criopreservação de germoplasma de espécies de citros; e desenvolver ou adaptar protocolos de criopreservação para sementes, gemas laterais e ápices caulinares de *C. sinensis*, *C. reticulata* e *P. trifoliata*.

Nesse sentido, buscou-se estabelecer um protocolo menos laborioso do que o proposto por Niedz (2008) para a germinação in vitro de sementes de *C. sinensis* com distintos teores de água, tanto para avaliação do material quanto para a formação de estoque de plântulas in vitro a ser utilizado em atividades propostas no projeto.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção e dessecação das sementes**

Frutos de *C. sinensis*, coletados de árvores em crescimento no

campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, foram lavados com detergente e mantidos em solução de hipoclorito (2,3 - 2,5% de cloro ativo) por 15 min. Em seguida, os frutos foram enxaguados e as sementes removidas manualmente e colocadas em recipiente contendo solução de detergente (5 mL de detergente em 100 mL de água), friccionadas levemente com as mãos para a remoção da goma, seguindo-se com enxagues até a total remoção do detergente.

A dessecação das sementes foi feita em condições assépticas, utilizando-se o ar de cabine de fluxo laminar por 0 (controle), 3, 9, 12, 14 e 16 h. Após cada período de secagem, determinou-se o teor de água do material com três repetições de 10 sementes pelo método de estufa  $103 \pm 2^\circ\text{C}/24$  h (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentuais com base no peso fresco.

## **Descontaminação e protocolo de germinação *in vitro***

As sementes foram imersas em solução de detergente e mantidas sob agitação (80 rpm) por 10 min., seguindo-se com três enxagues com água destilada esterilizada, em cabine de fluxo laminar. As sementes foram imersas em solução de hipoclorito (2,3 - 2,5% de cloro ativo), mantidas sob agitação (80 rpm) por 5 min. Após esse período, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada, em condições assépticas de cabine de fluxo laminar. Antes da inoculação, as sementes foram imersas em água sob agitação (80 rpm) por 1 h.

A germinação *in vitro* foi conduzida com três repetições de 15 sementes, utilizando-se o meio de cultura WPM - *Wood Plant Medium* - (LLOYD, MCCOWN, 1981) suplementado com 3% de carvão ativado e solidificado com 6% de ágar. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h luz, com intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas e 12 h no escuro.

Para os procedimentos feitos sob agitação, foi utilizada mesa agitadora orbital de bancada, Modelo NT 145, Marca Nova Técnica.

## **Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições de 15 sementes por teor de água. Os resultados de germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguindo-se com comparação das médias pelo teste de Boferroni ( $P > 0,05$ ). O programa utilizado para a análise estatística foi GraphPad Prism (@2017 *Graph Pad Software Inc.*).

