

Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo

Leonardo Monteiro Ribeiro¹, Silma da Conceição Neves², Priscila Oliveira Silva³, Itaina Gonçalves Andrade³

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com objetivo de avaliar os efeitos da luz, das concentrações de sais MS e de sacarose sobre a germinação, *in vitro*, de embriões, e o desenvolvimento de plântulas de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc.). Para o preparo do meio de cultivo, foram utilizados sais MS suplementados com vitaminas, mio-inositol, caseína hidrolizada, carvão ativado, sacarose e ágar. Para avaliação do efeito da luminosidade, embriões zigóticos foram cultivados na presença e na ausência de luz. Diferentes concentrações de minerais MS (0; 25; 50; 75 e 100% em relação à formulação original do meio MS) foram testadas em associação com duas concentrações de sacarose (de 0 e 2%). Em ambos os experimentos, avaliaram-se, após 30 dias da inoculação, percentuais de oxidação, germinação e emissão de raízes e bainhas foliares. Os resultados obtidos mostraram que condição de luminosidade não afetou a germinação, porém, a ausência de luz favoreceu a emissão de raízes. Ocorreu o alongamento na ausência de sacarose, indicando a existência de reservas energéticas no embrião. A adição de sacarose proporcionou menores níveis de oxidação, favoreceu o alongamento e mostrou-se imprescindível para o desenvolvimento inicial das plântulas. Concentrações de sais entre 50 e 75% da concentração original do meio MS proporcionaram menores níveis de oxidação. A concentração de 75% da concentração original de sais do meio MS proporcionou maior enraizamento.

Palavras-chave: *Butia capitata* (Mart.) Becc, luz, sacarose, meio MS.

ABSTRACT

Germination of zygotic embryos and *in vitro* development of *Butia capitata* (Mart.) Becc.

The objective of this work was to evaluate the effects of light, Murashige & Skoog (MS) salts concentration and sucrose on the *in vitro* embryo germination and plantlet development of *Butia capitata* (Mart.) Becc. The culture medium consisted of MS salts supplemented with vitamins, myo-inositol, hydrolyzed casein, activated charcoal, sucrose and agar. Zygotic embryos were cultured in the light and in the dark. Different concentrations of MS salts (0%, 25%, 50%, 75%, 100% in relation with the original MS medium formulation) were tested in combination with two concentrations of sucrose (0% and 2%). In both experiments, 30 days after inoculation, rates of oxidation, germination and root and leaf sheath growth were evaluated. Results showed that light conditions did not affect germination, however, the absence of light improved root growth. Elongation occurred in the absence of sucrose, indicating the occurrence of energy storage in the embryo. The addition of sucrose provided lower oxidation levels, improved

Recebido para publicação em junho de 2010 e aprovado em janeiro de 2011.

¹ Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Dr. Ruy Braga, s/no, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. leomrib@hotmail.com;

² Bióloga, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Dr. Ruy Braga, s/no, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. silma_neves@yahoo.com.br;

³ Acadêmicas em Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Dr. Ruy Braga, s/no, Vila Mauricéia, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. priscilaoliveira1986@bol.com.br; itaina_g@yahoo.com.br.

elongation and was essential for plantlet initial development. Salt concentrations between 50% and 75% of the MS original concentration provided lower oxidation levels. The concentration of 75% of the MS original salt concentration provided the highest level of rooting.

Key words: *Butia capitata* (Mart.) Becc., light, sucrose, MS medium.

INTRODUÇÃO

O coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc.) é uma palmeira endêmica das regiões norte de Minas Gerais, nordeste de Goiás e sudoeste da Bahia (Lorenzi *et al.*, 2004). A planta, que possui potencial ornamental (Lorenzi *et al.*, 2004), é explorada para a venda e consumo dos frutos *in natura* e, ou, de seus processados (sucos, polpa e sorvete), representando importante fonte de renda para populações rurais (Mercadante-Simões *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2008). A espécie encontra-se sob risco quanto à manutenção das suas populações naturais, em razão do desmatamento, do extrativismo predatório e do consumo de suas flores e frutos por bovinos e equinos, o que limita o estabelecimento de bancos de sementes (Mercadante-Simões *et al.*, 2006). A propagação de *B. capitata* é efetuada exclusivamente por meio de sementes (Lorenzi *et al.*, 2004) que, em razão da dormência relacionada com a impermeabilidade dos envoltórios e de possíveis fatores fisiológicos relacionados com o embrião, podem requerer dois anos para concluir o processo de germinação (Broschat, 1998).

