

Ajuste de la prueba de viabilidad topográfica por tetrazolio en *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.



Adjustment of the topographic viability test by tetrazolium in Poncirus trifoliata (L.) Raf.

Catraró, Marcela; Poggi, Damián; Quadrelli, Agustín; Flores, Patricia; Gariglio, Norberto

 Marcela Catraró

marcela.catraró@unr.edu.ar

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Argentina

Damián Poggi

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Argentina

Agustín Quadrelli

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Argentina

Patricia Flores

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Argentina

Norberto Gariglio

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Argentina

Revista FAVE Sección Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Litoral, Argentina

ISSN: 2346-9129

ISSN-e: 2346-9129

Periodicidad: Semestral

vol. 21, núm. 2, 12005, 2022

revistafave@fca.unl.edu.ar

Recepción: 10 Febrero 2022

Aprobación: 01 Agosto 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/586/5863684005/>

DOI: <https://doi.org/10.14409/fa.v21i2.12005>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Resumen: *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., es uno de los portainjertos más importantes para la producción cítrica de la Argentina, y se propaga por semillas cuya latencia física dificulta su germinación. La prueba bioquímica de tetrazolio (TZ) permite una evaluación rápida de la calidad fisiológica de las semillas. A pesar de que la prueba se ha aplicado a *Poncirus*, aún no se han desarrollado protocolos específicos para esta especie. En el presente trabajo, se llevó a cabo un ensayo preliminar para probar la concentración de TZ y el tiempo de incubación recomendado por las asociaciones de analistas de semillas (1% durante 18 y 24 horas), cuyos resultados se utilizaron para establecer tratamientos adecuados para la especie. Las concentraciones de sal de TZ evaluadas fueron de 0,2 y 0,5%, con una exposición de 3 y 5 horas a TZ, en un diseño factorial 2x2x2. Las semillas se clasificaron como viables o no viables de acuerdo con las diferentes tinciones obtenidas. Se determinó como la metodología más adecuada para realizar la prueba de TZ la utilización de una concentración del 0,2% de la sal TZ, 5 h de incubación y semillas sin escarificar de modo de optimizar los recursos implicados.

Palabras clave: calidad fisiológica de semillas, trifolio, test topográfico, viabilidad.

Abstract: *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., one of the main rootstocks in Argentina's citrus production, is propagated from seeds, which exhibit delayed germination due to physical dormancy. The biochemical tetrazolium test (TZ) allows a quick assessment of seed physiological quality. Even though the test has been applied to *Poncirus*, specific protocols for this species have not been developed yet. In the present work, a preliminary assay was carried out to test the TZ concentration and incubation time recommended by seed analyst associations (1% for 18 and 24h), the results of which were used to establish treatments suited to *Poncirus*. The TZ salt concentrations evaluated were 0.2 and 0.5%, with 3 and 5 h exposure to TZ, in a 2x2x2 factorial design. Seeds were classified as viable or non-viable according to the different staining obtained. It was determined that 5 h of incubation in 0.2% TZ salt concentration of unscarified seeds is the most suitable combination for assessing viability of *Poncirus trifoliata* seeds.

Keywords: *seed physiological quality, hardy orange, topographic test, viability.*

INTRODUCCIÓN

Poncirus trifoliata (L.) Raf. comúnmente denominado trifolio es uno de los portainjertos más importantes para la producción citrícola de la Argentina, siendo el más utilizado en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires (Anderson, 1996). *P. trifoliata* se propaga comercialmente por semilla, y su germinación es hipogea, lenta y desuniforme, pudiendo demorarse entre 15 y 60 días (Palacios, 2005; Spiegel-Roy y Goldschimindt, 1996). El retraso en la germinación se atribuye a un proceso de latencia física asociada a la presencia de tegumentos que afectan la imbibición y el intercambio gaseoso. Este tipo de latencia puede ser superada mediante escarificación química con hipoclorito de sodio (Catraro et al., 2018; Oliveira et al., 2006; Teixeira et al., 2009).

Al propagarse por semilla, los viveristas necesitan que éstas posean una elevada calidad fisiológica. La calidad se refiere a un conjunto de atributos entre los que se encuentran la pureza físico-botánica, un alto grado de uniformidad, buen estado sanitario, vigor y alta viabilidad. Estos aspectos son evaluados a través de distintas pruebas, tales como la prueba de germinación estándar, la prueba de viabilidad por tetrazolio (TZ) y las pruebas de vigor de conductividad eléctrica y envejecimiento acelerado, entre las más utilizadas (Arango y Craviotto, 2002; Flores et al., 2011; ISTA, 2010).

