

Saberes e práticas contemporâneas em gestão e inovação na Educação Profissional e em Sistemas Produtivos

Aplicação da técnica de cultura de tecidos em *Euterpes edulis* (palmitero juçara)

Márcia Aparecida Novaes Gomes¹, Nelson Yoshio Oikawa²; Claudio Aparecido Pereira³

Resumo - O objetivo do presente trabalho foi o de testar diferentes concentrações da auxina 2,4-D na indução da calogênese em embriões zigóticos do palmitero juçara, para tanto utilizou-se o meio ½ MS suplementado com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 3,0 mg L⁻¹ de BAP, diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) e com os antioxidantes ácido ascórbico (150 mg L⁻¹), ácido cítrico (150 mg L⁻¹) e PVP (200 mg L⁻¹). Aos 60 dias de cultivo observou-se alta sobrevivência e germinação nos embriões provenientes de frutos imaturos. A oxidação foi maior naqueles de frutos maduros, exceto para os que foram cultivados em meio com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, tratamento que apresentou a maior porcentagem de embriões induzidos à calogênese.

Palavras-chave: Calogênese, Micropropagação, Palmeira.

Abstract - The main objective of this study was test different concentrations of 2.4-D auxin in the induction of callus formation in zygotic embryos of the species. For this purpose, the environment used was ½ MS supplemented with 1.5 g L⁻¹ activated charcoal, 3.0 mg L⁻¹ BAP, different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2.4-D) and ascorbic acid (150 mg L⁻¹), citric acid (150 mg L⁻¹) and 200 mg L⁻¹ of PVP antioxidants. At 60 days of cultivation, high survival and germination in embryos from immature fruits was observed. The oxidation was higher in those of ripe fruits, except for those that were cultured in environment with 30 mg L⁻¹ of 2.4-D, treatment that presented the highest percentage of embryos induced to callus formation.

Keywords: Callogenesis, Micropropagation, Palm Tree.

1. Introdução

A tecnologia de cultura de tecidos vegetais é um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies, podendo com o seu uso resolver ou minimizar barreiras para a multiplicação sistematizada de plantas elites. Vários protocolos têm sido estudados para diferentes espécies agrícolas, medicinais e arbóreas, e o sucesso da aplicação dessa tecnologia na propagação dessas depende de fatores como a não recalcitrância da espécie para o cultivo *in vitro*, o explante, meio de cultura e os reguladores de crescimento utilizados; além das condições de cultivo.

¹ Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito, marcia.angomes@fatec.sp.gov.br

² Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito, oikawa57@hotmail.com

³ Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito, cadpere@gmail.com

A propagação por meio das técnicas de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta, esta última visa à formação de calos, que é considerada uma forma potencial de propagação em massa (LANDA et al., 2000). Segundo Saldanha e Martins-Corder (2012), genótipos superiores podem ser selecionados dentre plantas de populações naturais como fonte de explante para indução da calogênese e posterior embriogênese, o que torna a aplicação de tais técnicas adequadas para o palmito juçara, na qual a ausência de meristemas axilares a incapacita para as técnicas convencionais de clonagem através da propagação vegetativa.

O objetivo do presente trabalho foi realizar o estabelecimento para o cultivo *in vitro* do palmito através da indução de calos em embriões zigóticos utilizando diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

2. Referencial Teórico

O Brasil é o principal produtor e exportador de palmito em conserva, sendo o palmito extraído da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) o mais apreciado de todos os palmitos comestíveis, seguido dos obtidos de plantas da pupunha (*Bactris gasipaes*) e do açaí (*Euterpe oleraceae*). Além do palmito, a juçara possui potencial apícola, paisagístico, artesanal, pode ser utilizada na produção de ração animal e de seus frutos pode-se obter a polpa para a confecção de sucos, bombons, sorvetes, cremes, como já vem sendo praticado com o açaí ((MILANESI et al., 2013). Seu tronco, um estipe, pode ser usado em construções domésticas e rurais, sendo sua madeira empregada como caibros, ripas, mourões e escoras, principalmente na pequena propriedade rural (PEDROSO, 2008).