O cultivo de embriões *in vitro* possibilita estudos sobre o processo germinativo e o desenvolvimento de plântulas (Hu & Ferreira, 1998; Tzec-Sima *et al.*, 2006) e constitui alternativa para a propagação de espécies que apresentam dormência relacionada com as limitações impostas pelos envoltórios (Garcia *et al.*, 2002; Tzec-Sima *et al.*, 2006). Considerando-se a especificidade das demandas fisiológicas, são necessárias definições das condições ambientais e do meio de cultura adequado à germinação e ao desenvolvimento das plântulas de diferentes espécies (Hu & Ferreira, 1998).

Os efeitos da luz sobre o desenvolvimento embrionário e o cultivo de embriões são pouco estudados, sendo necessários experimentos preliminares, em que se teste a necessidade de luz para o sistema (Hu & Ferreira, 1998). A formulação de sais MS (Murashige & Skoog, 1962) tem sido utilizada com sucesso no cultivo de embriões de espécies de palmeiras (Ledo *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2006), porém, em alguns casos, alterações na concentração dos sais proporcionaram efeitos favoráveis, como constatado para macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Tabai, 1992) e guarirobeira (*Syagrus oleraceae*) (Melo, 2000).

A sacarose é comumente utilizada como fonte energética e para manutenção de um potencial hídrico adequado no meio de cultura (Ferreira *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2002). Embriões imaturos requerem maiores concentrações de sacarose quando comparados com embriões maduros, que podem prescindir do fornecimento exógeno (Hu & Ferreira, 1998). Estudos sobre a demanda por sacarose podem contribuir para maior conhecimento sobre o *status* nutricional e de maturação dos embriões e fornecer subsídios para entendimento do processo germinativo.

Dentre os principais problemas relacionados com a propagação via cultura de embriões de palmeiras, está a ocorrência de altos índices de oxidação (Pan & Staden, 1998; Melo *et al.*, 2001). A oxidação de compostos fenólicos presentes no embrião está relacionada com a liberação de toxinas no meio e, normalmente, tem efeito prejudicial ou mesmo limitante ao desenvolvimento do embrião ou plântula (Tabai, 1992; Hu & Ferreira, 1998; Melo *et al.*, 2001). Existe influência da concentração de sais e da luminosidade sobre a oxidação (Grattapaglia & Machado, 1998) e estudos que visem a relacionar estes fatores à ocorrência de oxidação em embriões de *B. capitata* poderão contribuir para o desenvolvimento de um protocolo adequado à espécie.

Considerando a ausência de trabalhos, envolvendo a cultura de embriões de *B. capitata*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da luz, da sacarose e de concentrações de minerais MS sobre a germinação *in vitro* dos embriões zigóticos e o desenvolvimento inicial de plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para a germinação de embriões *in vitro* e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Butia capitata* (Mart.) Becc., utilizaram-se frutos maduros, oriundos de população natural do município de Montes Claros, Minas Gerais. Frutos com polpa firme, sem sinal de ataque de pragas ou micro organismos, foram selecionados, despolpados manualmente e mantidos em ambiente sombreado, à temperatura ambiente, por uma semana, até a execução das etapas seguintes, no Laboratório de Micropropagação da Universidade Estadual de Montes Claros. O experi-

mento foi conduzido entre os meses de setembro e novembro de 2007.

As sementes foram extraídas com torno manual de bancada, sendo os embriões retirados com auxílio de estiletes e dispostos em solução de 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, para evitar oxidação (Melo, 2000).

