

SAIS E SACAROSE NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE LIMOEIRO ‘CRAVO’

SCHMILDT, Omar¹
SCHMILDT, Edilson Romais²
OLIVEIRA, Márcio José Vieira de³

Recebido em: 2015.01.21

Aprovado em: 2015.04.30

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1430

RESUMO: Dada a importância da produção de mudas de *Citrus* livres de doenças, a microenxertia torna-se uma opção interessante por originar clones livres de patógenos sistêmicos e sem os inconvenientes de juvenildade da embrião nucelar, que não permite também a recuperação de materiais monoembriônicos. A obtenção do porta-enxerto é feita pela germinação *in vitro* de sementes selecionadas, requerendo profissionais habilitados e meio de cultura que proporcione alto índice de velocidade de germinação e alta germinação das sementes, bem como boa produção de matéria fresca e bom crescimento da parte aérea. Nesse trabalho avaliou-se o desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ em meio com diferentes níveis de sais de MS e de sacarose. Níveis de sais de MS acima de 33,3% se mostraram importantes para o aumento do peso em matéria fresca e do crescimento da parte aérea. No entanto, com o aumento dos níveis acima de 33,3% ocorre diminuição do IVG e da porcentagem de germinação. Para o preparo, *in vitro*, de porta-enxerto de limoeiro ‘Cravo’, recomenda-se a germinação de sementes em meio de cultura semi-sólido com 33,3% de sais de MS e sacarose a 60g L⁻¹.

Palavras-chave: *Citrus limonia* Osbeck, citricultura, cultura de tecidos.

MS MINERALS SALTS AND SUCROSE IN *IN VITRO* GERMINATION OF LEMON ‘CRAVO’

SUMMARY: Given the importance of production of free *Citrus* seedling diseases, micrografting becomes an interesting option for lead free clones of systemic-borne diseases and without the drawbacks of juvenility of nucellar embryonic, not also enables recovery of materials monoembriônicos. Obtaining the rootstock is made by *in vitro* germination of selected seeds, requiring skilled professionals and culture medium that provides high germination rate index and high seed germination and good production of fresh and good growth the shoot. In this study we evaluated the *in vitro* development of lemon rootstock cloves in medium with different levels of MS salts and sucrose. MS salts levels above 33.3% were important for increasing weight in fresh weight and shoot growth. However, with increasing levels above 33.3% is reduced IVG and germination. For the preparation *in vitro* rootstock of lemon ‘Cravo’ is recommended to seed germination in semi-solid culture with 33.3% of MS salts and sucrose 60 g L⁻¹.

Keywords: *Citrus limonia* Osbeck, citriculture, tissue culture.

INTRODUÇÃO

As plantas cultivadas do gênero *Citrus*, que abrangem principalmente as laranjeiras, tangerinas, limoeiros, limeiras, pomeleiros e toranjeiras, desempenham grande importância sócio econômica no

¹ Doutor, Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Rodovia BR 101 Norte, km 60, Bairro Litorâneo, 29932-540, São Mateus/ES. E-mail: omar-schmidt@ig.com.br

² Professor Doutor, Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Rodovia BR 101 Norte, km 60, Bairro Litorâneo, 29932-540, São Mateus/ES. E-mail: e.romais.s@gmail.com

³ Doutor, Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) – Campus de Alegre - ES, Cx. Postal 29520-000, E-mail: marciojvoli@hotmail.com

mundo. O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, sendo as mais produzidas, a laranja, a tangerina e a lima ácida (AGRIANUAL, 2014). Essa posição de destaque deve-se à grande aceitação dos *Citrus* na alimentação humana, principalmente sob a forma de fruta fresca e de suco. O sabor é muito apreciado e seu valor nutritivo, como fonte de vitamina C, é conhecido universalmente (KOLLER, 1994). Segundo o IBGE (2014), a produção brasileira de laranjas, limões e tangerinas foi de mais de 19 milhões de toneladas em 2013.

