

Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. *

Bruno Degaspari Minardi¹, Ana Paula Lorenzen Voytena,
Áurea Maria Randi & Gilmar Roberto Zaffari.

Enviado em maio de 2011; aceito em outubro de 2011.

Resumo

O *Butia eriospatha* apresenta um processo de germinação lento e desuniforme. Estudos apontam que espécies nativas do gênero *Butia* estão sofrendo uma série de interferências antrópicas e absorvendo este impacto de tal forma a serem consideradas em risco de extinção. A viabilidade dos embriões e a dormência das sementes são os fatores que interferem significativamente na germinação de sementes. A extração do embrião zigótico e posterior embebição em solução de tetrazólio 0,5% por um período de cinco horas em temperatura ambiente na ausência de luminosidade resultou em 80% de embriões viáveis de *B. eriospatha*. Com o objetivo de superar dormência das sementes, foram utilizados diferentes tratamentos de quebra de dormência sendo as maiores taxas de germinação obtidas com embriões excisados e cultivados na ausência de luz. Os meios de cultura utilizados no cultivo dos embriões zigóticos continham variações na concentração de carvão ativado e glutamina para estimular a germinação e desenvolvimento *in vitro* das plântulas. A inoculação dos explantes em meio MS sólido adicionado de 2,4-D (0,5 mg.L⁻¹), acrescido de carvão ativado (0,25%) e glutamina (0,5 g.L⁻¹), promoveu o maior índice de germinação e o melhor desenvolvimento da plântula. A ausência de carvão ativado induziu a formação de calo, independente da concentração de glutamina. Os resultados do presente trabalho demonstram a viabilidade da produção de mudas *in vitro* de *B. eriospatha* a partir do embrião zigótico.

Palavras-chave: *Butia eriospatha*, tetrazólio, quebra da dormência, germinação *in vitro*.

Doi: 10.5007/2178-4574.2011v40p70

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Botânica, CEP 88040-900, Florianópolis-SC, Brasil, e-mail: brunominardi@hotmail.com



Este artigo é de Acesso Livre, disponibilizado sob os termos da Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) que permite uso não-comercial, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que este trabalho original seja devidamente citado.

Abstract

[*In vitro* culture of zygotic embryos of *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc.]

The *Butia eriospatha* presents a slow and uneven germination process. Studies show that native species of the genus *Butia* are suffering a serie of anthropogenic interference and absorbing this impact in such a way as to be considered at risk of extinction. The embryos viability and seed dormancy are the factors that significantly interfere with the germination of seeds. The extraction of zygotic embryo and subsequent immersion in tetrazolium solution 0.5% for a period of five hours at room temperature in the absence of light resulted in 80% of viable embryos of *B. eriospatha*. In order to overcome seed dormancy, were used different treatments of break dormancy and the highest rates of germination obtained with excised embryos and cultured in the absence of light. The culture media used for cultivation of zygotic embryos contained variations in the concentration of activated charcoal and glutamine to stimulate germination and development in vitro of the seedling. The inoculation of the explants on solid MS medium supplemented with 2,4-D (0.5 mg.L⁻¹) plus activated charcoal (0.25%) and glutamine (0.5 g.L⁻¹), promoted the highest rate of germination and better seedling development. The absence of activated charcoal induced callus formation, regardless of glutamine concentration. The results of this study demonstrate the feasibility of production of in vitro seedlings of *B. eriospatha* from the zygotic embryo.

Key words: *Butia eriospatha*, tetrazolium break dormancy, germination *in vitro*.

Introdução

Dentre as diferentes espécies de palmeiras, o *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. (Arecaceae) destaca-se por possuir alto valor ornamental, sendo amplamente utilizado em projetos paisagísticos, além de possuir frutos comestíveis muito apreciados pela fauna silvestre. Também conhecido como butiá-da-serra ou macuma, a espécie possui caule simples, ereto, com 50 cm de diâmetro, e de 3 a 6 metros de altura. Seus frutos são suculentos e globulosos, com sabor adocicado e epicarpo amarelo na maturidade (Lorenzi & Souza 1996). É uma espécie nativa do domínio fitogeográfico Mata Atlântica, ocupando áreas de Floresta Ombrófila Mista e Formações Campestres (Stehmann *et al.* 2009).