Do ponto de vista ecológico, o fruto da espécie é uma importante fonte de alimentos para vários pássaros e mamíferos, como roedores, marsupiais, primatas e morcegos. Essa interação com a fauna adquire maior importância pelo fato de sua frutificação ocorrer no inverno, quando, devido ao período seco, a maioria das árvores estão sob estresse hídrico. A palmeira juçara apresenta características favoráveis ao manejo sustentável por apresentar rusticidade, valor econômico, capacidade de adaptação, alimento para a fauna, densidade de cobertura, além de preservar a integridade edáfica (REIS et al., 2000).

As populações do palmito juçara foram drasticamente reduzidas pelo extrativismo desordenado e ilegal, sendo encontradas apenas em áreas protegidas da Mata Atlântica, onde sofrem cortes pela ação extrativista ilegal, principalmente do Vale do Ribeira (sul de São Paulo) e a região de Guaraqueçaba, do litoral paranaense. Sem possibilidades de regeneração natural para recompor a população original, a espécie está em vias de extinção, pois a árvore tem que sofrer o corte para a obtenção do palmito (MARTINELLI; MORAES, 2013).

A propagação da espécie apresenta grande dificuldade, sendo que suas sementes perdem o poder germinativo em poucos meses e possuem germinação lenta, em 30 a 170 dias após a sementeira (CARVALHO, 2003). Também, por não apresentar um sistema de propagação vegetativa natural, não emitindo perfilhos, e, assim, não respondendo aos métodos tradicionais de propagação assexuada (PEDROSO, 2008). Desta forma, técnicas aplicadas da cultura de tecidos vegetais tornam-se uma opção para a sua conservação e multiplicação, dentre elas a calogênese com posterior embriogênese.

A calogênese ocorre como resultado do processo de totipotência celular, que é a capacidade da célula vegetal já diferenciada de voltar ao seu estado

meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação, sendo o calo um tecido não organizado e amorfo, formado por células meristemáticas que se multiplicam desordenadamente por sucessivas mitoses, como resposta a estímulos do balanço entre reguladores de crescimento e outros fatores do meio de cultura e ambiente (TERMIGNONI, 2005).

Para ocorrer à indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante, entretanto, procura-se aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência, como os do embrião. Alguns tipos de células do calo são capazes de iniciar a formação de brotos, embriões somáticos, ou ainda órgãos como raízes, resultando na formação de novos brotos da espécie e, assim, a sua multiplicação *in vitro* (ANDRADE, 2002). São poucos os trabalhos encontrados na literatura visando a calogênese e posterior embriogênese *in vitro* de do palmitero juçara, tendo-se relatos de Saldanha et al. (2006) e Saldanha e Martins-Corder (2012).

3. Método

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Tecnologia de Capão Bonito – FATEC-CB. O material vegetal, frutos verdes e maduros do palmitero juçara, foram coletados de matrizes selecionadas de uma zona remanescente de Mata Atlântica, na zona rural de Capão Bonito/SP, a 24° 00' 21" S e 48° 20' 58" W, com temperatura média anual de 22,2°C e precipitação média anual de 1.221,6 mm.

As matrizes foram selecionadas considerando-se o vigor da árvore e ausência de contaminação por patógenos aparente e os frutos foram escolhidos randomicamente objetivando testar o vigor e a capacidade de desenvolvimento dos embriões zigóticos imaturos. Depois de colhidos, foram misturados e armazenados em geladeira a temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Os frutos foram lavados em água corrente e, em seguida, imersos em água destilada à temperatura de 40°C durante 20 minutos para facilitar a remoção da polpa. As sementes obtidas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por dois minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% com 2 gotas de Tween 20, durante 20 minutos sob agitação constante e, em seguida, lavados três vezes com água destilada autoclavada e secos em placas de Petri, contendo discos estéreis de papel filtro.