As doenças de *Citrus* causadas principalmente por vírus, viróides, micoplasmas e bactérias têm importância capital, pois pode destruir toda a citricultura de uma extensa região, impedir o seu estabelecimento em certas áreas ou reduzir quantitativa e qualitativamente a produção. Por esse motivo, há muitos anos existe uma grande preocupação no desenvolvimento e utilização de técnicas que permitam obter, *in vivo* e *in vitro*, plantas cítricas livres dessas doenças (BAPTISTA et al., 1991). Embora os vírus sistêmicos também possam atingir os tecidos meristemáticos, em alguns casos parece existir uma região próxima às extremidades de raízes e brotos que permanece isenta de vírus, e esta evidência tem permitido a produção de clones livres de vírus através de culturas de tecidos obtido desta região (BEDENDO, 1995).

Para o cultivo *in vitro*, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) inicialmente utilizado para o cultivo de tabaco, vem se destacando como eficiente para a maioria das culturas herbáceas. No entanto, as espécies mais lenhosas frequentemente não são responsivas à composição original, mas apresentam melhor desempenho com a redução de macronutrientes (BERTOZZO; MACHADO 2010). Já a sacarose é a principal fonte de carboidrato usada na cultura de tecidos, possui duas finalidades básicas: como fonte de carbono e como regulador osmótico nas células (THORPE et al., 2008; MARINO et al., 2010), além de possui elevada solubilidade e rápida metabolização pela maioria dos vegetais (GEORGE et al., 2008; YASEEN et al., 2013). Contudo as exigências nutricionais são diferentes para as espécies vegetais, e o suprimento inadequado de um elemento essencial, em excesso ou deficiência, pode acarretar em prejuízos para o desenvolvimento vegetal.

A microenxertia é uma técnica em que se retira a extremidade apical de um ramo da variedade que se quer limpar de doenças colocando-a sobre a extremidade decepada de um porta-enxerto, cultivado em tubo de ensaio (PAZ; PASQUAL, 1998). De acordo com Dornelles (1988), obtendo-se a pega dessa microenxertia, a planta obtida tem grandes probabilidades de não receber os microorganismos existentes na planta mãe, pois as extremidades meristemáticas geralmente estão livres dos mesmos. Quando esta é multiplicada por enxertia, dará origem a um clone livre de patógenos sistêmicos e sem os inconvenientes de juvenildade da embrionia nucelar, que não permitiria a recuperação de materiais monoembriônicos (NAVARRO; JUÁREZ, 2007).

O limoeiro ‘Cravo’ é o principal porta-enxerto utilizado no Brasil. A principal razão é que este confere precocidade, alta produtividade e resistência à seca, além de tolerante à tristeza (KOLLER, 1994; PADOVANI, 2013). No quadriênio 2004-2007 foi utilizado em 56,1% das mudas formadas no estado de São Paulo (POMPEU JÚNIOR; BLUMER, 2008). Vem sendo substituído por variedades tolerantes como as tangerinas Cleópatra, Sunki, pelo citrumelo Swingle, e pela *Poncirus trifoliata* (SETIN; CARVALHO, 2011) em virtude da sua suscetibilidade a uma doença de combinação copa/porta-enxerto, que manifesta os sintomas na região de enxertia em plantas sobre porta-enxertos intolerantes, conhecida como “morte súbita” e que surgiu recentemente (Müller et al., 2002). Entretanto, de acordo com Figueiredo (1985), devem ser consideradas as excepcionais qualidades apresentadas pelo limoeiro ‘Cravo’, que satisfazem tanto o produtor de mudas quanto ao citricultor. A substituição do porta-enxerto por outro constitui um risco muito grande na eventualidade do surgimento de novas moléstias, principalmente viróticas, que podem atacar as plantas enxertadas nesse porta-enxerto. Pelos problemas mencionados, é aconselhável que

o citricultor use na instalação de pomares, mudas enxertadas em três ou mais porta-enxertos. Dessa forma o citricultor não terá um rendimento máximo, mas ficará livre de perder subitamente todo o pomar se surgir uma nova moléstia que dizime as plantas enxertadas em apenas um ou dois porta-enxertos usados. Neste caso, o limoeiro ‘Cravo’ pode ser usado em áreas livres da “morte súbita”.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar concentrações de sais MS e sacarose em germinação *in vitro* de sementes de limoeiro ‘Cravo’ para obtenção de porta-enxerto.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi realizado em sala de cultura do Laboratório de Melhoramento Vegetal, no Centro Universitário Norte do Espírito Santo/UFES, em São Mateus, ES, no período de setembro a outubro de 2013.