O *B. eriospatha* sofre sério risco de extinção por habitar regiões com economia baseada na agropecuária e especulação imobiliária, estando incluído como espécie vulnerável na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) e no Anexo I do Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Stehmann *et al.* 2009). Se não bastassem os problemas antrópicos, o butiá apresenta muitas dificuldades em diferentes aspectos do processo reprodutivo. Suas sementes apresentam um índice muito baixo de germinação, em torno de 20 a 25%, com um período muito longo para a emergência da plântula (Carpenter 1988). O desenvolvimento de uma técnica de cultivo *in vitro* para *B. eriospatha* é uma opção

biotecnológica que visa à produção em larga escala, com qualidade fitossanitária e genética assegurada, padronizando o material. O cultivo de embriões zigóticos *in vitro* vem sendo empregado para superar a dormência de sementes, em testes de viabilidade de sementes, no estudo de aspectos fisiológicos da germinação e como fonte de explantes como tecidos de elevada totipotência. Por estarem alojados em ambiente asséptico dentro da semente, os embriões são considerados fontes de explante com baixo índice de contaminação (Hu *et al.* 1998). Alguns fatores são importantes na cultura de embriões, como a escolha de um meio de cultura adequado para o desenvolvimento, condições de luminosidade e temperatura, utilização de reguladores de crescimento, condições da planta matriz e a qualidade dos explantes (Pierik 1997; Andrade 1998). Dentre os componentes do meio de cultura, a glutamina é uma fonte de nitrogênio orgânica comumente utilizada em meios de cultura de plantas superiores, sendo seu envolvimento benéfico na suplementação do meio de cultura relatado por vários pesquisadores (Franklin & Dixon 1994). O carvão ativado, pela sua capacidade de adsorver substâncias inibitórias do meio de cultura ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de embriões, podendo ser utilizado com sucesso por diferentes culturas em concentrações de 0,2 a 3,0% (Pasqual 1990). Visando selecionar lotes de sementes com alta viabilidade, o teste do tetrazólio vem sendo utilizado em programas de controle de qualidade de sementes, pois é um método simples, extremamente rápido e com baixo custo que estima a germinação potencial e o vigor fisiológico de lotes de sementes (Hampton & Coolbear 1990).

Como o número de trabalhos publicados sobre a espécie *B. eriospatha* é extremamente restrito, e é crescente a importância ambiental e econômica desta espécie, é de suma importância a realização de estudos pela procura de métodos mais eficientes de cultivo, para viabilizar a comercialização e diminuir os problemas antrópicos e genéticos sofridos pela espécie.

Material e Métodos

Para os ensaios de micropropagação *in vitro* de *B. eriospatha* foram utilizados frutos coletados de diversas matrizes, em área de ocorrência natural na região de Monte Carlo – SC, em 2007. Após a coleta, os frutos passaram por um processo de beneficiamento para a retirada da polpa, e lavagem em água corrente. Após a secagem em local fresco e arejado, as sementes foram colocadas em saco plástico e armazenadas em câmara seca, a temperatura de 6° C.

Para realização do teste com tetrazólio, as sementes foram retiradas do tegumento, os embriões excisados e em seguida imersos em água destilada por aproximadamente duas horas. Logo após, foram colocados em diferentes concentrações da solução de tetrazólio (0,25%; 0,5% e 1%), em tempos diferenciados de embebição (três e cinco horas) sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ$ C) na ausência de luz, baseando-se nas informações estabelecidas pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009). Posteriormente à embebição na solução de tetrazólio, os

embriões foram lavados em água destilada e analisados quanto à obtenção de coloração, diferindo tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem.

Na germinação *in vitro* dos embriões, os mesmos foram excisados sob condições assépticas e imersos em água destilada esterilizada. Então, foi realizada a desinfestação dos embriões com NaClO 0,5% por 30 segundos, seguida de três lavagens com água destilada esterilizada. Os embriões foram inoculados em frascos de vidro contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), adicionado de ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D) ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), com diferentes concentrações de carvão ativado (0,0; 0,1; 0,25; 0,5 %) em combinação com diferentes concentrações de glutamina (0,0; 0,25; 0,5; 1,0 g.L^{-1}). As culturas com os embriões foram mantidas por 21 dias em sala de crescimento, a $28 \pm 1^\circ \text{C}$, na ausência de luz. Após este período os explantes foram transferidos para sala de crescimento a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ sob irradiância de $40 - 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas. A porcentagem de crescimento do embrião foi avaliada aos 30 dias após a inoculação, sendo também obtido o número de plântulas com má formação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4×4 , com dez repetições, sendo cada repetição composta por um explante, totalizando 160 frascos.