La prueba topográfica de Viabilidad por TZ (Lakon, 1942), es utilizada para el análisis de semillas de numerosas especies, constituyendo un instrumento de diagnóstico que permite evaluar la viabilidad de las semillas en un lapso inferior a 24 h (Flores et al., 2011; ISTA, 2010; Lakon y Bulat, 1956; Moore, 1985).

Esta prueba se basa en la capacidad bioquímica que poseen los tejidos vivos de las semillas que ocasionan la reducción de una solución de la sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio que, siendo inicialmente transparente e incolora, se transforma en una sustancia no difusa de color rojo de diversas intensidades denominada formazan. Ésta reducción produce distintas coloraciones en ciertas áreas de la semilla y permite diferenciar los tejidos vivos y sanos de aquellos débiles, deteriorados y muertos (AOSA, 2002; Arango y Craviotto, 2002; Flores et al., 2011, Gallo et al., 2015).

Para obtener una tinción correcta para la evaluación, las semillas deben ser pre-acondicionadas y preparadas por hidratación y sección o pelado (AOSA, 2010). Las semillas embebidas son menos frágiles que las secas, por lo que se pueden cortar, pinchar o pelar con mayor facilidad, y el teñido será más parejo facilitando la evaluación (Arango, 2017). El escarificado químico puede ser una herramienta útil para el pre-acondicionamiento, ya que mejora la imbibición al eliminar los tegumentos (Catraro et al., 2018), esto puede facilitar la tinción de las semillas. El manual AOSA (2010) recomienda para especies de la familia *Rutáceas* sumergir las semillas en agua a 21°C durante 18 h, para luego realizar un corte longitudinal con bisturí a través de la mitad del embrión y $\frac{3}{4}$ del endosperma.

Después de la incubación en la solución de TZ, se pueden observar diferentes intensidades de tinción debido a la tasa de absorción de la solución por parte de los tejidos de las semillas. Debe evitarse una tinción demasiado oscura modificando la concentración de TZ en la solución o el tiempo y/o la temperatura de incubación (Enescu, 1991).

Esta prueba de viabilidad no solo nos revela aspectos esenciales para conocer la calidad del lote, sino que también puede servir de guía para evaluar lotes de semillas con dormición profunda o con presencia de algún tipo de latencia que muestran una germinación lenta que dificulta realizar las pruebas de germinación pero que no debe confundirse con una mala calidad, y también para detectar daños de cosecha y procesamiento (calor, mecánicos, por insectos) (Arango, 2017; Ruiz, 2009).

Existen antecedentes de ésta prueba para determinar viabilidad en semillas de la familia *Rutáceas*, y del género *Poncirus*. Sin embargo, los protocolos propuestos varían en el tiempo de incubación y en la concentración de la sal de TZ (AOSA, 2010; Carvalho et al., 2002; Moore, 1985; Usberti y Felipe, 1980). Carvalho et al. (2002) utilizaron en *Citrumelo swingle* una concentración de 0,5% de TZ durante 6 h. Para el género *Poncirus* ISTA (1991) propone de 6 a 24 h de incubación y una concentración entre 0,1 y 1%, mientras que AOSA (2010) sugiere para la familia *Rutáceas* un tiempo de exposición de 18 h y una concentración del 1%. Estas variaciones en la aplicación de la prueba a diferentes especies apuntan a la necesidad de ajustar el protocolo para *Poncirus*. Una combinación adecuada de la concentración, del tiempo y la temperatura de incubación permitirá tinciones nítidas para poder determinar el estado fisiológico de los tejidos y estructuras de las semillas de una manera más rápida, económica y eficiente (Craviotto et al., 2011).

Los objetivos de esta investigación fueron determinar la combinación más adecuada de concentración de TZ y tiempo de incubación y evaluar el efecto del escarificado químico sobre la tinción para la prueba de viabilidad en semillas de *Poncirus trifoliata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario - Campo Experimental J. Villarino. Localidad de Zavalla y en los laboratorios de semillas de la Estación Experimental INTA Oliveros, provincia de Santa Fe, Argentina.