Utilizaram-se sementes de limoeiro (*Citruslimonia* Osbeck) cv. Cravo, oriundas da área experimental do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, apresentando maturação completa.

As sementes dos frutos foram extraídas pelo método manual, conforme Koller (1994). Os frutos sofreram uma incisão com uma lâmina na região equatorial girando-os na mão. Depois de efetuada a incisão ao redor do fruto, fez-se uma torção para extrair as sementes. Estas foram misturadas com cal, friccionadas com a palma das mãos e lavadas em seguida em peneira com água corrente. A secagem foi feita à sombra durante sete dias.

A desinfestação foi feita em álcool 70% por trinta segundos e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 10 minutos e enxaguados três vezes em água deionizada e esterilizada. Em seguida, foram retirados os tegumentos internos e externos em condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal.

O delineamento experimental foi do tipo blocos casualizados, com 12 tratamentos, num esquema fatorial com três níveis de sais MS (33,3; 66,7 e 100%) e quatro níveis de sacarose (0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹). Cada tratamento foi repetido duas vezes, com 10 tubos de ensaio por repetição, e uma semente por tubo de ensaio. Cada tubo de ensaio de 25 x 150 mm continha 20 ml de meio de cultura. O meio de cultura continha sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e sacarose de acordo com os tratamentos, além de vitaminas do meio MS, sendo solidificado em ágar a 7 g.L⁻¹ e o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

O ambiente de cultivo foi em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2°C e sob luz fluorescente com fotoperíodo de 16 horas, fornecendo 25,2 μmol m⁻² s⁻¹ de fluxo de fótons fotossintéticos. Após vinte dias de cultivo *in vitro*, avaliaram-se as variáveis: porcentagem de germinação, matéria fresca e comprimento da parte aérea. Foi calculado também o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Maguirre (1962), sendo as germinações medidas aos 5, 10, 15 e 20 dias após inoculação *in vitro*.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando os efeitos foram significativos, as médias foram analisadas por regressão entre níveis de sacarose e por teste de Tukey entre níveis de sais de MS. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

RESULTADO E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa entre as médias dos níveis de sacarose e de sais de MS, bem como a interação entre os níveis dois fatores para índice de velocidade de germinação (IVG), conforme Tabela 1. Para germinação (G), massa fresca (MF) e comprimento da parte

aérea (CPA) houve efeito significativo apenas para as médias entre níveis de sais de MS (Tabela 1). Os coeficientes de variação variaram entre 12,08 até 29,72% o que são considerados médios para trabalhos em cultura de tecidos vegetais (WERNER et al., 2012), garantindo boa precisão experimental.

Tabela 1. Análise de variância para as características índice de velocidade de germinação (IVG), Germinação (G, em %), Matéria Fresca (MF, em mg) e Comprimento da Parte Aérea (CPA, em cm) de limoeiro ‘Cravo’ após vinte dias em meio de cultura contendo diferentes níveis de Sais de MS e Sacarose (São Mateus-ES, 20013).

F.V	G.L.	Quadrado Médio ^{1/}			
		IVG	G	MF	CPA
Blocos	1	0,0376	4,17	10,01	0,0421
Sacarose (S)	3	0,1385 *	948,61 ^{ns}	14,00 ^{ns}	0,2842 ^{ns}
Sais MS (MS)	2	0,3573 **	1512,50 *	2665,65 *	5,7852 *
S x MS	6	0,0845 *	656,94 ^{ns}	913,37 ^{ns}	1,9737 ^{ns}
Resíduo	11	0,2409	331,44	575,80	0,9689
Média		1,285	61,25	155,87	5,30
CV (%)		12,08	29,72	15,39	18,58

^{1/}ns, *, ** = não significativo, significativo a 5 e 1% , respectivamente pelo teste F.