Com o objetivo de analisar os efeitos de 2,4-D sobre o desenvolvimento dos embriões zigóticos, foram testados dois meios de cultura: TA1= meio de cultura sólido MS, adicionado de 2,4-D ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), Carvão Ativado (0,3 %) e Glutamina ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); e TA2= meio de cultura sólido MS, adicionado de Carvão Ativado (0,3 %), e Glutamina ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). A porcentagem de germinação foi avaliada aos 30 dias após a inoculação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dez repetições em cada tratamento sendo cada uma composta por um embrião zigótico, totalizando 20 explantes.

Os dados obtidos de cada experimento foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Através dos resultados obtidos no teste do tetrazólio, verificou-se que a coloração mais uniforme e coerente, segundo as recomendações de Moore (1972), para a realização da avaliação do teste em embriões de *B. eriopatha*, é a embebição em solução de tetrazólio 0,5% por um período de 5 horas sob temperatura ambiente e ausência de luz. Com este procedimento foi possível distinguir os embriões viáveis (Fig. 1A) dos embriões não viáveis (Fig. 1B), de acordo com as Regras para Análises de Sementes (Brasil 2009). Os tecidos potencialmente vigorosos coloriram-se de róseo escuro, enquanto os tecidos em deterioração ou lesionados apresentaram uma coloração marrom clara. A concentração de tetrazólio 0,25% não foi suficiente para avaliar a viabilidade dos embriões em nenhum dos tempos empregados. Nas concentrações de tetrazólio 0,5% e 1% os resultados foram satisfatórios em embriões

embebidos por 5 horas, apresentando resultados semelhantes para ambas as concentrações, justificando a escolha pela concentração de 0,5%. O resultado obtido contrasta apenas no tempo de embebição com Fernandes (2007), onde se verificou para *Butia capitata* melhores resultados na concentração de tetrazólio 0,5%, porém com um período de exposição de 4 horas. As menores concentrações da solução de tetrazólio são as mais indicadas, pois apresentam menor dispêndio de recursos e tornam possível uma melhor visualização dos distúrbios de coloração e identificação de diferentes tipos de injúria (França Neto *et al.* 1999).

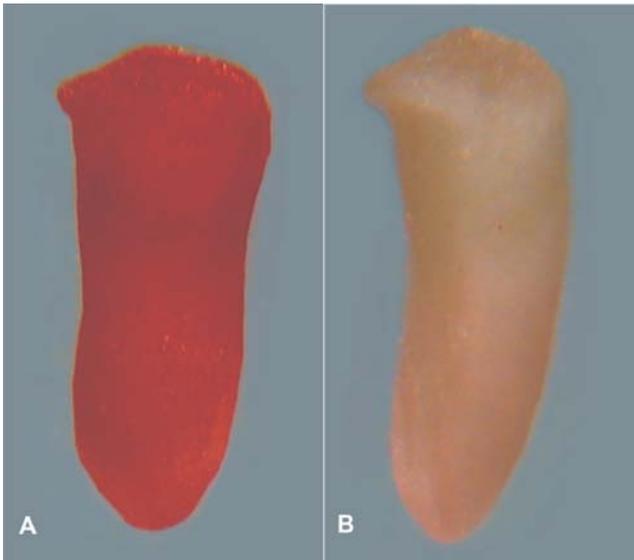


Figura 1. Embriões zigóticos de *Butia eriospatha*. **A.** Embrião viável pelo teste do tetrazólio a 0,5 %; **B.** Embrião não viável pelo teste de tetrazólio a 0,5 %.