Efeito da luz na germinação e na plântula

Após desinfestação em solução de 0,25% de cloro, por 10 minutos, em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, os embriões foram inoculados em tubos de ensaio, com dimensões de 12 x 1 cm, contendo 2 mL do meio: sais MS (Murashige & Skoog, 1962); 0,4 mg/L de tiamina; 1 mg/L de piridoxina; 0,5 mg/L de ácido nicotínico; 100 mg/L de mio-inositol; 0,5 g/L de caseína hidrolizada; 3g/L de carvão ativado; 30 g/L de sacarose; 6 g/L de ágar; com pH ajustado para 5,7 (Tabai, 1992). Os embriões foram cultivados na presença ou ausência de luz. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando 10 repetições de 10 tubos de ensaio com um embrião cada. Nas unidades experimentais destinadas ao cultivo na ausência de luz, os tubos foram completamente cobertos com papel alumínio. Os embriões foram mantidos em germinador à temperatura oscilante, entre 25 °C, na noite, e 30 °C, durante o dia, por 30 dias. Utilizou-se luz com irradiância de 45 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Efeito da sacarose e concentração do meio MS

Os tratamentos consistiram em alterações na composição do meio de cultivo, quanto às concentrações de sacarose entre 0 e 2% e minerais MS entre 0; 25; 50; 75 e 100% em relação à formulação original do meio MS. Considerando-se a impossibilidade da montagem do experimento num mesmo dia e a possível interferência de fatores ambientais, adotou-se delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 (concentrações de sacarose) X 5 (concentrações de sais MS), com 10 repetições de 10 tubos de ensaio, com um embrião por tubo. Após a inoculação, as parcelas foram envolvidas em papel alumínio, visando à manutenção do cultivo na ausência de luz.

Parâmetros avaliados

Em ambos os experimentos, aos 30 dias de cultivo, foram realizadas avaliações da ocorrência de oxidação e de parâmetros relacionados com o desenvolvimento das plântulas (alongamento do pecíolo cotiledonar, emissão da primeira bainha foliar, emissão da segunda bainha foliar, emissão da raiz primária e manifestação da coloração verde). A oxidação foi avaliada pela constatação do escurecimento de estruturas do embrião, associada à ausência de seu desenvolvimento. Os dados foram tomados

por contagem dos embriões manifestando o evento e transformados em percentuais, sendo estes transformados em arco seno da raiz quadrada de x/100 para comparações.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância pelo teste F e, quando pertinente, análise de regressão. Utilizou-se o programa estatístico SAS - The SAS System for Windows Version 8 (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da luz na germinação e na plântula

O embrião de *B. capitata* encontra-se inserido lateralmente no endosperma (Figura 1a), sendo composto por uma região cilíndrica, referente ao pecíolo cotiledonar, e por uma região distal afilada, correspondente ao haustório (Figura 1b), que se encontra inserido mais internamente na semente.

Na avaliação após 30 dias de cultivo, evidenciou-se que não houve influência da luz sobre a média de embriões e plântulas, apresentando oxidação (Tabela 1). A oxidação de compostos fenólicos é limitante em cultura de embriões de palmeiras (Pan & Staden, 1998; Melo *et al.*, 2001), sendo a utilização de antioxidantes, carvão ativado, e cultivo inicial na ausência de luz, práticas recomendadas, visando à minimização do problema (Grattapaglia & Machado, 1998). Tabai (1992), em trabalho com macaúba (*Acrocomia aculeata*) e Pereira *et al.* (2006), com murmurú (*Astrocaryum ulei*), adotaram a condição de cultivo inicial no escuro. Melo *et al.* (2001), no entanto, observaram que o cultivo no escuro foi desfavorável ao controle da oxidação de embriões de guarirobeira.

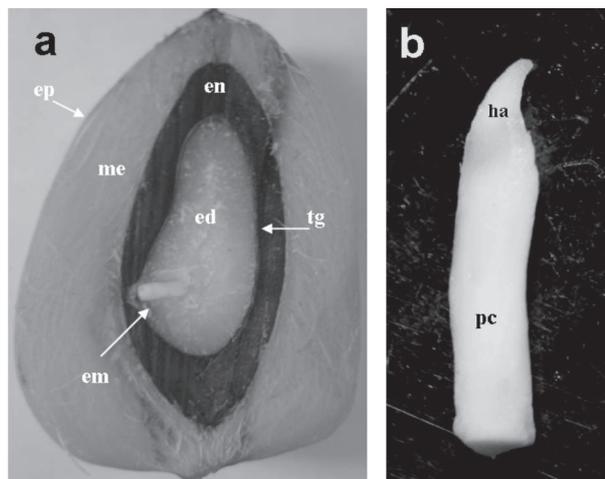


Figura 1. Diásporo e embrião de *Butia capitata*. a. fruto aberto expondo a semente; b. embrião isolado. ep: epicarpo; me: mesocarpo; en: endocarpo; tg: tegumento; ed: endosperma; em: embrião; ha: haustório; pc: pecíolo cotiledonar. Fotografias: Silma da Conceição Neves.

