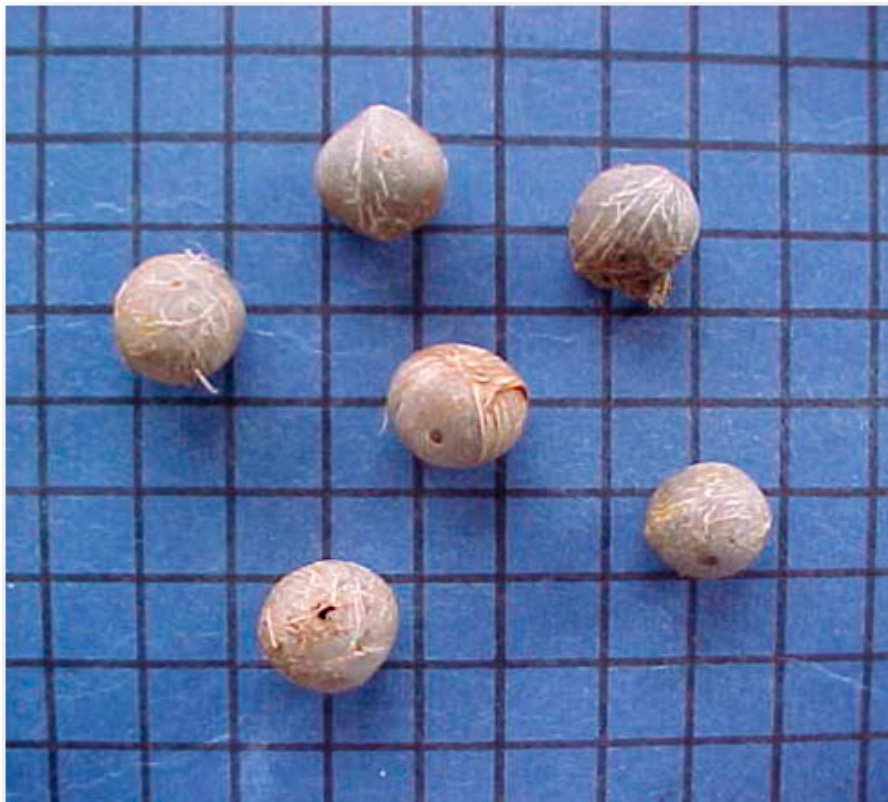


**Avaliação de Metodologias para a
Conservação de Germoplasma de
Butia eriopatha (Mart. ex. Drude)
Becc. – Arecaceae**

Foto: Antonieta Nassif Salomão



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 324

Avaliação de Metodologias para a Conservação de Germoplasma de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. – Arecaceae

Antonieta Nassif Salomão
Izulmé Rita Imaculada Santos
Solange Carvalho Barrios Roveri José
Rosângela Caldas Mundim

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretária-Executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamares Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Editoração eletrônica e tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Salomão, Antonieta Nassif

Avaliação de metodologias para a conservação de germoplasma de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. - Arecaceae. Antonieta Nassif Salomão, Izulmé Rita Imaculada Santos, Solange Carvalho Barrios Roveri José. Colaboração de Rosângela Caldas Mundim. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

24 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 324).

1. *Butia eriospatha*. 2. Criopreservação. 3. Germinação in vitro. I. Santos, Izulmé Rita Imaculada. II. José, Solange Carvalho Barrios Roveri. III. Mundim, Rosângela Caldas. IV. Série.

581.15 – CDD 21

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	07
Introdução.....	09
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão.....	14
Conclusões.....	19
Referências Bibliográficas.....	20

Avaliação de Metodologias para a Conservação de Germoplasma de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. – Arecaceae