O processo de assepsia utilizado na desinfestação dos embriões zigóticos foi eficiente, não sendo observada nenhuma contaminação bacteriana ou fúngica ao longo do período de condução do experimento. Nos primeiros dias após a inoculação dos embriões, notou-se um acentuado intumescimento dos mesmos, principalmente na região do eixo embrionário. Na segunda semana de incubação, observaram-se os primeiros sinais de crescimento através do desenvolvimento da radícula e posterior aparecimento do coleótilo por meio de uma abertura longitudinal localizada na porção distal do haustório

Conforme Figura 2, nos tratamentos T1-T4, onde o meio de cultura MS foi adicionado de diferentes concentrações de glutamina na ausência de carvão ativado,

não foi observado o desenvolvimento dos embriões. Por outro lado, os tratamentos T5-T8, que continham carvão ativado 0,1 % adicionados ou não de glutamina, promoveram a germinação dos embriões zigóticos, variando de 30 a 50%. Quando a concentração de carvão ativado adicionada ao meio de cultura foi aumentada para 0,25% (T9-T12) e 0,50% (tratamentos T13-T16), a taxa de germinação dos embriões variou de 0 a 60% e de 20 a 40%, respectivamente, havendo diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Estes resultados demonstram a necessidade da utilização do carvão ativado para germinação *in vitro* dos embriões zigóticos, devido à capacidade de adsorver substâncias tóxicas encontradas no meio de cultura, como impurezas que podem estar presentes nos nutrientes utilizados para a elaboração dos meios de cultura e ainda adsorver substâncias indesejadas liberadas pelo próprio explante (Pasqual 1990). Em contrapartida, Tomaz *et al.* (2001) notaram que o carvão ativado influenciou negativamente a germinação de embriões zigóticos de *Citrus sinensis*, conferindo tal efeito à capacidade do carvão ativado em adsorver compostos essenciais para o processo de germinação, podendo até interferir na quantidade real de reguladores de crescimento disponíveis para os explantes.

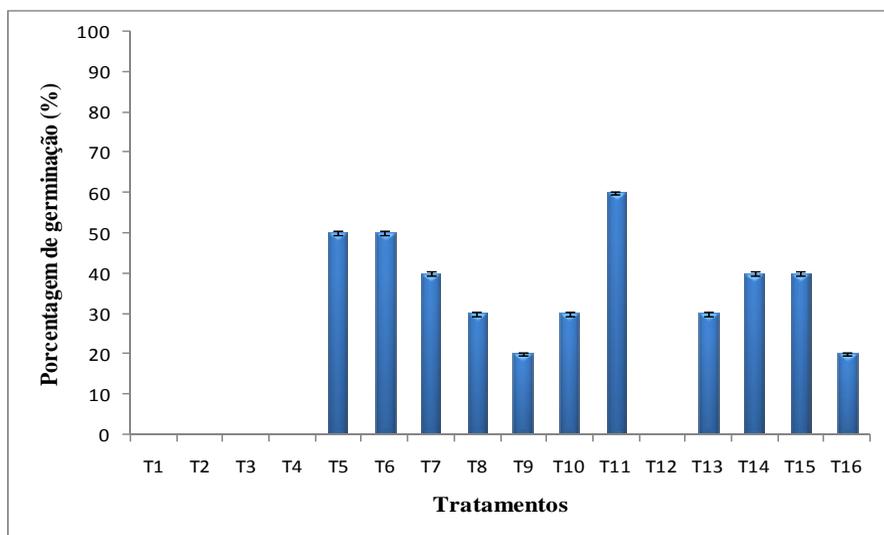


Figura 2. Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de *B. eriospatha* mantidos em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) adicionado de ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D) ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e diferentes concentrações de carvão ativado (CA) e Glutamina (GLUT), durante 30 dias de cultivo *in vitro*. **T1 a T4** = MS+0,5mg.L⁻¹ 2,4-D e GLUT 0; 0,25; 0,5 e 1,00 g.L⁻¹ respectivamente; **T5 a T8** = MS+0,5mg.L⁻¹ 2,4-D +0,10% CA e GLUT 0; 0,25; 0,5 e 1,00 g.L⁻¹ respectivamente; **T9 a T12**= MS+0,5mg.L⁻¹ 2,4-D +0,25% CA e GLUT 0; 0,25; 0,5 e 1,00 g.L⁻¹ respectivamente; **T13 a T16** = MS+0,5mg.L⁻¹ 2,4-D +0,50% CA e GLUT 0; 0,25; 0,5 e 1,00 g.L⁻¹ respectivamente.

A concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ da auxina sintética 2,4-D utilizada no meio MS foi definida a partir de experimento onde se comparou o índice de germinação dos embriões, tanto na presença quanto na ausência deste regulador (Fig. 3). A presença de auxina no meio de cultura promoveu um alto índice de germinação dos embriões zigóticos (80%), enquanto que no meio desprovido de 2,4-D a germinação foi de 50% ao final de sessenta dias. Estes resultados sugerem que a utilização da auxina 2,4-D nos meios de cultura estimulou a germinação de embriões zigóticos de *B. eriospatha*. As auxinas são classes de fitorreguladores utilizados na cultura *in vitro*, ainda que com menor frequência e em concentrações inferiores. Estas podem ser necessárias para complementar o teor endógeno de hormônio, porém, em quantidades excessivas, estimulam a produção de calo (Grattapaglia & Machado 1998).

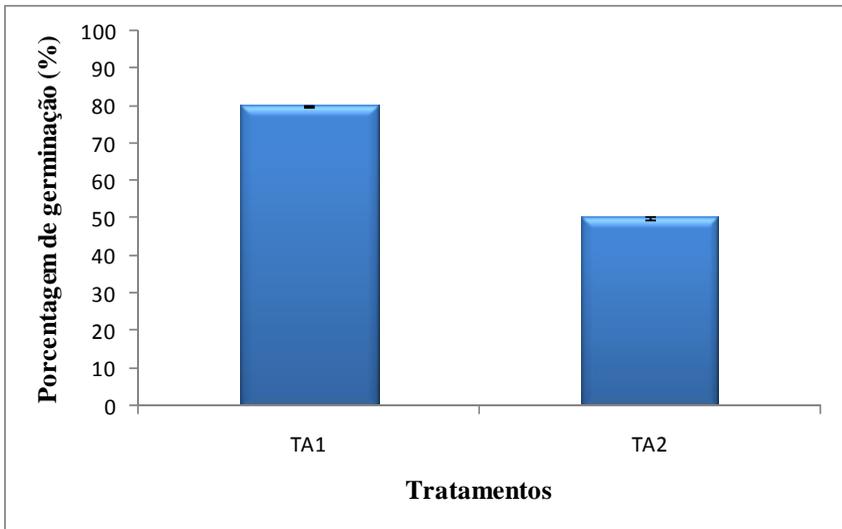


Figura 3. Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de *B. eriospatha* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) adicionado de carvão ativado (CA) (0,3 %), Glutamina (GLUT) ($0,50 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D) ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), após 60 dias *in vitro*. TA1 = MS + 0,3% CA + $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ GLUT + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D; TA2 = MS + 0,3% CA + $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ GLUT.

Conforme a Tabela 1, foi observado que a presença isolada de 2,4-D no meio de cultura promoveu a formação apenas de calo, e a combinação de 2,4-D com carvão ativado estimulou o desenvolvimento normal do embrião. Nos meios de cultura acrescidos de carvão ativado, independente da concentração utilizada, não ocorreu formação de calo, evidenciando a capacidade de adsorção desta substância sobre reguladores de crescimento. Ribeiro *et al.* (2000), em estudos com *Citrus limonia*

Osbeck x Poncirus trifoliata, constataram a eficiência do carvão ativado no cultivo de embriões, porém em altas concentrações, ele interagiu antagonicamente com a giberelina (GA_3), causando uma queda na germinação. Os dois maiores índices de plantas normais ocorreram em tratamentos com 0,1% de carvão ativado + 0,5 g.L⁻¹ de glutamina (T7) e 0,25% de carvão ativado + 0,5 g.L⁻¹ de glutamina (T11) com 40% e 50%, respectivamente, de plântulas normais. Os tratamentos com 0,0% (T1-T4) e 0,5% (T13-T16) de carvão ativado apresentaram um índice baixo de germinação dos embriões zigóticos, variando de 0 a 20%, respectivamente.