Tabela 1. Percentual médio de embriões de *Butia capitata*, apresentando oxidação e alongamento e plântulas, apresentando primeira bainha, segunda bainha e raiz em função da condição de luminosidade no cultivo⁽¹⁾

Condição de luminosidade	Oxidação (%)	Alongamento (%)	Primeira Bainha (%)	Segunda Bainha (%)	Raiz (%)
Luz	18,0 a	53,0 a	38,0 a	19,0 a	27,0 b
Escuro	12,0 a	65,0 a	52,0 a	10,0 a	47,0 a
Média	15,0	59,0	45,0	14,5	37,0
P	0,4584	0,214	0,133	0,1244	0,0242
C.V. (%)	60,71	28,84	30,47	92,26	30,54

⁽¹⁾As letras iguais nas mesmas colunas indicam ausência de diferença significativa, constatada pelo teste F, a 5% de probabilidade. P: nível de significância. C.V.: Coeficiente de variação.

O alongamento é a segunda alteração morfológica, após o intumescimento, perceptível no processo germinativo em palmeiras (Aguiar & Mendonça, 2002). Como não foi observado efeito significativo da luz sobre o alongamento dos embriões, pode-se afirmar que as sementes de *B. capitata* não têm comportamento fotoblástico (Taiz & Zeiger, 2004). Não foram constatadas, também, diferenças significativas entre as médias para emissão da primeira e da segunda bainha, o que indica que o fornecimento de sacarose eliminou a necessidade de fotossíntese no tratamento em que as plantas foram cultivadas no escuro.

Verificou-se que 26% dos tubos de ensaios expostos à luz apresentavam plântulas verdes (68,4% das plântulas com primeira bainha) (Figura 2a). Triques *et al.* (1997) afirmaram que plântulas de coqueiro, cultivadas *in vitro*, apresentaram desenvolvimento precoce do metabolismo fotossintético, com incremento do conteúdo da enzima rubisco, detectável após uma semana de exposição à luz. Os embriões e plântulas

em condição de ausência de luz apresentavam-se esbranquiçados (Figura 2b), uma vez que a diferenciação dos proplastídios em cloroplastos e a síntese de clorofila são dependentes de luz (Taiz & Zeiger, 2004).

O cultivo no escuro proporcionou percentual significativamente maior de plântulas enraizadas. Asif *et al.*, (2001) concluíram que a luz não afetou a germinação de embriões de *Musa acuminata*, porém, o cultivo no escuro atrasou a emissão da parte aérea e favoreceu o enraizamento. A emissão de raízes deve ser considerada como variável chave para a avaliação da cultura de embriões de palmeiras (Melo, 2000), uma vez que, em várias espécies, ocorre a imaturidade do embrião, relacionada com a indiferenciação da radícula, como em *Washingtonia filifera* (Demason, 1988), *Euterpe precatoria* (Aguiar & Mendonça, 2002) e *Phoenix roebelenii* (Iossi *et al.*, 2006). Melo *et al.* (2001) não obtiveram enraizamento em plântulas de guarirrobeira até os 110 dias de cultivo. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, considerando-se que nenhuma das variáveis avaliadas foi influenciada favoravelmente pela luz e que o enraizamento foi favorecido pela ausência de iluminação, é possível concluir sobre a adequação do cultivo inicial em ambiente escuro para embriões de *B. capitata*.

Efeito da sacarose e concentração do meio MS

No experimento em que se avaliou o efeito da sacarose e da concentração de sais, a ausência de sacarose proporcionou maior nível de oxidação dos embriões (Tabela 2).

Houve efeito da concentração de sais ($P < 0,0001$) e ausência de interação entre o efeito da sacarose e da concentração de sais ($P = 0,7171$). As concentrações entre 50 e 75% de sais MS proporcionaram menores níveis de oxidação, na presença ou ausência de sacarose (Figura 3). Grattapaglia & Machado (1998) recomendaram a utilização de meios com a concentração de sais mais diluída, com objetivo de minimizar o problema. Paiva *et al.* (2004), trabalhando com cultivo *in vitro* de embriões da monocotiledônea estrelícia (*Strelitzia reginae*), concluíram que concentrações de sais inferiores a 50 e superiores a 100% da concentração original do meio MS aumentaram os níveis de oxidação.