Na tabela 2 são apresentadas as médias de IVG na comparação entre os níveis de sais de MS e, na figura 1 são apresentadas as médias de IVG em função dos níveis de sacarose. Observa-se que o aumento da salinidade diminui o IVG quando as sementes ficaram em meio com sacarose a partir de 40 g L⁻¹ (Tabela 2). Esses resultados demonstram sensibilidade do limoeiro ‘Cravo’ a salinidade, semelhante ao demonstrado por Gurgel et al. (2003), em experimento comprovando o menor IVG em porta enxerto de acerola em condições de alta salinidade. Sabe-se que a salinidade, ao reduzir o potencial osmótico do meio, aumenta o tempo de embebição de água pelas sementes, resultando, inicialmente, em prolongamento do período de emergência da plântula (PIZARRO, 1985).

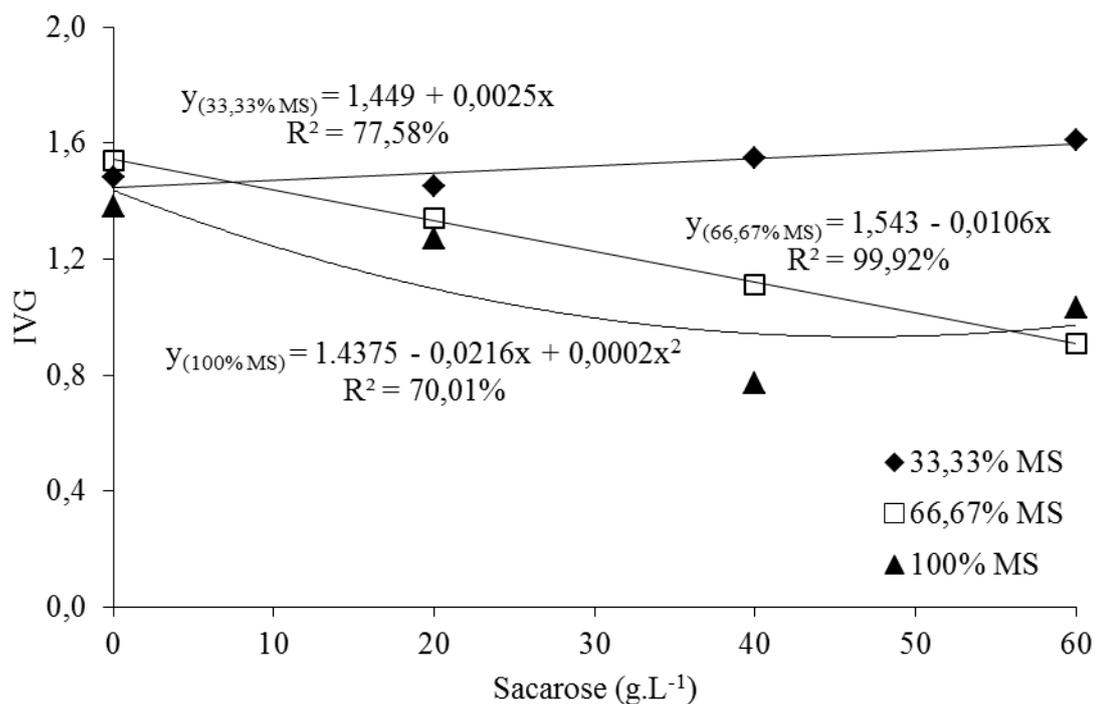
Houve aumento linear do IVG com aumento dos níveis de sacarose (de 0 até 60 g.L⁻¹) na presença de 33,3 % de sais de MS (Figura 1). O baixo teor de sais de MS parece ter compensado a adição de sacarose, não afetando o balanço osmótico do meio e sendo favorável ao IVG. Comportamento semelhante foi observado por Nogueira et al. (2004) em relação à germinação *in vitro* de sementes da planta medicinal *Byrsonina intermedia*. Na presença de 66,7% e 100% de sais de MS, houve decréscimo do IVG com aumento dos níveis de sacarose provavelmente devido à baixa diferença de potencial osmótico entre as sementes e o meio de germinação.