Estes resultados demonstram que, apesar da glutamina não possuir efeito significativo no processo de germinação, este aminoácido possui importância no desenvolvimento *in vitro* da plântula. Algumas formas orgânicas de nitrogênio são utilizadas em cultura de tecidos: misturas complexas de compostos nitrogenados, como extrato de levedura, extrato de malte, glutamina e caseína hidrolisada, estimulando o crescimento de algumas espécies *in vitro* (Torres 1998). Dantas *et al.* (2002), em estudos com embriões de macieira *in vitro*, obtiveram a maior porcentagem de germinação no tratamento com caseína hidrolisada. Durante o desenvolvimento celular, a assimilação do nitrogênio contribui para o aumento de macromoléculas e componentes celulares, importantes para a regulação dos processos metabólicos do crescimento celular, causando o aumento de tamanho e quantidade de células dos explantes (Durzan 1985). O carvão ativado, além de otimizar a germinação dos embriões, também foi importante na manutenção fisiológica da plântula, gerando um ambiente adequado para o desenvolvimento normal dos embriões de *B. eriospatha*, possivelmente pela sua característica adsorvente. Grattapaglia & Machado (1998) observaram que em concentrações de 0,1 a 2% o carvão ativado pode ser benéfico em alguns casos para o desenvolvimento *in vitro*, por adsorver substâncias tóxicas, especialmente fenóis e/ou quinonas que podem afetar o desenvolvimento normal do explante. Léo *et al.* (2007), alcançaram um índice de 100% de plantas normais de *Hancornia speciosa* com o uso de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado.

As mortes de explantes ocasionadas por ressecamento foi baixa, porém evidenciada em todas as diferentes concentrações de carvão ativado, com menor frequência nos meios com 0,25% da substância. O escurecimento e o ressecamento são problemas frequentemente encontrados durante os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião *in vitro* e ocorrem devido à produção excessiva de polifenóis, utilizados, provavelmente como mecanismo de defesa. Estas substâncias são indesejadas para o cultivo e devem ser evitadas ou eliminadas. O carvão ativado e ácido ascórbico são os antioxidantes químicos mais amplamente utilizados em diversos protocolos (George 1996). Melo *et al.* (2001), estudando diferentes tipos de antioxidantes para o cultivo de embriões de *Syagrus oleracea* obtiveram 90,45% de embriões viáveis com a utilização de carvão ativado, enquanto o controle alcançou 60,39% sem a adição do mesmo. Silva (2002) constatou que, a adição de carvão

ativado foi indispensável para todos os meios testados na germinação de *Cocos nucifera*, mostrando-se eficiente na eliminação do escurecimento por oxidação.

Conclusões

No presente trabalho foi estabelecido um protocolo para germinação *in vitro* de *B. eriospatha* através da cultura de embriões zigóticos. Também foi descrita uma metodologia para avaliação da viabilidade dos embriões através do uso do tetrazólio. O protocolo descrito para assepsia dos embriões foi eficiente, evitando a propagação de fungos e bactérias e não causando dano ao material de propagação. A utilização de embriões zigóticos como fonte de explante, facilita o estabelecimento de culturas assépticas por apresentarem um baixo nível de contaminação. A germinação *in vitro* de embriões zigóticos, com a posterior formação de plântulas, é eficiente em meio MS sólido, com 0,3% de carvão ativado, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 mg.L⁻¹ da auxina 2,4-D e 30 g.L⁻¹ de sacarose. A presença da auxina 2,4-D, combinada com carvão ativado, ocasionou um incremento na germinação. A ausência do carvão ativado no meio de cultura estabelecido resultou na produção de calo. A alta taxa de formação de plantas a partir do embrião zigótico possibilita a obtenção de explantes assépticos que poderão ser utilizados para a multiplicação da espécie, tanto por organogênese quanto por embriogênese somática.

Tabela 1. Porcentagem de morte por ressecamento, formação de plantas normais e anormais e formação de calo, durante 30 dias de incubação de embriões zigóticos de *B. eriospatha* em diferentes meios de cultura de Murashige & Skoog (1962) (MS), com ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D) ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e adicionados ou não de carvão ativado (CA) e glutamina (GLUT).