Se utilizaron semillas certificadas en su sanidad provenientes del Centro de Incremento Regional de Material Cítrico (CIR) de INTA San Pedro.

En el mes de mayo fueron cosechados al azar los frutos maduros de un lote de 4 plantas formando una muestra homogeneizada del mismo. Se extrajeron las semillas, se les realizaron tres lavados y se dejaron orear al aire. Luego se almacenaron en bolsas de papel de 1 kg envueltas a su vez en bolsas plásticas impermeables, y se llevaron a cámara fría a 5°C hasta el mes de septiembre en el que se realizaron los ensayos.

Se efectuó un experimento preliminar para evaluar la concentración y el tiempo de incubación propuesto por diferentes asociaciones de analistas de semillas para la prueba de viabilidad de TZ. Tanto para la familia *Rutaceae* como para el género *Poncirus*, la concentración recomendada fue del 1%, con 18-24 h de incubación, a 33°C y en oscuridad total (ISTA, 1991; AOSA, 2010). Los resultados obtenidos sirvieron para definir los diferentes tratamientos necesarios para ajustar la prueba a la especie *P. trifoliata*.

El experimento se realizó mediante un Diseño Factorial 2x2x2 con 3 factores y 2 niveles en cada factor: escarificado químico (escarificado químico (EQ) y sin escarificar (SE)), concentración de TZ (0,2 y 0,5%) y tiempo de incubación (3 y 5 h), dando como resultado ocho tratamientos: T1: EQ, 0,2%, 3 h; T2: EQ, 0,5%, 3 h; T3: EQ, 0,2%, 5h; T4: EQ, 0,5%, 5 h; T5: SE, 0,2%, 3 h; T6: SE, 0,5%, 3 h; T7: SE, 0,2%, 5 h; T8: SE, 0,5%, 5 h. Para cada tratamiento se utilizaron dos repeticiones de 50 semillas como unidad experimental.

Las semillas de los tratamientos con escarificado químico se hidrataron durante 12 h según protocolo de escarificado, luego se las colocó en una solución de 50% v/v de concentración de hipoclorito de sodio al 5% en agua destilada en una proporción de 4 L de solución/Kg de semillas y a una temperatura de 36°C, removiendo cada media hora hasta constatar el desprendimiento de los tegumentos (Cattraro et al., 2018).

Las semillas de todos los tratamientos fueron pre-acondicionadas para su tinción según las indicaciones de AOSA (2010) para la familia *Rutáceas*. Se remojaron en agua a 21°C durante 18 h, realizando luego un corte a través de la bisectriz del eje embrionario, y conservando suficiente tegumento o zona distal para mantener juntas las dos mitades.

Las semillas de cada tratamiento se colocaron en frascos de 250 cm³ y se las cubrió con la solución de TZ, se taparon con film y se llevaron a baño termostático a 33°C y en oscuridad para su incubación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada tratamiento, se retiraron los recipientes del baño, se eliminó la solución y se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Las semillas se mantuvieron

sumergidas en agua hasta el momento de su evaluación. Se realizó la observación visual con lupa binocular para determinar la viabilidad mediante la interpretación de las tinciones de las semillas, y se tomaron las imágenes correspondientes con cámara digital IAI CV-S 3200 JAPAN MACRO NAVITAR 0.7 – 4.0; Lentilla 0.5 – 0.2 X (INTA Oliveros).

Las semillas fueron clasificadas como viables o no viables a partir de la utilización de los patrones que se establecieron teniendo en cuenta, lo determinado por el Manual AOSA (2010) para la familia *Rutáceas* (géneros *Citrus*, *Dictamnus*, *Ruta*), y otras especificaciones establecidas en base a las hojas de trabajo para la Prueba Topográfica por TZ confeccionadas para la familia *Asteraceas* por el Laboratorio de semillas de la EEA INTA Oliveros. Con los datos obtenidos de cada tratamiento se calculó el porcentaje de viabilidad.