Tabela 2. Relação entre o Índice de velocidade de germinação e diferentes níveis de sais de MS em limoeiro ‘Cravo’, em meio de cultura com diferentes níveis de sacarose (São Mateus-ES, 2013).

Sais MS (%)	Sacarose (g.L ⁻¹)			
	0	20	40	60
33,33	1,48A	1,45A	1,55A	1,61A
66,67	1,54A	1,34A	1,11B	0,91B
100	1,38A	1,27A	0,77B	1,03B

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 1. Relação entre o Índice de velocidade de germinação (IVG) e diferentes níveis de sacarose em limoeiro ‘Cravo’ em meio de cultura para diferentes níveis de sais MS (São Mateus-ES, 2013).



Para o percentual de germinação houve decréscimo com o aumento dos níveis de sais de MS (Tabela 3). Isto implica que este acréscimo de sais no meio extracelular, pode ter provocado maior perda de água devido à pressão osmótica exercida na semente, alterando assim a disponibilidade de água para o processo de germinação. Resultado semelhante foram encontrados por Rosa et al. (2012) em plantas de *Mimosa Scabrella* Bentham, onde obtiveram maior germinação das sementes com a redução do meio MS a 12,5% e 25%, em função do maior fornecimento de água para promover este processo. Esses resultados diferem dos encontrados para germinação *in vitro* de aceroleira (GURGEL et al. 2003) e a planta medicinal *Byrsonima intermedia* (NOGUEIRA et al, 2004) que não encontraram diferenças significativas para as médias de germinação de sementes em diferentes níveis de sais. George et al. (2008) relatam que a germinação *in vitro* requer diferentes níveis de sacarose e sais MS para diferentes espécies vegetais.

Maior quantidade de matéria fresca bem como maior comprimento da parte aérea foram obtidos no nível 66,7% de sais de MS (Tabela 3). Esse resultados diferem dos encontrados por Utino et al. (2001) que testando também de 33,3% até 100% de sais de MS encontraram aumento linear na produção de matéria fresca em explantes de bananeira. Koller e Boeira (1996) salientam a importância do N inorgânico no desenvolvimento do limoeiro ‘Cravo’. No presente trabalho, o nível que permitiu maior teor de matéria fresca (66,7% de sais de MS) equivalem a 367,72 mg.L⁻¹ de N inorgânico. Em trabalhos com solução nutritiva, foi detectado maior acúmulo de matéria fresca a 100 mg.L⁻¹ de N inorgânico em petúnia (FRET; DIRR, 1986) e 267 mg.L⁻¹ em cravo (HAYASHI et al, 2002). Pelo exposto, parece existir um teor ótimo de N inorgânico para diferentes espécies e embora não se tenha isolado o efeito do mesmo no presente trabalho, percebe-se que não é necessário mais que 367,72 mg.L⁻¹ de N inorgânico (equivalente a 2/3 de sais de MS) para propiciar maior acúmulo de matéria fresca e crescimento de parte aérea na germinação *in vitro* de sementes de limoeiro ‘Cravo’. Os resultados da tabela 3, para a germinação e comprimento da parte aérea corroboram com Bertozzo e Machado (2010), em que salientam que para espécies mais lenhosas o desempenho é melhor com a redução de macronutrientes no meio de cultura. Outros autores

também salientam a importância da nutrição mineral para o crescimento vegetativo inicial de mudas de citros (DECARLOS NETO et al, 2002; SCIVITTARO et al., 2004).

Tabela 3. Médias de Germinação das sementes (G, em %), Matéria Fresca (MF, em mg) e Comprimento da Parte Aérea (CPA, em cm) em plântulas de limoeiro ‘Cravo’ após vinte dias em meio de cultura contendo diferentes níveis de Sais de MS (São Mateus-ES, 2013).

Sais de MS (%)	G	MF	CPA
33,33	75,00 A	136,75 B	5,14 AB
66,67	61,25 B	173,11 A	6,22 A
100	50,00 B	157,75 AB	4,54 B

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação ao comprimento da parte aérea, a média foi de 5,3 cm, resultado semelhante aos obtidos por Paiva e Souza (1994). Murashige et al. (1972) afirmaram que o tamanho ideal para a realização da enxertia *in vitro* é quando os micro porta-enxertos atingem em torno de 5 cm de comprimento.