*Antonieta Nassif Salomão*¹

*Izulmé Rita Imaculada Santos*²

*Solange Carvalho Barrios Roveri José*³

*Rosângela Caldas Mundim*⁴

Resumo

Foram testadas duas metodologias para a conservação de endocarpos de *Butia eriospatha*. Na primeira metodologia, os endocarpos foram congelados a -20°C e descongelados lentamente em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 5 h. Na segunda metodologia, os endocarpos foram submetidos ao congelamento rápido a -196°C e ao descongelamento rápido por imersão em banho-maria a 39°C por 5 min. O poder de regeneração foi avaliado por cultivo in vitro de embriões zigóticos (e.z.) em meio de cultura WPM acrescido de 3% de carvão vegetal. Os endocarpos com 7,3% de umidade e 100% de regeneração de seus e.z. foram congelados a -20°C e a -196°C , por 10 meses. A cada dois meses, endocarpos foram descongelados, e.z. excisados e cultivados em meio WPM. Até o sexto mês de congelamento, não houve decréscimo significativo dos percentuais de regeneração (100%) dos e.z. excisados de endocarpos congelados a -20°C . Para o material criopreservado a -196°C , o percentual de regeneração dos e.z. foi de 96% no sexto mês, e a partir do oitavo mês houve perda significativa ($P < 0,05$) do percentual de regeneração. No décimo mês, houve perda significativa ($P < 0,05$) dos percentuais

de regeneração dos e.z. excisados de endocarpos congelados em ambas as temperaturas. Os percentuais finais de regeneração foram de 44% (-20°C) e de 64% (-196°C). A temperatura de -196°C mostrou-se mais favorável à conservação de endocarpos de *B. eriospatha*. Sugere-se testar diferentes períodos de descongelamento rápido e o descongelamento lento, após armazenamento em condições criogênicas.

Palavras-chave: butiá, criopreservação, cultivo in vitro.

¹ Engenheira Florestal, Ms.C, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

² Bióloga, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

³ Engenheira-agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁴ Geógrafa, Graduação, técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF (colaboradora).

Evaluation of Methodologies for the Conservation of Germplasm of *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. – Arecaceae

Abstract

Two methodologies for conservation of *Butia eriospatha* endocarps were tested. In the first methodology the endocarps were frozen at -20°C and thawed slowly at room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 5 h. In the second methodology the endocarps were subjected to rapid freezing at -196°C and rapid thawing by immersion in a $39^{\circ}\text{C}/5$ min. The regeneration was evaluated by in vitro culture of zygotic embryos (z.e.) in WPM medium supplemented with 3% charcoal. The endocarps with 7.3% of moisture content and 100% regeneration of z.e. were frozen at -20°C and -196°C for 10 months. Every two months, endocarps were thawed, the z.e. excised and they were cultured in WPM medium. Up to the sixth month of freezing there was no significant decrease in percentages of regeneration (100%) of z.e. excised from frozen endocarps at -20°C . For the cryopreserved material the percentage of regeneration was 96% in the sixth month and from the eighth month there was a significant loss ($P < 0.05$) of the percentage of regeneration of the z.e. excised from frozen endocarps at -196°C . In the tenth month, there was a significant loss ($P < 0.05$) of the percentages of regeneration of the z.e. excised

from frozen endocarps at both temperatures. The final regeneration percentages were 44% (-20°C) and 64% (-196°C). The temperature at -196°C proved to be more favorable for the conservation of *B. eriospatha* endocarps. It is suggested to test different periods of rapid thawing and slow thawing after storage under cryogenic conditions.

Keywords: *Butia*, cryopreservation, in vitro culture.

Introdução

No Brasil, estima-se que haja 40 gêneros e mais de 2.000 espécies de palmeiras distribuídas em todas as regiões, sendo a região Amazônica a que possui a maior diversidade de espécies (MATOS, 2012; FERREIRA, 2017).

Os gêneros que se destacam no país são *Acrocomia*, *Aiphanes*, *Allagoptera*, *Astrocaryum*, *Attalea*, *Bactris*, *Butia*, *Copernicia*, *Desmoncus*, *Elaeis*, *Euterpe*, *Geonoma*, *Leopoldinia*, *Lytocaryum*, *Mauritia*, *Maximilliana*, *Oenocarpus*, *Orbignya*, *Polyandrococos*, *Phytelephas*, *Raphia*, *Scheelea*, *Syagrus*, *Trithrinax*. As espécies desses gêneros, de acordo com suas especificidades, têm usos alimentício (fruto, semente, palmito, óleo), industrial (farmacêutico, químico, eletrônico e cosmetológico), artesanal (biojoias, utensílios domésticos e de decoração), ecológico, paisagístico e ornamental (MODOLO, 2017; BÜTTOW et al., 2009).

