

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**SUELEN MARTINEZ GUTERRES**

**ENCAPSULAMENTO E CONSERVAÇÃO VIA CONGELAMENTO A -80°C DE  
EMBIÕES MADUROS DE *Butia capitata* (Mart.) Becc.**

**São Gabriel  
2019**

**SUELEN MARTINEZ GUTERRES**

**ENCAPSULAMENTO E CONSERVAÇÃO VIA CONGELAMENTO A -80°C DE  
EMBIÕES MADUROS DE *Butia capitata* (Mart.) Becc.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia - Bacharelado da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

**São Gabriel  
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G983e Guterres, Suelen Martinez  
ENCAPSULAMENTO E CONSERVAÇÃO VIA CONGELAMENTO A -80°C DE  
EMBIÕES MADUROS DE *Butia capitata* (Mart.) Becc. / Suelen  
Martinez Guterres.  
36 p.  
  
Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade  
Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2019.  
"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".  
  
1. Criopreservação. 2. Embriões zigóticos. 3.  
Encapsulamento. I. Título.

**SUELEN MARTINEZ GUTERRES**

**ENCAPSULAMENTO E CONSERVAÇÃO VIA CONGELAMENTO A -80°C DE  
EMBIÕES MADUROS DE *Butia capitata* (Mart.) Becc.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia – Bacharelado da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 28 de novembro de 2019.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
Orientador  
UNIPAMPA

---

Ms. Daniele Damian dos Santos  
UNIPAMPA

---

Ms. Thiago Sanches Ornellas  
(UFSC)

Dedico este trabalho aos meus pais, Rene e Sueid (*in memoriam*) que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e encorajando; ao meu irmão Rafael e meu sobrinho Luiz Henrique, por serem a luz da minha vida.

## AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, principalmente a minha mãe Sueid (*in memoriam*) por ter sido o meu exemplo de vida, e em nenhum momento saiu do meu pensamento, essa conquista também é tua, teu sonho de formar os dois filhos vai se realizar.

Ao meu irmão Rafael, por ser o anjo da minha vida, por sempre me apoiar, e principalmente me escutar em meus momentos de desespero, te amo.

Aos meus avós, tios e familiares, por entenderem a minha ausência e me apoiar na realização do meu sonho.

Aos meus professores, Valdir Marcos Stefenon e Juliano Tomazzoni Boldo, que acompanharam a minha jornada e me deram todo o apoio necessário para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, principalmente ao meu “coorientador” Ms. Paulo Roberto Diniz, por todos os ensinamentos passados a mim, minha eterna gratidão.

As minhas colegas de curso, Bárbara, Jaqueline, Lavynia, Bryan e Yuri por todos os conselhos, palavras de apoio, puxões de orelha e risadas (essas não faltaram), vocês são incríveis.

A minha colega de casa, Flávia, nunca pensei que uma desconhecida pudesse se tornar uma irmã, obrigada por tudo, tens um lugar especial em meu coração.

Aos meus amigos Alegretenses, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e encorajando, vocês são maravilhosos.

A todos os amigos que a UNIPAMPA e a vinda pra São Gabriel me proporcionaram, vocês fizeram a minha vida muito mais fácil, minha eterna gratidão a vocês.

“O essencial é invisível aos olhos”.