Os embriões zigóticos, excisados de sementes assépticas na câmara de fluxo laminar, foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo aproximadamente 30 ml do meio de cultura com metade das concentrações de sais de Murashige e Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) (1962), seguindo recomendações de Saldanha e Martins-Corder (2012). O meio foi suplementado com 7,0 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 3,0 mg L⁻¹ de BAP, diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e com os antioxidantes ácido ascórbico (150 mg L⁻¹), ácido cítrico (150 mg L⁻¹) e polivinilpirrolidona (PVP) (200 mg L⁻¹). A escolha dos antioxidantes foi baseada em Azofeifa (2009).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25° \pm 2°C e umidade relativa do ar em torno de 70 %. Nos sete primeiros dias foram mantidas no escuro visando evitar a oxidação e após este período foram mantidas

em fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria sob $52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância /oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas repetições, seguindo o esquema fatorial 2x4, frutos verdes e maduros em quatro concentrações de 2,4-D (0, 10, 30 e 40 mg L^{-1}). Cada unidade experimental foi constituída de cinco frascos contendo quatro embriões cada.

Aos 14 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de contaminação e de oxidação e aos 60 dias a porcentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas e a porcentagem de indução de calogênese. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

Após 10 dias da inoculação dos embriões, observou-se a presença de contaminação apenas nos tratamentos com embriões provenientes de frutos maduros, com 30% de contaminação na ausência de 2,4-D e com 40 mg L^{-1} do fitorregulador acrescido ao meio. Não ocorreu contaminação no tratamento com embriões originados dos frutos imaturos (Tabela 1). Pode-se inferir que o maior tempo dos frutos maduros em contato com o ambiente em relação aos imaturos tenha os deixados em maior exposição a contaminações pelos patógenos presentes no ambiente. Assim, outros tratamentos de descontaminação das sementes devem ser testados quando se deseja utilizar embriões zigóticos provenientes de frutos maduro.

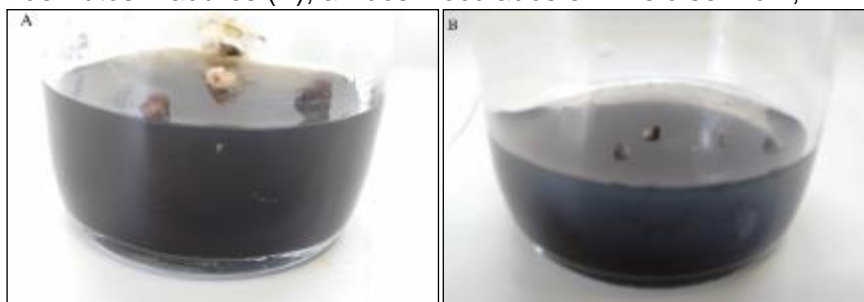
Tabela 1. Porcentagem de contaminação em embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, obtidos a partir de frutos imaturos e maduros, crescidos em diferentes concentrações de 2,4-D, aos 14 dias.

Origem dos embriões	% de miniestacas vivas				Média	CV
	2,4-D (mg L^{-1})					
	0	10	30	40		
Frutos imaturos	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0	0,0%
Frutos maduros	30,0 Aa	20,0 Ba	20,0 Ba	30,0 Aa	25,00	23,09%
Média	15,0	10,0	10,0	15,0		
CV	141,42%	141,42%	141,42%	141,42%		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: os autores.

A presença de oxidação nos embriões zigóticos foi observada aos 14 dias da inoculação e ao longo dos 60 dias de cultivo. Constatou-se maior oxidação nos embriões provenientes de frutos maduros, com 90% deles apresentando oxidação quando crescidos na ausência de 2,4-D, enquanto para os originados de frutos imaturos 18,8% apresentaram-se oxidados na ausência de 2,4-D. Nestes a maior porcentagem encontrada de embriões oxidados foi no tratamento com 10 mg L^{-1} de 2,4-D, com 35% (Figura 1 e Tabela 2).