Devido à grande diversidade de palmeiras, as condições específicas tanto para a germinação quanto para a conservação de seu germoplasma devem ser determinadas individualmente (MURPHY et al., 2016). A diversidade de comportamento fisiológico para fins de conservação está apresentada no estudo feito por Dickie et al. (1992), em que foi avaliada a tolerância à dessecação de sementes de 11 espécies de palmeiras: *Acoelorrhapha wrightii* (Griseb. & H. Wendl.) H. Wendl. Ex Becc.; *Attalea crassispatha* (Mart.) Burret; *Daemonorops verticillaris* (Griff.) Mart.; *Desmoncusor thacanthos* Mart.; *Orbignya cohune* (Mart.) Dahlgren ex Standley; *Pinanga malaiana* (Mart.) Scheff.; *Pinanga polymorpha* Becc.; *Sabal mexicana* Mart.; *Schippia concolor* Burret; *Zombia antillarum* (Desc.) L. H. Bailey; *Washingtonia filifera* (L. Linden) H. Wendl. Sementes de *W. filifera* e *S. mexicana* toleraram a desidratação a teores de água em torno de 5%, e sementes de *A. wrightii* foram parcialmente tolerantes à desidratação. Sementes das demais espécies mostraram-se sensíveis ao dessecação, inviabilizando sua conservação em temperaturas subzero.

O gênero *Butia*, natural da América do Sul, ocorre no Leste do Paraguai, Nordeste da Argentina e no Noroeste e Sudeste do Uruguai (SGANZERLA, 2010). No Brasil, as 20 espécies desse gênero estão distribuídas pelos estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A espécie *Butia eriospatha*, conhecida como butiá, é uma palmeira endêmica da Floresta Ombrófila Mista e dos campos das regiões altas nos estados do Paraná, de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. Seus indivíduos apresentam distribuição espacial agregada, às vezes densa e extensa, denominada butiazal (LOPES, 2017; FACHINELLO e SCHWARTZ, 2017; NAZARENO, 2013).

O fruto de formato globoso, com pericarpo de cor avermelhada ou amarelada e mesocarpo carnoso e adocicado, tem grande valor nutricional. A polpa contém β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, lipídeos β , γ e δ - tocoferóis. As sementes, de 1 a 3 por fruto, são ricas em compostos fenólicos e carotenoide, contendo grande quantidade dos ácidos prolínico, láurico, cáprico e oléico (FACHINELLO; SCHWARTZ, 2017; HOFFMANN et al., 2014). Os frutos maduros são consumidos in natura pela avifauna, pelo homem e usados na elaboração de sucos, geleias, licor e vinho. A semente é comestível e dela extrai-se um óleo utilizado na alimentação. Seu estipe, de boa durabilidade, é usado em construções rústicas. As fibras das frondes prestam-se para a construção de pontes e bueiros e fabricação de chapéus, cestos, cordas, enchimentos de colchões e estofados. A espécie é ornamental com uso paisagístico (FACHINELLO; SCHWARTZ, 2017; LOPES, 2017; NAZARENO, 2013).

Como para a maioria das palmeiras, a propagação de *B. eriospatha* é sexuada e sua germinação é lenta e desuniforme devido à dormência tegumentar (MEEROW; BROCHAT, 2017; WALDOW et al., 2013). O longo processo germinativo de endocarpos de *B. eriospatha* deve-se à resistência mecânica do endocarpo e à impermeabilidade à água e às trocas gasosas, fatores que contribuem para intensificar sua dormência

(HOFFMANN et al., 2014). Na literatura, tem-se que o tempo requerido para que a germinação ocorra é de até oito meses e de cerca de dois anos para que haja a emergência da plântula (SGANZERLA, 2010; WALDOW et al., 2013). Tais características germinativas são um empecilho à produção de mudas, à formação de plantios e à avaliação de germoplasma semente (BEUGRÉ et al., 2009). Sendo assim, o uso de cultura in vitro de embrião zigótico tem sido indicado tanto para a germinação quanto para a avaliação da qualidade de sementes de palmeiras (OLIVEIRA et al., 2016).