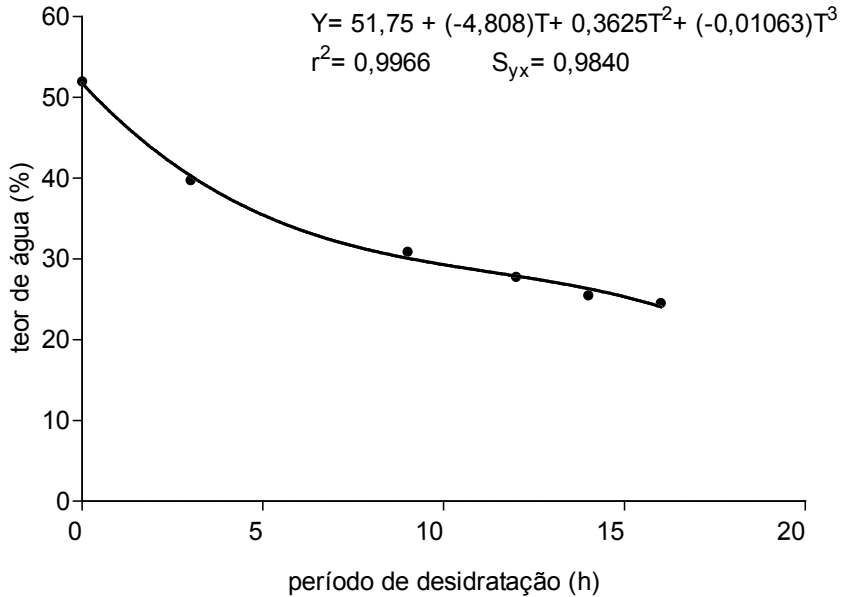
## **Resultados e Discussão**

O melhor ajuste da curva de dessecação das sementes de *C. sinensis* foi obtido pela equação polinomial não linear de terceira ordem (Figura 1). As sementes com teor de água inicial de 52% atingiram os seguintes teores de água por período de desidratação: 39,7% (3 h), 30,9% (9 h), 27,8% (12 h), 25,5% (14 h) e 24,5% (16 h) (Figura 1).

Sementes de comportamento intermediário, como as das espécies do gênero *Citrus*, toleram dessecação parcial, sendo que a desidratação não prolonga sua viabilidade (GRAIVER et al., 2012). Ao contrário, a retirada de água das sementes reflete negativamente sobre sua germinabilidade, conforme observado na Figura 2.

O controle e as sementes com 39,7% de umidade atingiram 98% de germinação. Com teor de água de 30,9%, o percentual de germinação foi de 89%, porém sem diferir estatisticamente ( $P < 0,05\%$ ) dos valores anteriores (Figuras 1 e 2). As sementes desidratadas por 12 h (27,8% de umidade) apresentaram 51% de germinação, valor este que diferiu estatisticamente ( $P < 0,05\%$ ) dos obtidos para sementes com teores de água de 52%, 39,7% e 30,9%. Sementes desseçadas a 25,5% e 24,5% de umidade obtiveram 71% e 60% de germinação,

respectivamente. Estatisticamente diferiram das sementes com 52% e 39,7% de umidade (Figura 2). A contaminação por fungos ou bactérias foi mais pronunciada em sementes expostas aos períodos de desidratação mais longos (Figura 3A, B, C e D).

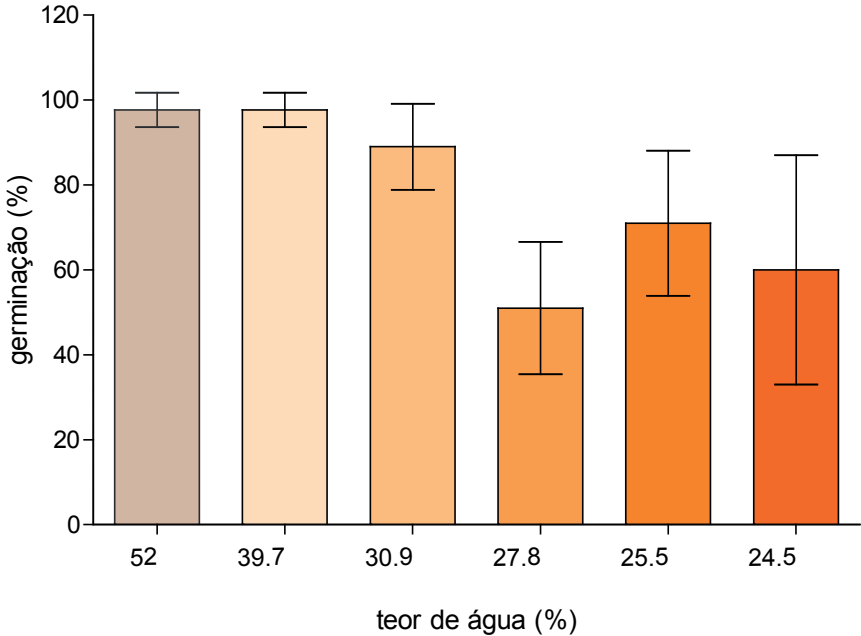


**Figura 1.** Curva de desidratação de sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera.

Na Tabela 1 estão descritas as etapas do protocolo Niedz (2008) e do adotado neste trabalho. As etapas foram as mesmas em ambos os protocolos, quais sejam, beneficiamento das sementes, descontaminação, pré-tratamento, meio de cultura e condições de germinação. As variações entre os protocolos consistiram na execução das etapas e no tempo de exposição às soluções desinfetantes e à embebição.