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

A família Arecaceae está distribuída por vários países da América do Sul. Dentro dessa família está a espécie *Butia capitata* (Mart.) Becc., que encontra-se atualmente ameaçada pelo desmatamento e pelo extrativismo predatório, o que acaba limitando o estabelecimento de bancos de sementes. Com o objetivo de solucionar problemas decorrentes da dificuldade de germinação e da desuniformidade das plântulas formadas *in situ*, a propagação *in vitro*, via cultura de embriões, é uma ferramenta de grande importância para espécies do gênero *Butia*. . O processo de criopreservação é, em teoria, aplicável a quaisquer tecidos que tenham capacidade de regeneração, tendo sido aplicado com sucesso em várias espécies vegetais, utilizando como fonte calos, ápices, embriões somáticos e zigóticos e células em suspensão. Tratando-se de criopreservação, destaca-se o uso da tecnologia de sementes sintéticas, uma ferramenta biotecnológica de fácil produção e manipulação de propágulos, abrindo perspectivas promissoras em áreas como a de intercâmbio de germoplasma. Concomitantemente com o desenvolvimento da técnica de sementes sintéticas foram desenvolvidas outras diferentes maneiras de criopreservação, entre elas o encapsulamento-desidratação e o encapsulamento-vitrificação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso das técnicas de encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação, visando a preservação por congelamento da espécie *Butia capitata* e avaliar o uso do encapsulamento na sua germinação. Foram coletados frutos maduros de *Butia capitata* de matrizes localizadas no município de São Gabriel/RS. O mesocarpo e o endocarpo do fruto foram retirados para a obtenção das amêndoas, sendo excisadas com o auxílio de um bisturi para realizar o resgate dos embriões, que sofreram uma desinfestação utilizando 0,25% de hipoclorito de sódio por 10 minutos e lavados em água destilada estéril por 10 minutos. Para o encapsulamento dos embriões foi utilizado alginato de sódio 2,5% diluído em meio ½ MS e foi utilizado cloreto de cálcio 0,1 M para que ocorresse a sua complexação. No T0, os embriões foram inoculados meio de cultura ½ MS. No T1 os embriões foram encapsulados e postos para germinar, T2 os embriões foram encapsulados e expostos a -80 °C, T3 os embriões foram encapsulados, submetidos a uma desidratação em sílica gel no fluxo laminar por um período de 4 horas e expostos a -80 °C. No T4 os embriões foram encapsulados, desidratados em 0,3 M, e 0,6 M de sacarose e depois foram embebidos em solução PVS3. Os tratamentos, T3 e T4, também foram submetidos a temperatura de -80 °C por 4 horas e depois descongelados a 60 °C por 90 segundos. As porcentagens de germinação obtidas foram de 91,7% e 70,8% para T0 e T1,



respectivamente. Os embriões dos tratamentos T2, T3 e T4 não germinaram. Concluímos que foi possível obter a germinação dos embriões apenas quando não houve congelamento, sugerindo assim novos estudos para a criopreservação da espécie.

Palavras-Chave: embriões zigóticos, encapsulamento, criopreservação.

## ABSTRACT

The Arecaceae family is distributed in several South American countries. Within this family is the species *Butia capitata* (Mart.) Becc., which is currently threatened by deforestation and predatory extraction, which eventually limits the establishment of banks. seeds. In order to solve problems arising from the difficulty of germination and the unevenness of seedlings formed in situ, in vitro propagation via embryo culture is a very important tool for *Butia* species. . The cryopreservation process is theoretically applicable to any regenerative tissue and has been successfully applied to various plant species using callus, apex, somatic and zygotic embryos and suspen- sive cells. In the case of cryopreservation, the use of synthetic seed technology, a biotechnological tool of easy production and manipulation of propagules, stands out, opening promising perspectives in areas such as germplasm exchange. Concurrent with the development of the synthetic seed technique other different ways of cryopreservation were developed, including encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. The objective of the present study was to evaluate the use of encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification techniques, aiming at freezing preservation of the species *Butia capitata* and to evaluate the use of encapsulation in its germination. Ripe fruits of *Butia capitata* were collected from matrices located in São Gabriel / RS. The mesocarp and endocarp of the fruit were removed to obtain the almonds, excised with the help of a scalpel to rescue the embryos, which suffered a disinfestation using 0.25% sodium hypochlorite for 10 minutes and washed in water. sterile distilled for 10 minutes. For embryo encapsulation, 2.5% sodium alginate diluted in ½ MS medium was used and 0.1 M calcium chloride was used for its complexation. At T0, the embryos were inoculated with culture medium ½ MS. At T1 the embryos were encapsulated and germinated, T2 the embryos were encapsulated and exposed to -80 ° C, T3 the embryos were encapsulated, subjected to laminar flow silica gel dehydration for 4 hours and exposed to -80 ° C. ° C. At T4 the embryos were encapsulated, dehydrated to 0.3 M, and 0.6 M sucrose and then soaked in PVS3 solution. The treatments T3 and T4 were also subjected to a temperature of -80°C for 4 hours and then thawed at 60°C for 90 seconds. The germination percentages obtained were 91.7% and 70.8% for T0 and T1, respectively. The embryos of treatments T2, T3 and T4 did not germinate. We concluded that it was possible to obtain embryo germination only when there was no freezing, thus suggesting further studies for the cryopreservation of the species.