Estudos feitos com *Butia capitata* indicaram que suas sementes apresentam comportamento intermediário para fins de conservação (DIAS et al., 2015). Dentre as técnicas de conservação, a criopreservação mostrou-se a mais promissora para a espécie (FRUGERI, 2016; DIAS et al., 2015). Entretanto, têm sido observadas variações intra e interespecíficas quanto aos requerimentos básicos para a conservação ex situ (SALOMÃO et al., 2015).

Visando incrementar o uso de *B. eriospatha*, é necessário que sementes de qualidade estejam disponíveis, assim como indicações das melhores condições de conservação de seu germoplasma, uma vez que a espécie é endêmica. As espécies endêmicas são mais vulneráveis à extinção pelos efeitos da deriva genética e endogamia (VANDEPITTE et al., 2013; SOLÓRZANO et al., 2016). Portanto, as ações de conservação devem priorizar as espécies endêmicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar duas metodologias para a conservação em longo prazo de germoplasma de *B. eriospatha*.

Material e Métodos

Material

Os frutos de *B. eriospatha* foram obtidos na Área de Aproveitamento da Hidrelétrica de Barra Grande, SC, localizada no Rio Pelotas, a

27°51' 06'' de latitude S e 051°13'07'' de longitude O. O material foi acondicionado em caixas plásticas e transportado para o Laboratório de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF.

Beneficiamento dos frutos e determinação do teor de água dos endocarpos

Os frutos foram lavados com solução de detergente neutro (5 mL detergente/100 mL água) e enxaguados em água corrente. A remoção do pericarpo e do mesocarpo dos frutos foi feita manualmente, friccionando-os em peneira sob água. Os endocarpos foram lavados com solução de detergente neutro e deixados em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 h. Após esse período, foi determinado o teor de água dos endocarpos pelo método de estufa, $105 \pm 3^\circ\text{C}/24$ h (BRASIL, 2009) e o poder inicial de regeneração de seus e.z., conforme descrito no item Descontaminação e regeneração in vitro de embriões zigóticos.

Metodologias de congelamento e descongelamento

Optou-se pelo uso do diásporo de *B. eriospatha* porque a extração da semente, quando não a danifica totalmente, causa injúrias em seus tecidos, contribuindo, assim, para a perda de sua viabilidade, prontamente.

Foram testadas duas metodologias para a conservação de endocarpos de *B. eriospatha*: congelamento a -20°C e a -196°C .

Dez subamostras, contendo 50 endocarpos cada, foram acondicionadas em sacos aluminizados e vedados com parafilme. Cinco subamostras foram congeladas em freezer a -20°C por 10 meses. A cada dois meses, uma subamostra foi retirada do freezer e descongelada lentamente em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 5 h.

As outras cinco subamostras foram congeladas rapidamente, por imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), a uma taxa de congelamento $\geq 200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, determinada com termômetro Thermocouple Delta OHM TP 956. A cada dois meses, durante 10 meses, uma subamostra foi retirada e descongelada rapidamente por imersão em banho-maria a 39°C por 5 min.

Descontaminação e regeneração in vitro de embriões zigóticos

Os endocarpos foram lavados com solução de detergente neutro, enxaguados várias vezes com água destilada esterilizada, imersos em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e mantido sem agitação por 15 min. Em condições assépticas de cabine de fluxo laminar, os endocarpos foram enxaguados por três vezes com água destilada esterilizada e deixados por 24 h em água esterilizada para amolecer suas estruturas e, por conseguinte, facilitar a remoção dos e.z. Com o auxílio de uma morsa, os endocarpos foram quebrados e os e.z. excisados foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de cultura WPM – *Wood Plant Medium* – (LLOYD; MCCOWN, 1981) suplementado com 3% de carvão ativado.

Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento sob temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 h de luz com intensidade de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, obtida por meio de lâmpadas brancas e 12 h de escuro.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de 10 e.z. por temperatura e período de congelamento. Os dados de regeneração foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida da comparação das médias pelo teste de Bonferroni ($P > 0,05$). O programa utilizado para a análise estatística foi GraphPad Prism (@2017 GraphPad Software Inc.).