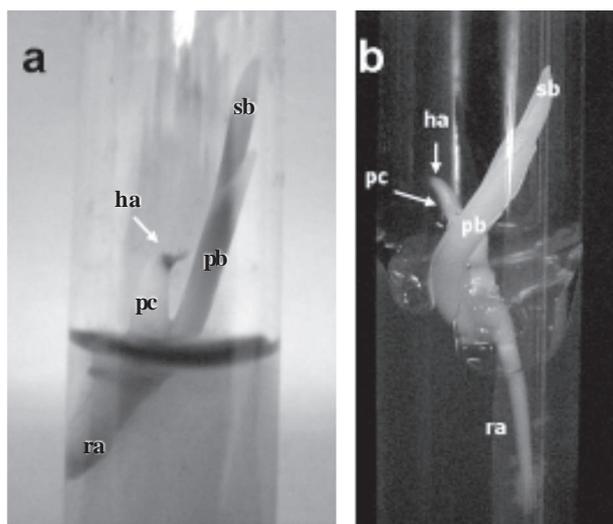


Figura 2. Cultura de embrião de *Butia capitata*. a. plântula com bainhas pigmentadas após 30 dias de cultivo com exposição à luz; b. plântula sem pigmentação após 30 dias de cultivo na ausência de luz. ha: haustório; pc: pecíolo cotiledonar; ra: raiz; pb: primeira bainha foliar; sb: segunda bainha foliar. Fotografias: Silma da Conceição Neves.

Tabela 2. Percentual médio de embriões de *Butia capitata*, apresentando oxidação e alongamento e plântulas, apresentando primeira bainha, segunda bainha e raiz em função da presença de sacarose no meio de cultivo ⁽¹⁾

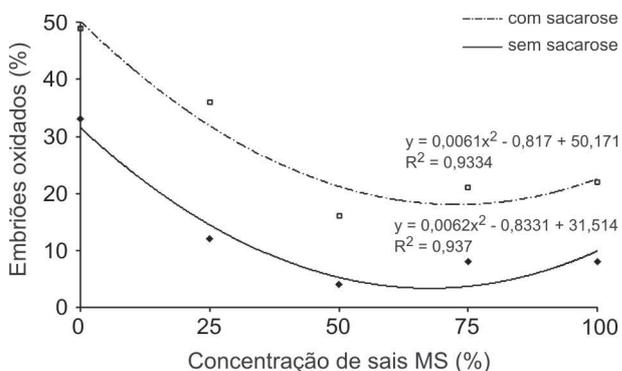
Concentração de Sacarose (%)	Oxidação (%)	Alongamento (%)	Primeira Bainha (%)	Segunda Bainha (%)	Raiz (%)
0	28,8 a	44,0 b	0 b	0 b	0 b
2	13,0 b	71,8 a	38,8 a	8,8 a	25,2 a
Média	20,9	57,9	19,4	4,4	12,6
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CV (%)	51,84	21,98	54,5	193,11	51,63

⁽¹⁾ As letras iguais nas mesmas colunas indicam ausência de diferença significativa, constatada pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A adição de sacarose proporcionou maior média de embriões com alongamento (Tabela 2). Considerando-se que o cultivo foi realizado no escuro, é possível concluir sobre a existência de reservas energéticas no embrião, em quantidade suficiente para proporcionar o nível de alongamento, observado na ausência de sacarose. Hu & Ferreira (1998) consideraram que embriões maduros ou próximos da maturação podem germinar em meios, contendo apenas sais e ágar e que a adição de sacarose é necessária, se o embrião é imaturo.