Keywords: zygotic embryos, encapsulation, cryopreservation

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Indivíduos adultos de *Butia capitata* dos quais foram coletados os frutos maduros para a excisão dos embriões .....17
- Figura 2** – Esquema demonstrativo do processo de obtenção dos embriões zigóticos.....18
- Figura 3** – Embrião intumescido após 90 dias de cultivos depois de ser exposto a dessecação em sílica gel e congelado a -80°C.....24
- Figura 4** – Comparação da germinação dos embriões encapsulados e não encapsulados.....27
- Figura 5** – Germinação dos embriões com 30, 75, 90 dias de cultivo respectivamente.....25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos tratamentos utilizados.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2</b> – Porcentagem de germinação e intumescimento por tratamento.....	<b>25</b>
<b>Tabela 3</b> – Valores das médias para os tratamentos T0 e T1.....	<b>26</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Coleta do material vegetal</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Obtenção das unidades encapsuláveis</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Tratamentos para encapsulamento</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4 Meio de cultura utilizado para germinação</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	<b>22</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Butia* pertence à família Arecaceae e está distribuído por vários países da América do Sul, com diversas espécies presentes no território brasileiro (FRUGERI et al., 2016). Dentro desse gênero, a espécie *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Figura 1), popularmente conhecido como coquinho-azedo, ocorre naturalmente nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais no bioma cerrado, podendo também ser encontrada na região Sul do Brasil, junto com outras espécies de *Butia*. A espécie possui grande potencial ornamental além de ser explorada para venda e consumo dos seus frutos *in natura* e/ou seus produtos processados, como sucos, polpa e sorvete, representando uma fonte de renda importante para a população rural (DA CONCEIÇÃO NEVES et al., 2010). A espécie encontra-se atualmente ameaçada pelo desmatamento e pelo extrativismo predatório, o que acaba limitando o estabelecimento de bancos de sementes (MERCADANTE-SIMÕES et al., 2008).

A obtenção de plantas a partir de técnicas como a micropropagação tem se tornado uma realidade para a grande maioria das espécies cultural e socialmente relevantes, principalmente quando se trata da sua importância medicinal, econômica e ecológica. Nesse tipo de propagação são controladas as condições químicas, físicas e biológicas envolvidas no processo de cultivo (DANTAS e STEFENON, 2019). A micropropagação é definida pelo cultivo de células, órgãos ou tecidos vegetais em um meio de cultura nutritivo em um ambiente asséptico e controlado (LOPES DA SILVA et al. 2019). O princípio básico da cultura de tecidos é baseado na totipotência celular, ou seja, na premissa de que todas as células do organismo vegetal, contém a informação genética suficiente para o desenvolvimento de uma planta completa. Essa técnica pode ser utilizada para a criação de cultivares superiores ou como uma alternativa a programas de melhoramento genético (DANTAS e STEFENON, 2019).

Dentre as principais vantagens da utilização dessa técnica está a possibilidade de obter-se várias plantas a partir de um único explante (ERIG et al., 2005). Na cultura de tecidos vegetais, algumas escolhas são cruciais e podem influenciar a micropropagação *in vitro*. Dentre elas a umidade relativa do ar, o fotoperíodo e a temperatura, além de fatores intrínsecos ao crescimento e ao desenvolvimento vegetativo da planta, como o desenvolvimento nutricional do meio nutritivo e a aplicação de fitorreguladores. A definição do meio de cultura varia de acordo com a espécie e deve conter a concentração adequada de macro e micronutrientes essenciais, além de fitorreguladores, imprescindíveis para o sucesso da técnica (LEITZKE, 2010).

Teixeira (1991), trabalhando com *Elaeis guineenses* Jacq; sugeriu a utilização de embriões imaturos ou maduros como fonte de explantes devido às vantagens que estes tipos de tecidos possuem, como a facilidade de colheita, utilização em larga escala e, principalmente, pela proteção do embrião contra fungos e bactérias, resultando na diminuição no número de contaminações, além do fato de que embriões zigóticos apresentam elevada totipotência.