Los datos se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2008), realizándose el Análisis de la Variancia y la Comparación de las medias de los tratamientos a través del test de Tukey con un nivel de significación de 0,05. A partir de los resultados se determinó el tratamiento que define la tinción más adecuada para cuantificar la viabilidad de las semillas de *Poncirus trifoliata*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La exposición de las semillas de *P. trifoliata* a una concentración del 1% de la sal de TZ durante 18 y 24 h fue excesiva, ocasionando tinciones oscuras y opacas, que dificultaron realizar una correcta interpretación de la viabilidad de los tejidos (Fig. 1). Si bien esta concentración es la recomendada por la AOSA (2010) e ISTA (1991) para la familia *Rutáceas*, provoca una coloración indeseable al igual que lo observado en semillas de nogal negro (Flores et al., 2011).



FIGURA 1 / FIGURE 1

Tinción obtenida a partir de la incubación en sal de TZ a una concentración del 1% por 18 h (a) y 24 h (b) en semillas de *P. trifoliata*. / *Poncirus trifoliata* seeds staining for *Tetrazolium* viability test with 1% TZ concentration and 18 h (a) and 24 h (b) incubation time.

Se observó la existencia de diferencias significativas para los factores concentración ($F=5,71$; $p < 0,05$) y tiempo de exposición al TZ ($F=14,63$; $p < 0,005$). También hubo una interacción significativa entre ambas variables ($F=9,66$; $p < 0,01$). Esto se explica debido a que en los tratamientos con 0,5% de concentración de TZ y 3 o 5 h de incubación, las semillas proporcionaron valores similares de viabilidad, tanto en semillas escarificadas como en las sin escarificar, mientras que cuando se bajó la concentración al 0,2 %, y se aumentó el tiempo de incubación de 3 a 5 h, se alcanzó un valor superior de viabilidad a los obtenidos en los otros tratamientos.

De todos los tratamientos evaluados, seis de ellos proporcionaron resultados satisfactorios, con las mismas posibilidades de ser utilizados (Fig. 2). No obstante, tal como lo plantean otros investigadores, los criterios de selección deben basarse en qué combinación de concentración de TZ y tiempo de incubación da como resultado la mejor tinción para una evaluación rápida, económica y eficiente de la condición fisiológica de los

tejidos y estructuras de las semillas, pero también para reducir los costos del análisis y el impacto ambiental al disminuir los desechos tóxicos (Craviotto et al., 2011; Flores et al., 2011).

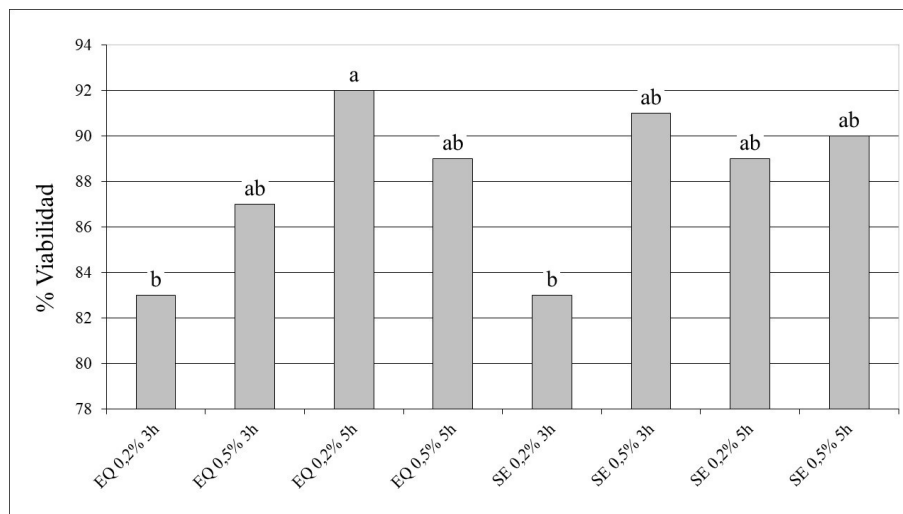


FIGURA 2 / FIGURE 2

Porcentaje de Viabilidad obtenido en los diferentes tratamientos según la interpretación de las distintas tinciones logradas. EQ: escarificado químico; SE: sin escarificar. Los valores siguiendo la abreviación EQ y SE indican la concentración de la sal de TZ y el tiempo de incubación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según ANOVA y Comparación de medias a través del test de Tukey con un nivel de significación $p < 0.05$. $n=50$. / *Viability percentage of Poncirus trifoliata seeds according to the interpretation of staining for different combinations of Tetrazolium concentration and incubation time of scarified seeds (EQ) and unscarified seeds (SE), using the Tetrazolium viability test. Different letters indicate significant differences by ANOVA and comparison of means using Tukey's test $p < 0.05$ significance level $n=50$.*

Los tratamientos que utilizaron la menor concentración de TZ (0,2%) y el menor tiempo de exposición (3 h) no fueron recomendables, tanto en semillas peladas químicamente como en las semillas sin pelar (Fig. 2). Las tinciones obtenidas presentaron coloraciones rosadas pálidas que pueden ocasionar una interpretación equívoca de la viabilidad por parte del técnico-analista, pudiendo subestimar la viabilidad del lote de semillas (Fig. 4).