Faria *et al.* (2008) analisaram quimicamente a semente de *B. capitata* e constataram teor de lipídios de 53,6%. Apesar de não ter sido feita análise específica para o embrião, é provável que este também estoque lipídios. Panza *et al.* (2004) afirmaram que o cotilédone do embrião das palmeiras desempenha, ao lado da função de absorção das reservas do endosperma, papel de acumular reservas. Os autores constataram existência de corpos proteicos, depósitos proteicos no vacúolo e pequenos grãos de amido em células do embrião da palmeira *Euterpe edulis*. Demanson (1988), por meio de análise ultraestrutural, concluiu que 68% do tecido embrionário da palmeira *Washingtonia filifera* é composto por estruturas de reservas, como corpos lipídicos e proteicos, embora amido não seja encontrado.

Não foi constatado efeito da concentração de sais (P= 0,3505) sobre o alongamento dos embriões, emissão da

**Figura 3** - Efeito da concentração de sais MS sobre a oxidação de embriões e plântulas de *Butia capitata*.

primeira bainha (P= 0,0628) e da segunda bainha (P= 0,117), o que indica que as reservas de minerais são suficientes para o desenvolvimento inicial. Na cultura de embriões de estrelícia, Paiva *et al.* (2004) também observaram germinação na ausência de sais MS no meio. Panza *et al.* (2004) detectaram reservas de F, Mg, P, S, Cl, K e Ca, na forma de cristais e no conteúdo vacuolar de células do embrião da palmeira *Euterpe edulis*. Faria *et al.* (2008) detectaram elevados teores de fósforo, potássio, magnésio e enxofre na semente de *B. capitata*.

Bewley & Black (1994) classificaram a dormência em dois tipos: na dormência imposta pelos envoltórios, ocorre a germinação de embriões isolados, o que não ocorre na dormência embrionária. A partir deste conceito, conclui-se que as causas da dormência relatada para *Butia capitata* estão relacionadas com fatores externos ao embrião.

Não houve emissão de bainhas foliares e enraizamento na ausência de sacarose (Tabela 2). Este fato indica a insuficiência de reservas de carboidratos necessários ao desenvolvimento inicial da plântula. Trabalhando com embriões zigóticos de oliveira (*Olea europaea*), Garcia *et al.* (2002) concluíram que o fornecimento exógeno de carboidratos foi dispensável para a germinação, porém, a ausência de sacarose no meio ocasionou baixo nível de desenvolvimento e inviabilizou a obtenção de plântulas para a aclimatação. Pereira *et al.* (2006) concluíram que o meio para a cultura de embriões da palmeira murmurú (*Astrocaryum ulei*) necessita de concentrações não superiores a 15 g.L⁻¹ de sacarose, para obtenção das maiores taxas de germinação e de concentrações maiores para sustentar o crescimento das plântulas. Léo *et al.* (2007) observaram, na cultura de embriões de *Cocos nucifera*, que concentrações de 60 g L⁻¹ de sacarose foram necessárias para maior desenvolvimento da parte aérea e maior produção de plântulas normais.

Constatou-se efeito da concentração de sais sobre o enraizamento (P< 0,0001) nos tratamentos com sacarose, (Figura 4).

A emissão de raízes na ausência de sais foi baixa e aumentou até a concentração de 75% da concentração original do meio MS. Observou-se tendência de diminuição na

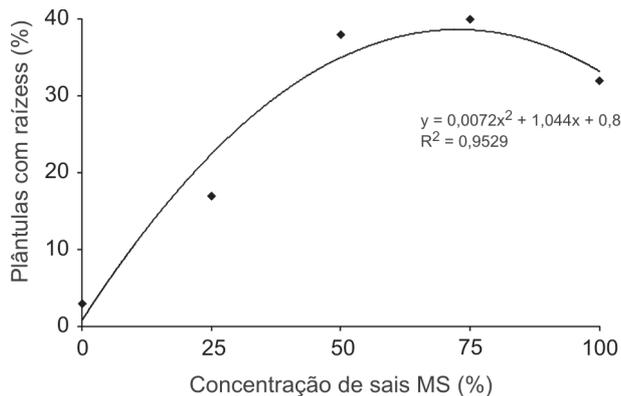


Figura 4 - Efeito da concentração de sais MS sobre a emissão de raízes em plântulas de *Butia capitata*.

emissão de raízes, na concentração de 100% de sais MS, o que indica que a maior disponibilidade de nutrientes inibiu o desenvolvimento radicular. Ferreira *et al.* (2002) afirmaram que altas concentrações de sais, normalmente, inibem o desenvolvimento radicular *in vitro*. Melo (2000) observou que a matéria seca de plântulas de guarirrobeira aumentou com o aumento da concentração dos sais MS, até 75% da concentração original, e tendeu a cair em concentrações superiores. Tabai (1992) observou que a utilização de nitrogênio nas concentrações do meio MS causou diminuição da matéria seca das plântulas de macaúba, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 25 a 50% da concentração original do elemento.