Resultados e Discussão

Antes do congelamento (controle), o percentual de regeneração dos e.z. excisados dos endocarpos foi de 100%. Para endocarpos congelados a -20°C , a regeneração máxima de 100% foi obtida para e.z. excisados de endocarpos armazenados por 2, 4 e 8 meses. No sexto mês, o percentual de regeneração foi de 96%, porém esse valor não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$) dos demais valores até o oitavo mês. Para os explantes obtidos de endocarpos congelados a -196°C , a regeneração máxima ocorreu até o sexto mês (Figuras 1 e 2).

O uso de cultura in vitro de e.z. tem sido indicada tanto para a germinação quanto para a avaliação da qualidade de sementes de palmeiras (OLIVEIRA et al., 2016). Isso porque os e.z. possuem suas estruturas bem definidas morfológicamente, podendo regenerar uma plântula com sistemas aéreo e radicular normais (ENGELMANN, 1992). Resultados promissores foram obtidos com e.z. de *B. eriospatha*, que atingiram 80% de germinação em quatro semanas, quando cultivados em meio de cultura MS acrescido de ácido giberélico (GA3) à concentração de 8 mg.L^{-1} (WALDOW et al., 2013). No entanto, na presente pesquisa, não houve necessidade de suplementar o meio de cultura com reguladores de crescimento para estimular o crescimento e desenvolvimento dos e.z. de *B. eriospatha* (Figura 1).

O bom desenvolvimento dos e.z. in vitro pode ser atribuído à composição do meio de cultura, que disponibilizou de forma balanceada nutrientes necessários ao crescimento dos explantes. Outro fator que pode ter igualmente contribuído para o crescimento dos explantes foi seu reduzido tamanho, de 1 a 6 mm de comprimento (HOFFMANN et al., 2014). Segundo Engelmann (1992), quanto menor o tamanho do explante maior é a chance de regeneração após a exposição à temperatura criogênica. Esses fatores, eficiência do meio de cultura e tamanho do explante, prevaleceram para e.z. excisados de endocarpos congelados em ambas as temperaturas (Figura 2).

Foto: Antonieta Nassif Salomão



Figura 1. Plântulas de *Butia eriopatha* (Mart. ex. Drude) Becc. - Areaceae desenvolvidas a partir de embriões zigóticos cultivados em meio de cultura WPM.

No oitavo mês de congelamento, os e.z. isolados de endocarpos congelados a -20°C mantiveram 100% de regeneração. Por outro lado, aqueles isolados de endocarpos congelados a -196°C apresentaram perda significativa ($P < 0,05$) do percentual de regeneração, que foi de 76% (Figura 2, Tabela 1). Após 10 meses de congelamento, observou-se alto índice de contaminação do material por bactérias, principalmente para aqueles congelados a -20°C . Isso resultou em decréscimo significativo ($P < 0,05$) dos valores de regeneração dos explantes, que foram de 44% (-20°C) e de 64% (-196°C) [Figura 2, Tabela 1].

O princípio fundamental que garante a integridade do germoplasma durante a conservação é sua tolerância à desidratação e às temperaturas subzero de armazenamento (KAVIANI, 2011).