Com o objetivo de solucionar problemas decorrentes da dificuldade de germinação e da desuniformidade das plântulas de palmeiras formadas *in situ*, a propagação *in vitro*, via cultura de embriões, é uma ferramenta de grande importância para espécies do gênero *Butia*. A técnica permite, entre outras aplicações, a produção de plantas livres de patógenos, auxilia na superação da dormência em certos tipos de sementes e facilita a aceleração de programas de melhoramento. Tais programas, especialmente de palmeiras, são complexos e lentos devido ao ciclo longo das plantas, ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa e hábitos de crescimento, já que a produção de perfilhos está restrita somente a algumas espécies (BANDEIRA et al., 2013). A utilização de embriões zigóticos na propagação *in vitro* é frequentemente utilizada na propagação e conservação de muitas palmeiras, como relatado para a espécie *Cocos nucifera*, que teve um aumento das taxas de germinação, uniformidade das plantas e conversão de plântulas viáveis (DA SILVA LEDO et al., 2007). Resultados como esse apontam para o grande potencial dessa técnica para viabilizar a produção de mudas dessa espécie, contornando as dificuldades encontradas na germinação que representam um entrave no estabelecimento de plantios racionais e de alta produtividade.

O sucesso da utilização de embriões zigóticos para a micropropagação também depende da qualidade do armazenamento destes tecidos. Uma das formas é a criopreservação, que pode ser definida como a conservação do material biológico em temperaturas ultrabaixas. Uma coleção de germoplasma em nitrogênio líquido é considerada uma coleção de base e tem caráter complementar, pois garante a segurança e estabilidade do material genético conservado (SANTOS, 2000). De acordo com Berjack et al (2000), os embriões zigóticos são usados com sucesso na criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediárias ou com problemas de armazenamento, além disso, os embriões são tecidos altamente organizados, capazes de regenerar plantas completas, e reduzindo o risco de variação somaclonal. O processo de criopreservação é, em teoria, aplicável a quaisquer tecidos que tenham capacidade de regeneração, tendo sido aplicado com sucesso em várias espécies vegetais, utilizando como fonte calos, ápices, embriões somáticos

e zigóticos e células em suspensão (ENGELMAN, 1997; SANTOS, 2000; DANTAS e STEFENON, 2019).

O desenvolvimento de protocolos de criopreservação para espécies vegetais tem tido um aumento nos últimos anos devido a necessidade de criação de bancos de germoplasma. O principal fator com relação ao desenvolvimento desses protocolos na preservação de plantas, tem sido concomitantemente aperfeiçoado na técnica de cultura de tecidos (BENSON et al., 1998). No entanto, a validação desses procedimentos de criopreservação é fundamental para o desenvolvimento de bancos de germoplasma (REED et al., 2001). Para o sucesso dessa técnica, as células, tecidos ou órgãos devem ser condicionadas para sobreviver a temperaturas ultrabaixas através da manipulação da quantidade de água (ENGELMANN, 1997).

Tratando-se de criopreservação, destaca-se o uso da tecnologia de sementes sintéticas, uma ferramenta biotecnológica de fácil produção e manipulação de propágulos, abrindo perspectivas promissoras em áreas como a de intercâmbio de germoplasma, conservação de germoplasma vegetal *in vitro* e produção massal de propágulos (PEREIRA et al., 2007). Concomitantemente com o desenvolvimento da técnica de sementes sintéticas foram desenvolvidas outras diferentes maneiras de criopreservação, entre elas o encapsulamento-desidratação e o encapsulamento-vitrificação (SAKAI et al., 2007; GOLZALEZ-ARNÃO et al., 2006).

Uma das metodologias utilizadas para a criopreservação de plantas é a desidratação por evaporação, que consiste em desidratar os explantes por exposição ao ar contínuo da câmara de fluxo ou em sílica gel. Esse procedimento foi aprimorado utilizando o encapsulamento dos explantes em matriz de alginato, técnica essa desenvolvida por Dereuddre e colaboradores (1991), sendo chamada de encapsulamento-desidratação. Encapsular os explantes permite a aplicação subsequente de tratamentos extremos, incluindo pré-cultura com altas concentrações de sacarose e dessecação a baixos índices de umidade, o que seria altamente prejudicial ou letal para as amostras não encapsuladas. Devido à dessecação dos explantes, a maioria ou todas as unidades a serem congeladas, tem a água removida das células e a vitrificação dos solutos internos ocorre durante a exposição ao nitrogênio líquido, evitando a cristalização intracelular letal de gelo (GOLZALEZ-ARNÃO et al., 2006). Já outra metodologia bastante conhecida na criopreservação é a vitrificação, que permite o congelamento dos explantes em um curto período de tempo. No entanto, é complexo tratar um grande número de amostras com essa técnica pois a duração das etapas de um protocolo de vitrificação geralmente é muito curta e requer uma duração precisa, e explantes de pequeno porte como os embriões zigóticos de *B. capitata* são difíceis de