CONCLUSÕES

O alongamento dos embriões e a emissão de bainhas foliares não são influenciados pela luz, enquanto o enraizamento é favorecido pelo cultivo no escuro.

As reservas energéticas e minerais do embrião possibilitam o alongamento do pecíolo cotiledonar.

A presença de sacarose no meio de cultivo favorece o alongamento e é imprescindível para a emissão de bainhas foliares e raiz.

A adição de sacarose e concentrações de sais entre 50 e 75% da concentração original do meio MS proporcionam menor nível de oxidação.

Concentrações de sais de 75% da concentração original do meio MS proporcionam maior nível de enraizamento.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pela concessão de bolsa PCRH ao primeiro autor. Ao Prof. Sérgio Avelino Mota Nobre, pelo uso de instalações e equipamentos do laboratório de Controle Biológico de Micro organismos da Unimontes.

REFERÊNCIAS

- Aguiar M & Mendonça MS (2002) Aspectos morfo-anatômicos do embrião de *Euterpe precatória* Mart. durante o processo germinativo. *Acta Botânica Brasílica*, 16:241-249.
- Asif MJ, Mak C & Othman RY (2001) *In vitro* zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67:267-270.
- Bewley JD & Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. New York, Plenum. 445p.
- Broschat TK (1998) Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Pindo Palm) seed germination. *HortTechnology*, 8:586-587.
- Demason DA (1988) Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany*, 75:330-337.
- Faria JP, Arellano DB, Grimaldi R, Silva LCR, Vieira RF, Silva DB & Agostini-Costa TS (2008) Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30:549-552.
- Ferreira MGR, Cárdenas FEN, Carvalho CHS, Carneiro AA & Damião Filho CF (2002) Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24:246-248.
- Garcia JL, Troncoso J, Sarmiento R & Troncoso A (2002) Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69:95-100.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa-CNPq; CBAB. p. 183-260.
- Hu CY & Ferreira AG (1998) Cultura de embriões. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. p.371-393.
- Iossi E, Moro FV & Sader R (2006) Seed anatomy and germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien (Arecaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 28:121-128.
- Lédo AS, Gomes KKP, Barboza SBSC, Vieira GSS, Tupinambá EA & Aragão WM (2007) Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:147-154.
- Ledo A da S, Lameira AO, Benbadis AK, Menezes IC, Ledo CA da S & Oliveira MSP (2001) Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23:468-472.
- Lorenzi H, Souza HM, Medeiros-Costa JT, Cerqueira LSC & Ferreira E (2004) *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, Editora Plantarum. 117p.
- Melo B (2000) Cultivo de embrião *in vitro* da guarirrobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 117p.
- Melo B, Pinto JEBP, Luz JM, Peixoto JR & Juliatti FC (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*, 25:1301-1306.
- Mercadante-Simões MO, Fonseca RS, Ribeiro LM & Nunes YRF (2006) Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. *Unimontes Científica*, 8:143-149.

- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Paiva PDO, Pasqual RP & Paiva LV (2004) Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.) *Ciência Agrotécnica*, 28:1031-1037.
- Pan MJ & Staden N (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regulation*, 26:155-163.
- Panza V, Láinez V & Maldonado S (2004) Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145:445-453.
- Pereira JES, Maciel TMS, Costa FH da S & Pereira MAA (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). *Ciência e Agrotecnologia*, 30:251-256.
- SAS Institute (1990) SAS User's guide: statistics version. Cary: Statistical Analysis System Institute. 846p.
- Tabai SA (1992) Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 121p.
- Taiz L & Zeiger E (2004) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre, Artmed. 719p.
- Tzec-Sima MA, Orellana R & Robert ML (2006) *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan peninsula (Mexico). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42:54-58.
- Triques K, Rival A, Beule T, Puard M, Roy J, Nato A, Lavergne D, Havaux M, Verdeil JL, Sangare A & Hamon S (1997) Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. *Plant Science*, 127:39-51.