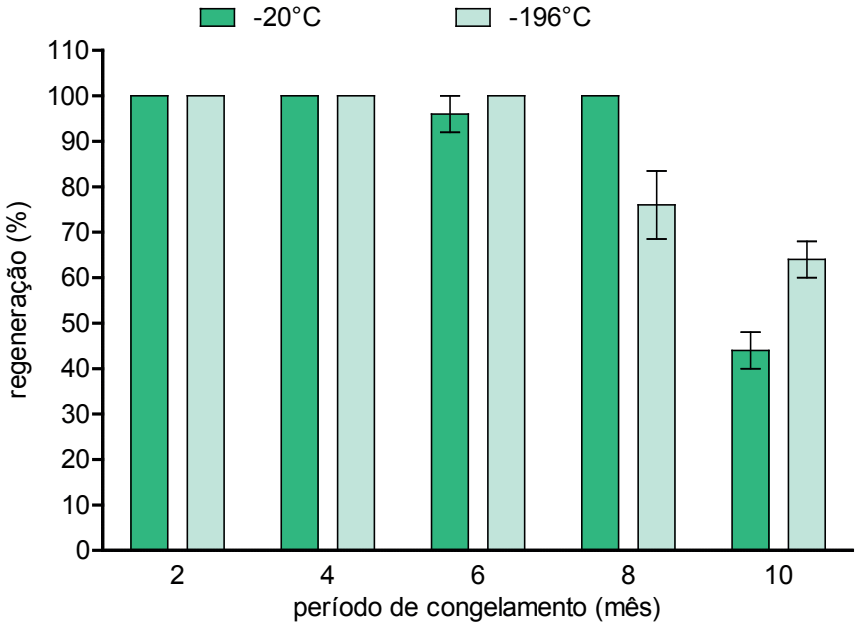


Figura 2. Percentuais de regeneração em meio de cultura WPM de eixos embrionários de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. - Arecaceae excisados de endocarpos congelados a -20°C e a -196°C por diferentes períodos.

Tabela 1. Comparação de médias de regeneração obtidas por embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. - Arecaceae pelo pós-teste de Boferroni.

Período de congelamento (meses)	Diferença entre médias por temperatura de congelamento	t	P	Significância
2	0,0	0,0	$P > 0,05$	ns
4	0,0	0,0	$P > 0,05$	ns
6	4,000	0,8771	$P > 0,05$	ns
8	-24,00	5,262	$P < 0,001$	***
10	20,00	4,385	$P < 0,001$	***

Em sementes de palmeiras, as características fisiológicas para fins de conservação são variáveis. Há espécies que dispõem de mecanismos de reparo aos estresses causados tanto pela retirada de água de tecidos e células quanto pelo congelamento e descongelamento do germoplasma. Um exemplo disso são as sementes da palmeira *Attalea vitrivir* Zona, que têm comportamento ortodoxo sendo bastante tolerantes ao armazenamento devido à estabilidade de seus óleos (OLIVEIRA et al., 2016).

Há espécies de palmeiras que dispõem de mecanismos parcialmente eficazes de tolerância à dessecação e à exposição a temperaturas subzero, como as sementes de *Chamaerops humilis* (L.) que são sensíveis à dessecação e há maior decréscimo de percentual germinativo para sementes armazenadas por 85 dias a 5°C, -18°C e -80°C que para sementes armazenadas em -196°C (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2006). Há, ainda, espécies em que os mecanismos de reparo são inexistentes ou quase inexistentes, como em sementes de *Archontophoenix alexandrae* (Wendl. & Drude), que são recalcitrantes e muito sensíveis à desidratação a teores de água abaixo de 31,5%, sendo o teor de água de 17,8% letal, ou seja, há perda total da capacidade germinativa (MARTINS et al., 2003).

Os endocarpos de *B. eriospatha* não foram submetidos a diferentes períodos de dessecação. Esses foram congelados, em ambas as temperaturas, com teor de água de 7,3%, valor esse obtido após despolpe dos frutos e permanência dos endocarpos em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. O poder de regeneração inicial dos e.z. foi de 100%. É provável que esse teor de água não tenha interferido na integridade do material durante o congelamento. A complexa interação entre outros fatores, como as taxas de congelamento e descongelamento, pode ter comprometido a integridade do material de *B. eriospatha* durante o processo de congelamento e descongelamento.

As características intrínsecas de cada espécie determinam as

velocidades nas quais elas devem ser congeladas e descongeladas. Sementes de *B. eriospatha* têm de 26% a 50% de óleo composto por ácidos graxos, como os ácidos prolínico, láurico, cáprico e oléico (HOFFMANN et al., 2014). Em geral, sementes lipídicas são tolerantes à dessecação, mas podem ser sensíveis às temperaturas subzero, sobretudo a de -196°C (BHOWMIK et al., 2011). Durante o congelamento em condições criogênicas, pode ocorrer em sementes oleaginosas a transição de fase líquida não para a fase vítrea e sim para a sólida, acarretando danos estruturais ao material (CHMIELARZ, 2009). Em temperatura de -20°C , a deterioração das sementes ocorre, sobretudo, porque nessa temperatura o metabolismo basal não é nulo, o que acelera o processo de rancificação dos ácidos graxos.