CONCLUSÃO

Para o preparo, *in vitro*, de porta-enxerto de limoeiro ‘Cravo’, recomenda-se a germinação de sementes em meio de cultura semi-sólido com 33,3% de sais de MS e sacarose a 60 g.L⁻¹.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2014. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativo, 2013. 463p.
- BAPTISTA, R.P. et al. Microenxertia. In: RODRIGUES, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2. ed., v.2. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.763-786.
- BEDENDO, I.P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A. e al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed, v.1. São Paulo: Agronômica CERES, 1995. p.132-160.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I.S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices Caulinares de mamoneira (*Ricinus communis*L.) *in vitro*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n.6, p. 1477-1482, 2010.
- CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- DECARLOS NETO, A. et al. Crescimento de porta-enxertos de citros em tubetes influenciados por doses de N. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.199-203, 2002.
- DORNELLES, C. **Introdução à citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 96p.
- FIGUEIREDO, J.O. Porta - enxertos para *Citrus*. In: SOBRINHO, J.T. (Ed.). **Laranja. Revista Técnica Científica de Citricultura**. São Paulo: Instituto Agrônomo – Estação Experimental de Limeira, 1985. p.449-457.

- FRET, J.J.; DIRR, M.A. Effect of nitrogen and calcium stock plant nutrition on Petúnia x Hybrida leaf and anther explant growth in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, p.289-298, 1986.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. the background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.
- GURGEL, M.T. et al. Estresse salino na germinação e formação de porta-enxerto de aceroleira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.1, p.31-36, 2003.
- HAYASHI, T.K. et al. Tratamento de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L., Caryophyllaceae) com nitrogênio e calogênese *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.47-52, 2002.
- IBGE. **Banco de Dados Agregados: SIDRA**. IBGE, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 15 dez. 2014.
- KOLLER, O.C.; BOEIRA, R.C. Adubação orgânica e inorgânica em sementeiras de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.6, p.645-654, 1996.
- KOLLER, O.C. **Citricultura**: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evolution for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MARINO G. et al. Effect of carbohydrates on in vitro low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.126, n.4, p.434-440, 2010.
- MÜLLER et al. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.2, p.371-386, 2002.
- MURASHIGE, T. et al. A technique of shoot apex grafting and its utilization to wards recovering virus free citrus clone. **HortScience**, Alexandria, v.7, n.2, p.118-119, 1972.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NAVARRO, L.; JUÁREZ J. Shoot-tip grafting in vitro: Impact in the citrus industry and research applications. In: Khan I. (Ed.). **Citrus**: Genetics, breeding and biotechnology. Wallingford: CAB International, 2007. p.353-364.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1053-1059, 2004.
- PADOVANI, G. Porta-enxertos determinam qualidade do pomar. **Revista Plasticultura**. Ano vi, n.30, p.18-18, 2013.
- PAIVA, L.V.; SOUZA, M. Obtenção de porta-enxertos para a microenxertia em citros. **Ciência e Prática**, Lavras, v.18, n.1, p.76-78, 1994.
- PAZ, P.O.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2, Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p.147-159.
- PIZARRO, F. **Drenaje agrícola y recuperacion de suelos salinos**. Madrid: Ed. Agrícola Española, 1985. 542p.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER S. Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.29, n.1-2, p.35-50, 2008.

ROSA, F.C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.3, p.1021-1026, 2012.

SCIVITTARO, W.B. et al. Adubação nitrogenada na formação de porta-enxertos de limoeiro 'Cravo' em tubetes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.131-135, 2004.

SETIN, D.W; CARVALHO, S.A. Recipientes e métodos de enxertia na produção de mudas de citros com porta-enxertos duplos. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.1, p.17-26, 2011.

THORPE, T. et al. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GOERGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed, v.1. Dordrecht: Springer, 2008. p.115-173.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*: I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.225-229, 2001.

WERNER, E.T. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **PlantCell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.8, n.1-2, p. 27-36, 2012.

YASEEN, M. et al. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, Dordrech, v.40, n.4, p.2837-2849, 2013.