Figura 1. Embriões zigóticos de *Euterpe edulis* em início de desenvolvimento e oxidados, obtidos a partir de frutos imaturos (A) e não germinados e com oxidação, obtidos a partir de frutos maduros (B), ambos inoculados em meio sem o 2,4-D.



Fonte: os autores

Tabela 2. Porcentagem de oxidação em embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, obtidos a partir de frutos imaturos e maduros e crescidos em diferentes concentrações de 2,4-D.

Origem dos embriões	% de miniestacas vivas				Média	CV
	2,4-D (mg L ⁻¹)					
	0	10	30	40		
Frutos imaturos	18,8 Cb	35,0 Ab	15,0 Da	25,0 Bb	23,4	37,24%
Frutos maduros	90,0 Aa	80,0 Ba	7,5 Db	40,0 Ca	54,4	69,87%
Média	54,4	57,5	11,2	32,5		
CV	92,55%	55,34%	47,14%	32,64%		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: os autores.

A maior oxidação nos embriões oriundos de frutos maduros em relação aos de frutos imaturos possivelmente seja em razão do estágio mais avançado de diferenciação dos tecidos nos maduros. A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado, os quais são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Tanto nos embriões originados de frutos maduros como nos imaturos ocorreu menor oxidação quando tratados com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, o que sugere que nesta concentração o 2,4-D, embora conhecido como um indutor de oxidação dependendo da concentração e espécie estudada, tenha apresentado uma ação no metabolismo do embrião que diminuiu o efeito oxidativo resultante da defesa do tecido quando manipulado para o cultivo *in vitro*. Segundo Zanol et al. (1997), auxinas podem agir como repressoras e como indutoras de peroxidases específicas, e Oliveira et al. (2007) colocam que a auxina afeta a atividade e concentração da peroxidase, e o 2,4-D sendo uma auxina potente pode afetar a

oxidação através da ação sobre a peroxidase. Hausman (1993), observou um pico de atividade da peroxidase precedendo o enraizamento somente em brotações tratadas com a auxina ácido naftalenoacético (ANA).

As peroxidases agem nas plantas como protetoras antioxidativa inativando a produção das espécies reativas de oxigênio, tais como 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 e OH^{\cdot} . Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase e, às vezes, é a primeira enzima a ter atividade. Também estão envolvidas em processos do crescimento e desenvolvimento de plantas; na biossíntese de lignina; e no enrijecimento da parede celular (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

Com relação à germinação de embriões zigóticos, que correspondem à emissão de primórdios foliares e radiculares, e ao desenvolvimento do haustório, observou-se nos embriões resultantes de frutos imaturos uma maior porcentagem naqueles tratados sem 2,4-D, com 62,5%, e menor germinação quando em meio com 40 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 25% de germinação. Enquanto que os embriões originados dos frutos maduros não germinaram nos tratamentos com ausência do 2,4-D e com 10 mg L⁻¹ do fitorregulador, resultado dado pela alta oxidação dos embriões ocorrida nestes tratamentos. Em tais embriões, a maior porcentagem se deu no tratamento com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 71,9% de embriões germinados (Tabela 3), podendo também neste processo ser proposta a presença da peroxidase estimulando o crescimento e desenvolvimento do embrião.

Tabela 3. Porcentagem de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* germinados *in vitro*, obtidos a partir de frutos imaturos e maduros e crescidos em diferentes concentrações de 2,4-D.

Origem dos embriões	% de miniestacas vivas				Média	CV
	2,4-D (mg L ⁻¹)					
	0	10	30	40		
Frutos imaturos	62,5 Aa	50,0 Ca	55,0 Bb	25,0 Da	48,1	33,77%
Frutos maduros	0,0 Cb	0,0 Cb	71,9 Aa	10,0 Bb	20,48	169,02%
Média	31,0	25,0	63,4	17,5		
CV	141,42%	141,42%	18,83%	60,61%		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: os autores.