Tratamentos	Morte por	Plantas	Plantas	
	ressecamento	Anormais	Calo	Normais
	(%)	(%)	(%)	(%)
T1 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D)	0	0	30	0
T2 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,25g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	20	0
T3 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,50g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	30	0
T4 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 1,00g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	10	0
T5 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,10% CA)	0	30	0	20
T6 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,10% CA + 0,25g.L ⁻¹ GLUT)	30	10	0	10
T7 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,10% CA + 0,50g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	0	40
T8 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,10% CA + 1,00g.L ⁻¹ GLUT)	0	10	0	20
T9 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,25% CA)	10	10	0	0
T10 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,25% CA + 0,25g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	0	30
T11 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,25% CA + 0,50g.L ⁻¹ GLUT)	10	0	0	50
T12 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,25% CA + 1,00g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	0	0
T13 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,50% CA)	0	10	0	20
T14 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,50% CA + 0,25g.L ⁻¹ GLUT)	30	0	0	10
T15 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,50% CA + 0,50g.L ⁻¹ GLUT)	20	0	0	20
T16 (MS+0,5mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,50% CA + 1,00g.L ⁻¹ GLUT)	0	0	0	10

Referências bibliográficas

- Andrade, L.M.C.O. 1998. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS.
- Carpenter, W. J. 1988. Seed after-ripening and temperature influence *Butia capitata* germination. **Hort Science** **23**(4): 702-703.
- Dantas, A. C. M.; Moraes, L. K. A.; Pedrotti, E. L.; Nodari, R. O. & Guerra, M. P. 2002. Superação *in vitro* da dormência de embriões do portaenxerto de macieira M9 (*Malus pumila* Mill.). **Rev. Bras. Fruticultura** **24**: 10-14.
- Durzan, D.J. 1985. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. *In: Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (Ed.) Tissueculture in forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff. p. 256-324.
- Fernandes, R.C.; Magalhaes, H. M.; Lopes, P. S. N.; Brandao Junior, D. S.; Gomes, J.A.O. ; Paulino, M.A.O.; Carneiro, P.A.P. 2007. Elaboração da metodologia de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de coquinho-azedo *Butia capitata* (Mart) Becc. **Revista Brasileira de Agroecologia** **2**(2): 1004-1007.
- França Neto, J.B. 1999. Teste de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. *In: Kryzanowski, F.C.; Vieira, R.D. & França Neto, J.B. (Ed.) Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES. p. 218.
- Franklin, C.I. & Dixon, R.A. 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. *In: Dixon, R.A. & Gonzalez, R.A. (Ed.) Plant Cell Culture – A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.p.1-25.
- George, E.F. 1996. **Plant propagation by tissue culture: Part II – In Practice**. Edington: Exegetics. v.1.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. 1998. Micropropagação. *In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Ed.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA-CBAB. p. 183-260.
- Hampton, J.G. & Coolbear, P.O. 1990. Potential versus actual seed performance $\frac{3}{4}$ can vigour testing provide an answer? **Seed Science and Technology** **18**(2): 215-228.
- Hu, C.Y. & Ferreira, A.G. 1998. Cultura de embrião *In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. p. 371-393.
- Lédo, A.S.; Seca, G.S.V.; Barboza, S.B.S.C. & Junior, J.F.S. 2007. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia** **31**(4): 989-993.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M. 1996. **Palmeiras no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. v.1.

- Melo, B.; Pinto, J.E.B.P.; Luz, J.M.Q.; Peixoto, J.R. & Juliatti, F.C. 2001. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia** **25(6)**: 1301-1306.
- Moore, R.P. 1972. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News** **44(3)**: 21-24.
- Murashige, T. Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- Pasqual, M; Ribeiro, V.G. & Ramos, J.D. 1990. Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **25(10)**: 1477-1482.
- Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro* Culture of Higher Plants. Netherlands. 3.ed. **Kluwer Academic Publishers**. v. 1.
- Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y. 2009. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.1.
- Ribeiro, V.G.; Sanábio, D.; Souza, C.N; Lopes, P.S.N.; Bocardo, M.R. & Pasqual, M. 2000. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **35**: 27-30.
- Silva, V.S. 2002. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - (ESALQ), Piracicaba, Brasil.
- Tomaz, M.L.; Mendes, B.M.; Mourão Filho, F.A.A.; Demétrio, C.B.; Jansakul, N. & Rodriguez, A.P.M. 2001. Somatic embryogenesis in *Citrus* spp: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** **37(4)**: 446-452.
- Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. 1998. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. v.1.