manipular. Entretanto, explantes encapsulados com sucesso são de fácil manuseio, surgindo assim uma nova técnica denominada encapsulamento-vitrificação, que combina as vantagens da vitrificação e a facilidade de manuseio com o auxílio do encapsulamento (MATSUMOTO et al., 1995).

Trabalhos apontam que, a regeneração de plântulas a partir de tecidos criopreservados é influenciada pelas condições de cultivo após a criopreservação (GLAGLIARDI et al., 2003). Nesse sentido, a cultura de embriões deve ser considerada um passo crítico para o estabelecimento de banco de germoplasma, integrando protocolos de germinação e facilitando o intercâmbio de germoplasma (ENGELMANN et al., 2002).

Com o objetivo de solucionar problemas decorrentes da dificuldade de germinação e da desuniformidade das plântulas de palmeiras formadas *in situ*, a propagação *in vitro*, via cultura de embriões, é uma ferramenta de grande importância para espécies do gênero *Butia*. E considerando também a dificuldade da manutenção de um banco de germoplasma para a espécie *Butia capitata*, em função da recalcitrância das suas sementes, o resgate de embriões zigóticos maduros de *B. capitata* e a sua conservação via congelamento surge como uma possibilidade para a criação de bancos de germoplasma para essa espécie, visto que a técnica utilizando o congelamento e não a imersão em nitrogênio líquido já foi utilizada com sucesso anteriormente. Dessa forma, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar o uso das técnicas de encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação visando a criopreservação da espécie *B. capitata* além de avaliar o uso do encapsulamento na sua germinação.

FIGURA 1 – Indivíduos adultos de *Butia capitata* dos quais foram coletados os frutos maduros para a excisão dos embriões



Fonte: Arquivo Pessoal

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o uso das técnicas de encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação visando a preservação por congelamento de embriões zigóticos da espécie *Butia capitata*.

### **2.2 Objetivos específicos**

**2.2.1** Avaliar o efeito do congelamento na germinação de embriões tratados por diferentes técnicas

**2.2.2** Avaliar o desenvolvimento de raízes após o congelamento;

**2.2.3** Avaliar o desenvolvimento de folhas nas plântulas após o congelamento;

**2.2.4** Avaliar a germinação dos embriões zigóticos;

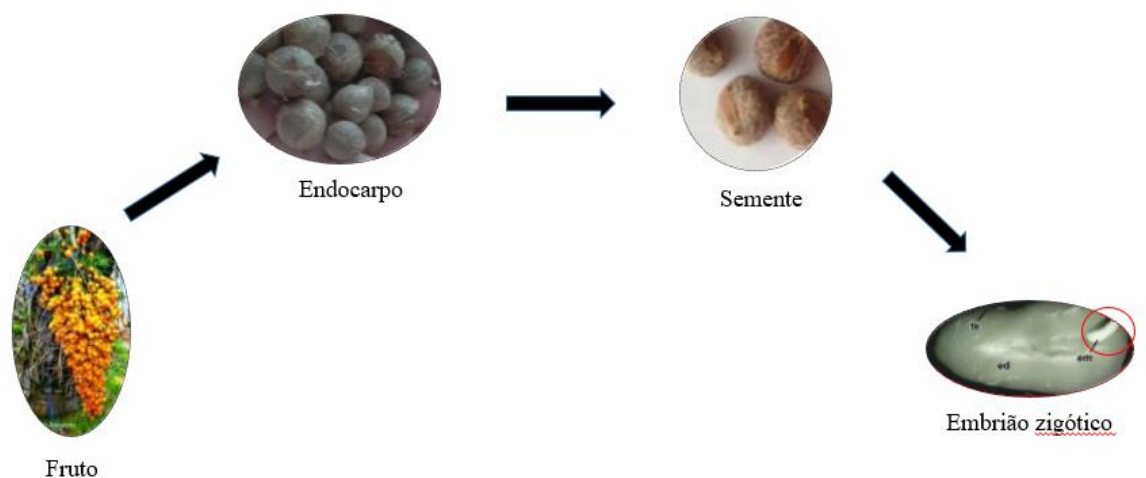
### 3 METODOLOGIA

Este trabalho foi conduzido no Laboratório Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia II, localizado na Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel.