Usberti y Felipe (1980) utilizaron en *Citrus limonia* una combinación del 0,5% de concentración de TZ y 3 h, precisamente uno de los seis tratamientos que fueron considerados como satisfactorios en la presente investigación. No obstante, el tratamiento recomendado (T7) permitió obtener coloraciones adecuadas, brillantes, con tejidos turgentes (Fig. 3b), utilizando la menor concentración de TZ (0,2 %). Además, las imágenes topográficas obtenidas fueron muy nítidas y permitieron establecer con seguridad el estado fisiológico de los tejidos y estructuras de las semillas, evitando problemas de contaminación y deterioro de las muestras a evaluar (Enescu, 1991; Craviotto et al., 2011; Flores et al., 2011).

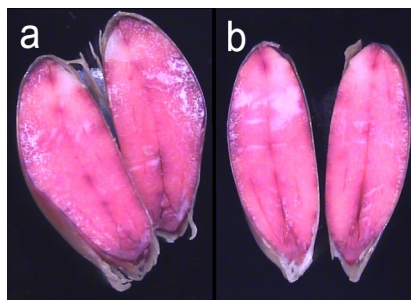


FIGURA 3 / FIGURE 3

Tinción obtenida con una combinación de concentración de 0,5% TZ y tiempo de incubación de 3 h (a) y con concentración de TZ al 0,2% y tiempo de incubación de 5 h (b), en semillas de *Poncirus trifoliata* utilizando la prueba de viabilidad con TZ / *Staining obtained with a combination of 0,5% TZ concentration and 3 h incubation time (a) and with 0.2% TZ concentration and 5 h incubation time (b), in Poncirus trifoliata seeds using the Tetrazolium viability test.*



FIGURA 4 / FIGURE 4

Tinción obtenida con una combinación de concentración de 0,2% TZ y tiempo de incubación de 3 h en semillas de *Poncirus trifoliata* utilizando la prueba de viabilidad con TZ. / *Staining obtained with a combination of 0,2% TZ concentration and 3 h incubation time in Poncirus trifoliata seeds using the Tetrazolium viability test.*

Los resultados indicaron que no es necesario realizar el pelado químico previo a la tinción de las semillas ($F=0.51$; $p<0.49$), lo que puede atribuirse a su clasificación de semillas recalcitrantes. Estas semillas se almacenan con elevados contenidos de humedad interna, lo cual favorece las tinciones sin necesidad de recurrir a tratamientos que aceleren la imbibición (Berjak et al., 1990; Kermodé y Finch-Savage, 2002).

CONCLUSIONES

Se recomienda una combinación de 0,2% de concentración de sal de TZ y 5 h de incubación sin escarificado químico de semillas para realizar la prueba de manera precisa y eficiente con un menor uso de recursos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Roque Craviotto y al personal del laboratorio de semillas de EEA INTA Oliveros por su asesoría y asistencia técnica; En Ing. Agr. Leonardo García por su colaboración y asesoramiento