O processo germinativo ocorreu sem a remoção da testa das sementes, conforme proposto no protocolo desenvolvido por Niedz (2008). A remoção da testa, além de ser uma atividade laboriosa, pode causar injúrias aos embriões, comprometendo sua germinação

e seu desenvolvimento. A fricção manual das sementes em solução de detergente permitiu a rápida remoção da goma que envolve a semente sem causar danos, o que contribuiu para o bom desempenho germinativo.



**Figura 2.** Percentuais de germinação de sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera com distintos teores de água.

A descontaminação por meio da imersão das sementes em solução de detergente, mantendo-as sob agitação por 10 min., seguida de imersão hipoclorito, igualmente mantendo-as sob agitação por 5 min., foi eficaz para sementes com teores de água  $\geq 27,8\%$ . Observou-se que a maior incidência de fungos e bactérias coincidiu com os teores de água das sementes  $\leq 27,8\%$ . As sementes de *C. sinensis* têm comportamento intermediário, portanto toleram apenas a parcial perda de água (NORMAH et al., 2013).

A pré-embebição sob agitação é um tratamento que melhora o desempenho fisiológico de sementes, por facilitar a absorção uniforme de água e remover compostos inibidores da germinação, conforme observado em sementes de café pré-embebidadas em água sob agitação por 12 h (ROSA et al., 2017). A pré-embebição das sementes de *C. sinensis* em água sob agitação (80 rpm) por 1 h foi eficiente para promover a germinação tanto quanto a pré-embebição por 24 h, conforme protocolo proposto por Niedz (2008).

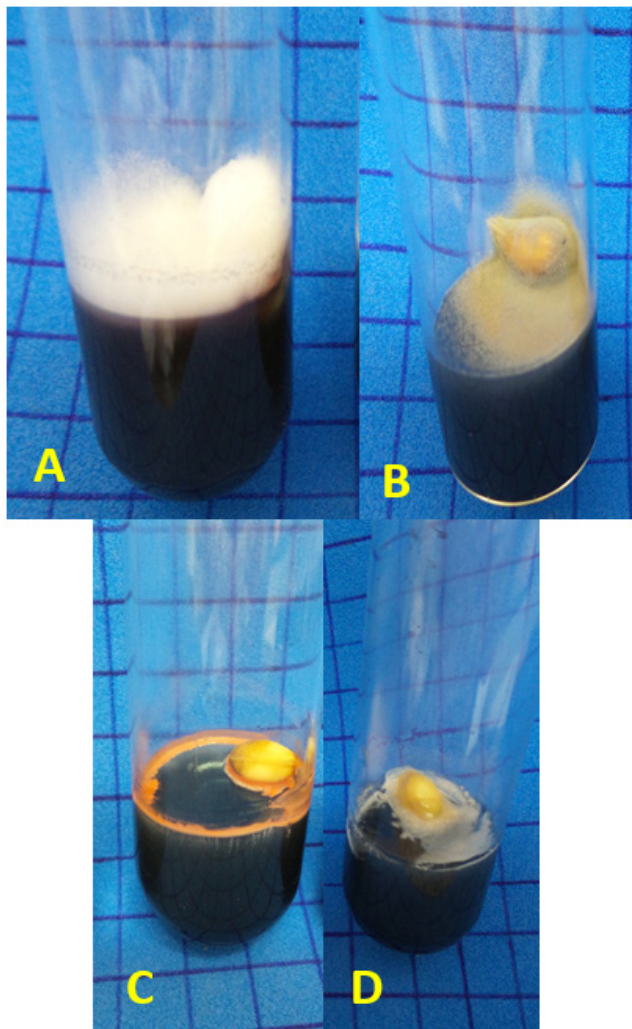
**Tabela 1.** Protocolos de Niedz (2008) e simplificado para a germinação in vitro de sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera.