Na germinação dos embriões zigóticos, observou-se após 15 dias do cultivo *in vitro* que apresentavam intumescimento do botão germinativo e início de desenvolvimento da primeira bainha plumular (Figura 2A). Aos 30 dias de cultura foi possível observar o desenvolvimento do primórdio radicular, aos 40 dias observou-se o aumento em espessura do botão germinativo e o desenvolvimento da bainha plumular (Figura 2B) e aos 60 dias, o alongamento da bainha plumular e das raízes (Figura 2C).

Figura 2. Embriões zigóticos de *Euterpe edulis* germinados, obtidos a partir de frutos imaturos e crescidos em meio sem o 2,4-D após 15 dias (A), 40 (B) e 60 dias de cultivo (C). bg= botão germinativo, pb= primeira bainha plumular, rp: raiz primária, ra= raízes adventícias.



Fonte: os autores

Para a calogênese, foi pequeno o número encontrado de embriões induzidos à desdiferenciação e formação dos calos aos 60 dias de cultivo. A maior porcentagem ocorreu em embriões originados de frutos maduros crescidos em meio de cultivo com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, e apenas 5% dos embriões de frutos imaturos, estes tratados com 40 mg L⁻¹ de 2,4-D (Tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4. Porcentagem de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* em processo de calogênese, obtidos a partir de frutos imaturos e maduros e crescidos em diferentes concentrações de 2,4-D.

Origem dos embriões	% de miniestacas vivas				Média	CV
	2,4-D (mg L ⁻¹)					
	0	10	30	40		
Frutos imaturos	0,0	0,0	0,0	5,0	1,25	200,0%
Frutos maduros	0,0	0,0	15,0	0,0	3,75	200,0%
Média	0,0	0,0	7,5	2,5		
CV	0,0%	0,0%	141,42%	141,42%		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: os autores.

Figura 3. Embriões zigóticos de *Euterpe edulis* germinados e em processo de calogênese, obtidos a partir de frutos maduros crescidos em meio contendo 30 mg L⁻¹ de 2,4-D.



Fonte: os autores

Também Saldanha e Martins-Corder (2012) obtiveram a baixa porcentagem de calogênese a partir de embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* em meio suplementado com 40 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 3,1% dos embriões se diferenciando em calos, e não foi encontrada na literatura a indução de calogênese com a espécie a partir de embriões zigóticos provenientes de frutos maduros. Ulisses et al. (2011) obtiveram a calogênese e posterior embriogênese a partir de embriões maduros em *Heliconia bihai*, Kim et al. (2003) em *Lonicera japonica* e por Zale et al. (2004), em *Triticum monococcum* e *T. tauschii*, o que pode ser explicada pela maior quantidade de hormônios endógenos e outras substâncias em embriões maduros. Segundo Kerbauy (1998), a presença de níveis endógenos de auxinas ou de substâncias receptoras de origem proteica no explante pode desencadear uma resposta da célula, quando associada às substâncias do meio nutritivo, induzindo a formação de calos.

Considerando que a maior porcentagem de indução da calogênese ocorreu em embriões zigóticos de origem de frutos imaturos tratados com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, pode-se novamente inferir a participação da peroxidase nestes embriões. Lima et al. (2002) encontraram que calos submetidos a tratamento com BAP apresentaram as maiores atividades da peroxidase e que este regulador teria promovido aumento na porcentagem de formação de calos. Os autores esclarecem que geralmente em regiões de maior divisão celular a atividade da peroxidase aumenta provavelmente pelo fato de ser essencial no metabolismo do ácido indolacético (AIA), modificando o balanço hormonal na planta e, assim, modulando a morfogênese.

5. Considerações finais

Dos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos de *E. edulis* são indicados para a germinação *in vitro* da espécie sem a presença de fitorreguladores, pela maior sobrevivência apresentada. Para a indução de calogênese nesses há a necessidade de estudos adicionais com a maior concentração de 2,4-D, ou o uso de outras auxinas, como dicamba e picloram. Também, pode-se testar a combinação de concentrações de 2,4-D com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH₄NO₃), sendo que altas concentrações desse sal aumenta a atividade da redutase de nitrato e, em consequência, o crescimento das células.