#### 3.1 Coleta do Material

Frutos maduros de *Butia capitata* foram coletados de duas matrizes localizadas no município de São Gabriel/RS. Os frutos coletados apresentavam coloração amarelada, considerado o estado de maturação ótimo para consumo por avaliação visual. O mesocarpo do fruto foi retirado, restando apenas o endocarpo em evidência. O endocarpo foi lavado com água não estéril e posto para secagem em temperatura ambiente pelo período de uma semana. Logo após esse período, as amêndoas foram removidas do endocarpo e excisadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi paralelamente à cavidade embrionária para a obtenção dos embriões (Figura 2 B). Após o resgate dos embriões, estes foram dispostos em placas de Petri contendo água destilada para evitar o seu ressecamento. Logo após a obtenção de todos os embriões necessários, ocorreu a transferência para a cabine de fluxo, onde foi realizada a sua desinfestação e encapsulamento, conforme descrito no item 3.2

FIGURA 2- Esquema demonstrativo do processo de obtenção dos embriões zigóticos



### 3.2 Obtenção das unidades encapsuláveis

Os embriões excisados foram submetidos a uma desinfestação utilizando 0,25% de hipoclorito de sódio por 10 minutos e lavados em água destilada estéril por 10 min. Após, com auxílio de uma pipeta Pasteur, os embriões foram aspirados juntamente com a solução de alginato de sódio e gotejados na solução de cloreto de cálcio 0,1 M por 20 min para que ocorresse a complexação das cápsulas. Todos os procedimentos foram realizados na capela de fluxo laminar.

Para a obtenção dos embriões encapsulados foi utilizado alginato de sódio (Sigma) a 2,5% (m/v) diluído em meio ½ MS (Sigma, ref. 5519) (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e cloreto de cálcio 0,1 M que foi utilizado para que ocorresse a sua complexação. Após o processo de complexação, as cápsulas formadas foram então mergulhadas em água destilada autoclavada, que fosse retirado o excesso de cloreto de cálcio.

### 3.3 Tratamentos pós encapsulamento

Foram realizados 5 tratamentos para a avaliação da germinação dos embriões e tolerância ao congelamento. Os tratamentos estão apresentados de maneira esquematizada na tabela 1. No Tratamento Controle (T0), os embriões foram inoculados meio de cultura ½ MS. No Tratamento 1 (T1) os embriões foram submetidos ao encapsulamento e logo após inoculados em seu meio de cultivo. No Tratamento 2 (T2) os embriões foram encapsulados, submetidos a uma temperatura de -80 °C durante 4 h, descongelados a uma temperatura de 60 °C durante 1 minuto e colocados para germinar em meio ½ MS. No Tratamento (T3), os embriões foram encapsulados, submetidos a uma desidratação em sílica gel no fluxo laminar por um período de 4 h. Logo após, foi feita uma exposição à temperatura de -80 °C por 4 h, posteriormente descongelados a 60 °C por 1 minuto, submetidos a uma reidratação em solução de sacarose 1,2 M por 20 min e alocados em meio de germinação. O Tratamento 4 (T4) constituiu-se do encapsulamento dos embriões, sendo submetidos às seguintes soluções: sacarose 0,3 M por 60 minutos, seguido de solução de sacaraose a 0,6 M por 60 minutos. Em seguida os embriões excisados foram embebidos em solução PVS3 (sacarose:glicerol, 1:1) por um período de 2 h, mantidos a -80 °C por 4 h, descongelados a 60 °C por 1 minuto, reidratados em solução de sacarose 1,2 M por 20 min e levados para a câmara de germinação.