Protocolo Niedz (2008)	Protocolo simplificado
<b>Beneficiamento das sementes</b>	
Remoção da testa das sementes	Remoção da goma da semente
<b>Descontaminação</b>	
Imersão de sementes em hipoclorito de sódio (5,25% m/v de cloro ativo) por 30 minutos	Imersão de sementes em solução de detergente, agitação por 10 min., seguida de imersão em hipoclorito (2,3 - 2,5% de cloro ativo), agitação por 5 minutos
<b>Pré-embebição</b>	
Imersão das sementes em água por 24 h	Imersão das sementes em água em agitação por 1 h
<b>Meio de cultura</b>	
MS + 8% de ágar	WPM + 3% de carvão + 6% de ágar
<b>Condições de germinação</b>	
Temperatura de incubação 27°C, no escuro	Temperatura de incubação de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro

O meio de cultura WPM tem sido utilizado para a multiplicação e a regeneração de várias espécies arbóreas e arbustivas, como, por exemplo, *Genipa americana* L (SANTOS; SALOMÃO, 2016), *Eucalyptus globulus* Labill (CORDEIRO, 2013), *Prunus* sp. (RADMANN et al., 2009)

e *Coffea arabica* L. cv. Rubi (REZENDE et al., 2008). Para sementes de *C. sinensis*, o meio de cultura WPM, assim como as condições de incubação (temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro), favoreceram tanto o desempenho germinativo quanto o desenvolvimento das plântulas (Figura 2 e Tabela 2).

Fotos: Antonieta Nassif Salomão



**Figura 3.** Sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera contaminadas por fungos (A e B) ou bactérias (C e D).



Em *C. sinensis* é comum a semente possuir mais embriões nucleares do que a totalidade de plântulas desenvolvidas pela semente (MENDES-DA-GLORIA, et al., 2001). Em 110 sementes de *C. sinensis*, das 270 germinadas in vitro, ocorreu desenvolvimento de mais de uma plântula (Tabela 2 e Figura 4). O desenvolvimento de duas plântulas por semente foi o mais frequente, apresentando os maiores percentuais de sementes poliembriônicas de 25% a 43% (Tabela 2). A ocorrência de três plântulas por sementes variou de 4% a 28%, e de quatro por sementes a variação foi de 5% a 8%. O desenvolvimento de cinco plântulas foi observado em apenas uma semente. Tais resultados estão de acordo com relatos na literatura, em que a maioria das variedades de *C. sinensis* possui de 2 a 4 embriões por semente (DOMINGUES et al., 1998).

**Tabela 2.** Percentuais de sementes poliembriônicas em sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera.

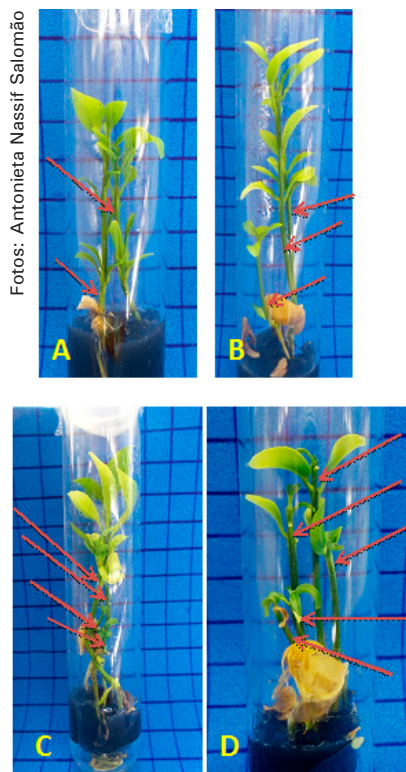
Teor de água (%)	Sementes poliembriônicas			
	2 plântulas	3 plântulas	4 plântulas	5 plântulas
52	36	18	0	0
39.7	38	9	7	0
30.9	25	5	5	3
27.8	43	4	8	0
25.5	34	28	6	0
24.5	37	7	0	0

## Conclusões

Para o protocolo de germinação de sementes de *C. sinensis* in vitro, propõe-se que seja feita a remoção da goma das sementes por fricção em presença de solução de detergente. A descontaminação deve constar de imersão das sementes em solução de detergente, seguindo-se com imersão em hipoclorito com concentração de cloro ativo  $\leq$  2,5%, sob agitação. O pré-tratamento de embebição das sementes

por 1 h, sob agitação (80 rpm), o meio de cultura WPM acrescido de carvão ativado e as condições de incubação do material (temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , de 12 h luz/12 h escuro) foram adequados à germinação e ao desenvolvimento das plântulas de *C. sinensis*.