Para os embriões originados dos frutos maduros, pela alta contaminação apresentada, propõe-se testar concentrações maiores de hipoclorito de sódio que a de 2,5% utilizada e manter o tratamento com 30 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para prevenir a oxidação, outros fatores podem ser considerados, como o cultivo por um período maior no escuro e o uso de enzimas antioxidantes.

O plantio da espécie nativa juçara na região de Capão Bonito pode tornar-se uma alternativa sustentável para agricultores familiares que possuem áreas de preservação com plantas da espécie, tanto para o comércio do palmito como de seu fruto. Entretanto, é baixa a disponibilidade de mudas da espécie e o uso da tecnologia da calogênese *in vitro* e posterior embriogênese somática pode resultar uma produção em maior escala dessas para os agricultores e para ONGs que trabalham com a recuperação de áreas e plantios florestais na região.

Referências

- ANDRADE, Solange Rocha Monteiro de. *Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais*. Embrapa Cerrados. Planaltina: 2002. 16 p.
- AZOFEIFA, Álvaro. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, v.20, n.1, p.153-175, 2009.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. *Espécies arbóreas brasileiras*. Embrapa Florestas, Colombo, 2003. 1035 p.
- GRATTAPAGLIA, Dário; MACHADO, Marco Antonio. *Micropropagação*. In: TORRES, Antonio Carlos; CALDAS, Linda S.; BUSO, José Amauri (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v. 1, 1998, p. 183-260.
- HAUSMAN, Jean François. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, v. 13, n. 3, p. 263-268, 1993.
- KERBAUY G.B. *Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas*. In: TORRES, Antonio Carlos; CALDAS, Linda S.; BUSO, José Amauri (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1998, v. 1, p.519-531
- KIM, Suk Weon et al. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of japanese honeysuckle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72:277-280, 2003.
- LANDA, Flávia de Souza Lima et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 24, p. 56-63, 2000.
- LIMA, Giuseppina P. P. et al. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ CV MCOL 22) cultivada *in vitro*. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 8, n. 2, 2002.
- MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Ávila. *Livro vermelho da flora do Brasil*. Andrea Jakobsson - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.
- MILANESI, Lucas de Souza; PERONI, Nivaldo; REIS, Maurício Sedrez dos. Use of the palm *Euterpe edulis* Martius in landscape units managed by migrants of German origin in Southern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 9, p. 1-11, 2013.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

NASCIMENTO, Jacqueline Barbosa; BARRIGOSI, José Alexandre Freitas. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrarian Academy*, v.1, n.01; p. 234-250, 2014.

PEDROSO, Fábio Graf. *As experiências de desenvolvimento sustentável do quilombo de Ivaporanduva: um estudo de caso na perspectiva da agroecologia*. 2008. 149 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2008.

QUEIROZ, João Mariano de Oliveira et al. Emergência de plântulas e crescimento inicial de tamarindeiro em diferentes substratos. *Magistra*, v. 23, n. 4, p. 221-227, 2011.

REIS, Maurício Sedrez et al. Management and conservation of natural populations in Atlantic Rain Forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica*, v. 32, p. 894-902, 2000.

SALDANHA, Cleber Witt et al. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 6, p. 228-235, 2006.

SALDANHA, C.W.; MARTINS-CORDER, Maisa Pimentel. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 2, p. 171-178, 2012.

TERMIGNONI, Regina Ramos. *Cultura de tecidos vegetais*. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005, 182 p.

ULISSES, Claudia et al. Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. *Ceres*, v. 58, n. 5, 2015.

ZALE, Janice M. et al. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 277–281, 2004.

ZANOL, Geni C. et al. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*). *Revista Brasileira de Agrociência*, v.3, n. 1, p. 23-30, 1997.