Protocolos testados para sementes dicotiledôneas e oleaginosas, como as de *Gossypium hirsutum* L. e *Jatropha curcas* L., indicaram que as taxas de congelamento e descongelamento mais favoráveis foram congelamento rápido e descongelamento lento em temperatura ambiente (GONZÁLEZ-BENITO et al., 1998; SALOMÃO et al., 2016). Entretanto, Engelmann (2004) propõe que o descongelamento deve ser o mais rápido possível para evitar que haja a recristalização do gelo em condições termodinâmicas favoráveis, o que aumenta a dimensão do gelo causando efeito deletério ao material. Grout (2017), referindo-se às sementes lipídicas, argumenta que existe o risco de que pequenas quantidades de cristais de gelo possam se formar durante o descongelamento devido às alterações de fase lipídica, permitindo que esses cristais coalesçam, formando estruturas maiores que causam injúrias às sementes. Resultados favoráveis foram obtidos para sementes de *Butia capitata* utilizando-se o descongelamento rápido em banho-maria a 40°C por cerca de 90 segundos (FRUGERI, 2016). Embora tenha-se adotado o descongelamento rápido (banho-maria a 39°C) para os endocarpos de *B. eriospatha*, provavelmente o tempo de exposição a essa temperatura (5 min.) pode ter comprometido sua integridade.

Para o material congelado a -196°C , os percentuais de regeneração

foram decrescendo gradativamente do oitavo para o décimo mês de congelamento, 76% e 64%, respectivamente; enquanto para o material congelado a -20°C esse decréscimo foi abrupto, de 100% no oitavo mês para 44% no décimo mês. Esse decréscimo significativo da capacidade de regeneração de *B. eriospatha* foi igualmente observado em sementes de palmeira real australiana, *Archontophoenix alexandrae* (Wendl. & Drude), em que o processo deteriorativo foi progressivo e culminou com a total perda da capacidade germinativa (MARTINS et al., 2003). Além disso, sementes oleaginosas são mais susceptíveis ao ataque de patógenos durante o armazenamento e estão sujeitas à rancificação dos ácidos graxos que compõem seu óleo (GOLDFARB et al., 2010). Portanto, a interação entre injúrias causadas pelo tempo de exposição à temperatura de descongelamento, a provável rancificação dos óleos por hidrólise, oxidação ou fermentação e a deterioração causada por bactérias podem ter contribuído para os baixos valores de regeneração dos e.z. obtidos de endocarpos de *B. eriospatha* congelados em temperaturas subzero. Entretanto, em temperatura criogênica a perda do poder de regeneração de *B. eriospatha* foi gradual. Conforme observado, a criopreservação foi indicada como técnica potencial para a conservação de germoplasma de distintas procedências de *B. capitata* (FRUGERI, 2016; DIAS et al., 2015).

Conclusões

A perda da capacidade de regeneração foi mais abrupta para e.z. de *B. eriospatha* obtidos de endocarpos congelados a -20°C do que a -196°C . Sob temperatura de -20°C por oito meses, o material manteve-se com 100% de seu poder de regeneração. Em contraste, após 10 meses de exposição a -20°C , o poder de regeneração foi de 44%, enquanto para o material submetido à temperatura de -196°C a regeneração foi de 64%. Para a melhor adequação do protocolo de conservação ex situ da espécie, sugere-se testar diferentes períodos de descongelamento rápido e de descongelamento lento, após armazenamento em condições criogênicas.

Referências

BEUGRÉ, M. M.; KOUAKOU, L. K.; BOGNONKPÉ, J. P.; KONAN, K. E.; KOUAKOU, T. H.; KOUADIO, Y. J. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 10, p. 931-937. 2009.

BHOWMIK, S. S. Das; KUMARIA, S.; TANDON, P. Long-term conservation through cryopreservation of immature seed of *Mantisia spathulata* and *Mantisia wengeri*: two endangered plants of north-east India. **Cryo-Letters**, v. 32, n. 6, p. 498-505. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA-ACS, 2009. 395 p.

BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G. Conhecimento tradicional associado ao uso de butiás (*Butia* spp., Arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1069-1075, 2009.

CHMIELARZ, P. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: Mazzard cherry (*Prunus savium* L.). **Annals of Forest Science**, v. 66, n. 4, p. 405-409. 2009.

DIAS, D. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, L. A. A.; MENDES, E. V.; CARVALHO, V. S. Tolerance of desiccation and

cryopreservation of *Butia capitata* palm seeds. **Seed Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 90-100. 2015.