Em 41% das sementes de *C. sinensis*, houve desenvolvimento de mais de uma plântula a partir de embriões nucleares. Esse material excedente tem utilização em testes preliminares de desenvolvimento e/ou adaptação de protocolos de criopreservação de estruturas vegetativas, conforme proposto no Projeto: Desenvolvimento de metodologias para criopreservação e crioterapia de *C. sinensis*, *C. reticulata* e *P. trifoliata*.



**Figura 4.** Poliembria em sementes de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. pera germinadas in vitro: (A) duas plântulas; (B) três plântulas; (C) quatro plântulas; e (D) cinco plântulas.

## Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA-ACS, 2009. 395 p.

CORDEIRO, G. M. **Otimização da propagação clonal de *Eucaliptus globulus* Labill**. Dissertação área fisiologia e bioquímica de plantas. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2013. 101 p. il.

DOMINGUES, E. T.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; TULMANN NETO, A.; SUGAHARA, V. Y. Poliembrionia em clones de laranja 'pera' e variedades assemelhadas. **Bragantia**, v. 57, n. 2, p. 251-258, 1998.

GRAIVER, N.; CALIFANO, A.; ZARITZKY, N. The influence of desiccation, cryopreservation and rehydration on the survival of polyembryonic Citrus seeds. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 346-347, 2012

GRAIVER N.; CALIFANO, A.; ZARITZKY, N. Partial dehydration and cryopreservation of Citrus seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, n. 14, p. 2544-2550, 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined**

**Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MENDES-DA-GLORIA, F. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, n. 1, p. 17-25, 2001.

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

NIEDZ, R. P. In vitro germination of Citrus seeds. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 121, p. 148-151, 2008.

NORMAH, M. N.; MALIK, S. K.; CHAUDHURY, R.; SALMA, I.; MAKEEN, M. A. Conservation of tropical fruit genetic resources. In: NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. (ed.) **Conservation of Tropical Plant Species**. New York: Springer Science + Business Media, 2013. p. 137-170.

NUNES, P. M. P.; SILVA, C. B. da; PAULA, C. da S.; SMOLAREK, F. F.; ZEVIANI, W. M.; CHAVES, S. C.; LORINI, F.; DIAS, J. da F. G.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D. Residues of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck as agents that cause a change in antioxidant defense in plants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 2, p. 479-493, 2015.

OCHOA, E. del C. M.; ANDRADE RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, M. R.; MONTER, A. V. Identification of zygotic and nucellar seedlings in polyembryonic mango cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1629-1636, 2012.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. de Influência da composição do meio de cultivo e do

tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'1. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 2, p. 95-101, 2009.

ROSA, S. D. V. F. da; MAZZAFERA, P.; GUIMARÃES, R. M.; VEIGA, A. D.; VEIGA A. D. Pré-embebição: efeitos na germinação; crescimento de plântulas e teor de cafeína em sementes de cafeeiro. **Coffee Science**, v. 2, n. 1, p. 69-78. 2007.

REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P. de; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

ROHINI, M. R. **Characterization and cryopreservation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Cultivars of India**. Disponível em: <<http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/83826>>. Acesso: 22 mar. 2017.

SANTOS, I. R. I.; SALOMAO, A. N. Viability assessment of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) embryonic axes after cryopreservation using In Vitro culture. **International Journal of Agronomy**, Article 7392710, 2016.

SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S. Melhoramento genético. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 61-102.

SOUZA, A. da S.; SANTOS FILHO, H. P.; KOBAYASHI, A. K.; SOARES FILHO, W. dos S.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J.; LINO, L. S. M. Cultura de tecidos. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 103-160.



---

***Recursos Genéticos e  
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