técnico. Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional de Rosario (Proyecto 1AGR308. C.S. N° 139/2019).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, C. (1996) *Portainjertos*. En Manual para Productores de naranja y mandarina de la región del Río Uruguay. Diversificación Productiva. Fabiani, A., Mika, R., Larocca, L. & Anderson, C. (Eds.). Manual Serie A N° 2. EEA INTA (Concordia, Entre Ríos).
- AOSA (Association of Official Seed Analysts) (2002). *Seed vigor testing handbook*, AOSA Contribution No. 32. (Washington, DC, USA: AOSA).
- AOSA (Association of Official Seed Analysts) (2010). *Tetrazolium Testing Handbook*.
- Arango, M. (2017). *Análisis de semillas, Viabilidad*. 75° Curso Taller Viabilidad y Vigor por Tetrazolio en Semillas de Maíz, Sorgo, Girasol y Arveja. (EEA INTA Oliveros. Santa Fe. Argentina).
- Arango, M.R. & Craviotto, R.M. (2002). *Calidad de Semillas de Soja*. Revista IDIA XXI 3, 24-28.
- Berjak, P., Farrant, J.M., Mycock, D.J. & Pammenter, N.W. (1990). *Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity*. Seed Science and Technology 18: 297-310.
- Carvalho, J.A., Vilela Resende Von Pinho, E., Oliveira, J.A., Mendes Guimarães, R. & Bonome, L.T. (2002). *Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Citromelo swingle*. Revista Brasileira de Sementes 24(1): 263-270.
- Catraró, M., Poggi, D., Quadrelli, A., García, L., Gariglio, N. & Flores, P. (2018). *Imbibition and Vigor of Chemically Scarified Poncirus trifoliata Seeds*. Seed Technology 39(1): 53-62.
- Craviotto, R.M., Arango Perarnau, M. & Gallo, C. (2011). *Novedades de la prueba de viabilidad por tetrazolio en soja para mejorar la producción* 46. INTA EEA Oliveros. p. 99-104.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2008) InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Enescu, V. (1991). *The tetrazolium test of viability*, En Tree and shrub seed handbook. Gordon, A.G., Gosling, P.G. & Wang, B.S.P. eds. ISTA, (Zurich, Switzerland). 9: 1-7.
- Flores, P.C., Poggi, D.R., Garcia, S.M. & Gariglio, N.F. (2011). *Topographic tetrazolium testing of black walnut (Juglans nigra L.) seeds*. Seed Science and Technology. 39: 230-235.
- Gallo, C., França-Neto, J.B., Arango, M., Gonzalez, S., Francomano, V., Carracedo, C., Costa, O., Alves, R. & Craviotto, R. (2015). *Validación de la prueba de tetrazolio como método de vigor para semillas de Glycine max*. [Online] Disponible en: <https://inta.gov.ar/documentos/validacion-de-la-prueba-de-tetrazolio-como-metodo-de-vigor-para-semillas-de-glycine-max>
- ISTA (International Seed Testing Association) (1991). *The tetrazolium test of viability*. En Tree and shrub seed handbook. Gordon, A.G.; Gosling, P.G., & Wang, B.S.P. (Eds.) (Zurich, Switzerland) pp. 1-19.
- ISTA (International Seed Testing Association) (2010). *Internacional Rules for Seed Testing*. (Basserdorf, CH-Switzerland).
- Kermode, A.R. & Finch-Savage, W.E. (2002). *Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development*. En Desiccation and Survival in Plants. Drying without Dying. Black, M. & Pritchard, H.W. (Eds.) (Wallingford: CABI) pp. 149-184.
- Lakon, G. & Bulat, H. (1956). The establishment of viability of deciduous tree seeds by the topographical tetrazolium method. IV. The *Betulaceae* and *Juglandaceae* Saatgut Wirtsch, 8, 81-84. Handbook on Tetrazolium Testing. ISTA 1985
- Moore, R.P. (1985). Handbook on tetrazolium testing. (International Seed Testing Association, Zurich).
- Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B. & Radmann, E.B. (2006). Escarificação química da semente para favorecer a emergência e o crescimento do porta-enxerto Trifoliata. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41(9): 1429-1433.
- Palacios, J. (2005). Citricultura. (Tucumán, Argentina. Editorial Alfa Beta S.A.).

- Ruiz, M.Á. (2009). El Análisis de Tetrazolio en el Control de Calidad de las Semillas. Publicación Técnica N° 77. (EEA INTA Anguil).
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2017). Normativa general del programa nacional de sanidad de material de propagación vegetal (viveros). [online] Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/produccion-primaria/normativa>
- Spiegel-Roy, P. y Goldschmidt, E. (1996). Biology of Citrus. Cambridge: Cambridge University Press.
- Teixeira, P. de T.L., Schäfer, G., Dutra de Souza, P. & Todeschini, A. (2009). A Escarificação química e o desenvolvimento inicial de porta-enxertos cítricos. Revista Brasileira de Fruticultura 31(3): 865-871.
- Usberti, R. & Felipe, G. (1980). Viabilidade de sementes de *Citrus limonia* Osb. Com baxoteor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 15(4): 393-397.