DICKIE, J. B.; BALICK, M. J.; LININGTON, I. L. Experimental investigations into the feasibility of ex situ preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. **Biodiversity and Conservation**. v. 1, p. 12-119, 1992.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. In **Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLAIS, A. (eds.). **Reproductive biology and plant breeding: Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes**. New York. Springer-Verlag. p. 281-290, 1992.

FACHINELLO, J. C.; SCHWARTZ, E. **Butia**: ficha técnica. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/butia/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

FERREIRA, E. J. L. **Diversidade e importância econômica das palmeiras da Amazônia brasileira**. Disponível em: <<http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/56CNBot/56CNBot-2203.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

FRUGERI, G. C. **Caracterização de endocarpos e conservação ex situ de populações de *Butia capitata* [Mart. (Becc.) [Arecaceae]**. 2016. 49 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas.

GOLDFARB M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, n. 23, v. 1, p. 27-33, 2010.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; HUERTAS-MICÓ, M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination and storage of *Chamaerops humilis* (dwarffan palm). **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 143-150. 2006.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F.-C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 17-20, 1998.

GROUT, B. **Current developments in seed cryopreservation**. Disponível em: <<http://danseed.dk/fileadmin/danseed/danseed-1710.pdf>>. Acesso em 2 mar. 2017.

HOFFMANN, J. F.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *Butia* spp. (Arecaceae): an overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122-131, 2014.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 778-800. 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOPES, G. L. ***Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. Butia-veludo**. Disponível em: <<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/8126-2/>> Acesso em: 18 fev. 2017.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 88-92, 2003.

MATOS, E. H. da S. F. **Utilização e aplicação de palmeiras para**

paisagismo. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Dossiê Técnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - CDT/UnB, 2012. 23 p.

MEEROW, A. W.; BROCHAT, T. K. **Palm Seed Germination.** Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/EP/EP23800.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

MODOLO, V. A. **Palmitos da flora brasileira.** Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_1/pal18.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

MURPHY, V.; CLASE, T.; RODRÍGUEZ-PEÑA, R. A.; JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, F.; JESTROW, B.; HUSBY, C. E.; GRIFFITH, M. P. Conservation horticulture for Yarey Palm and Buccaneer Palm: substrate and sowing depth affect germination and early seedling growth. **HortTechnology**, v. 26, n. 6, p. 811-815. 2016.

NAZARENO, A. G. **Conservação de *Butia eriosthata* (Martius ex Drude) Beccari (Arecaceae): uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção.** 2013. 141 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

OLIVEIRA, R. A. D. de; NEVES, S. da C.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; SILVÉRIO, F. O. Storage, oil quality and cryopreservation of babassu palm seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 332–339. 2016.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; JOSÉ, S. C. B. R.; SILVA, J. P. da; LAVIOLA, B. G. Methods to assess the viability of cryopreserved *Jatropha curcas* L. seed germplasm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 391-398, 2016.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; WALTER, B. M. T. Coleta e conservação de recursos genéticos ex situ: sementes de espécies

florestais nativas. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; SILVA, A. da. (Ed.). **Sementes florestais: da ecologia à produção**. Londrina: Abrates, p. 167-178. 2015.

SGANZERLA, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá**. 2010. 104 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

SOLÓRZANO, S.; ARIAS, S.; DÁVILA, P. Genetics and conservation of plant species of extremely narrow geographic range. **Diversity**, n. 8, v. 31. 2016. DOI 10.3390/d8040031 www.mdpi.com/journal/diversity.

VANDEPITTE, K.; GRISTINA, A. S.; De RAEDT, R.; ROLDÁN-RUIZ, I.; MARCENÒ, C.; SCIANDRELLO, S.; HONNAY, O. Conservation genetics of an endemic from the Mediterranean Basin: high genetic differentiation but no genetic diversity loss from the last populations of the Sicilian Grape Hyacinth *Leopoldia gussonein*. **Conservation Genetics**, 2013. DOI 10.1007/s10592-013-0487-6.

WALDOW, D. A. G.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; CURTI, A. R. In vitro culture of zygotic embryos of *Butia eriospatha*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2179-2188, 2013.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