TABELA 1- Descrição dos tratamentos utilizados no trabalho

	<b>Encapsulamento</b>	<b>Desidratação</b>	<b>Vitrificação</b>	<b>Congelamento</b>	<b>Re-hidratação</b>
<b>T0</b>	Não encapsulado	-	-	-	Não
<b>T1</b>	Encapsulado com matriz AS	-	-	-	Não
<b>T2</b>	Encapsulado com matriz de AS	-	-	-80° por 240 min	Não
<b>T3</b>	Encapsulado com matriz de AS e desidratado com sílica gel	240 min em sílica sob fluxo de ar	-	-80° por 240 min	sacarose 1,2 M por 20 min
<b>T4</b>	Encapsulado com matriz de AS e desidratado com sacarose e tratado com solução PVS3	0,3 M sacarose por 1 min + 0,6 M sacarose por 1 min	PVS3 por 120 minutos	-80° por 240 min	sacarose 1,2 M por 20 min

AS = Alginato de sódio 2,5%.

### 3.4 Meio de cultura utilizado para a germinação

O meio de cultura utilizado para a germinação dos embriões de *Butia capitata* foi o meio ½ MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 30 g.L<sup>-1</sup> e ágar 6 g.L<sup>-1</sup> e pH ajustado em 5,8. O meio foi vertido em 120 tubos de ensaio (10 x 1,3 cm) e logo após autoclavado por 20 min a 121 °C e 1,2 atm. Os embriões foram inoculados e os tubos vedados com papel alumínio e lacrados com filme de PVC. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D sob temperatura controlada de 25±2 °C em ausência de luz por 21 dias. Após esse período, a câmara de crescimento foi reajustada para o fotoperíodo de 16 h por 90 dias.

### **3.5 Análise estatística**

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizados, com quatro repetições, contendo seis unidades amostrais por repetição, sendo cada uma dessas compostas por um tubo de ensaio contendo um embrião zigótico.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste-T unicausal.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos tratamentos utilizados ocorreu após 90 dias de cultivo do embrião em meio de cultura. A Tabela 2 mostra a porcentagem de germinação e o intumescimento dos embriões, que é a primeira alteração morfológica observada, sendo caracterizada pelo seu aumento, nos respectivos tratamentos. Foram considerados germinados todos os embriões que emitiram parte aérea e raiz, originando plântulas completas. No tratamento T0, os embriões apresentaram maior porcentagem de germinação e intumescimento quando comparado ao tratamento T1, provavelmente devido à retirada do endosperma, uma vez que sua rigidez interfere negativamente na germinação de *Butia capitata*. Resultados semelhantes foram observados por Lopes (2011) e Neves (2010), os quais demonstraram que a escarificação e retirada do endosperma aumentou a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de emergência. Seus resultados mostram que embriões isolados de sementes de *B. capitata* apresentaram taxas de germinação acima de 90%, o que sugere a utilização dessa técnica para o cultivo *in vitro* da espécie. Sisunandar (2014) observou que a maturidade do embrião tem relação com a taxa de germinação e com a formação de plantas completas, evidenciando que embriões maduros possuem uma melhor taxa de germinação quando comparada com a de embriões imaturos.

Embora em T1 a retirada do endocarpo também tenha sido realizada, o embrião foi envolto pela matriz de alginato, simulando o endosperma encontrado naturalmente. A matriz de alginato de sódio pode ser menos rígida que o endosperma natural, mas apresenta uma barreira que deve ser rompida pelo embrião para que ocorra a germinação, justificando, assim, uma taxa menor de germinação quando comparado com o tratamento controle (T0).



Em T2, os embriões encapsulados pela matriz de alginato de sódio foram submetidos ao congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Neste tratamento, nenhum embrião foi capaz de germinar. Isso se deve, possivelmente, à ausência de soluções crioprotetoras, demonstrando que a matriz de alginato de sódio não promove a proteção do embrião contra o congelamento. Camillo (2009), trabalhando com *Elaeis guineenses* sugeriu não ser necessário o resgate de embriões zigóticos e nem o uso de crioprotetores, já que a exposição ao nitrogênio líquido de sementes de *E. guineenses* com tegumento se mostrou eficaz para a criopreservação. Sementes de *B. capitata* foram dessecadas em sílica gel e mantiveram a sua viabilidade após dessecação com 5% de umidade e congelamento a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas não toleraram o congelamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (DIAS, 2015). Em *B. capitata*, o alto teor de umidade do embrião, mesmo dentro das sementes desidratadas para níveis próximos a 5%, é um dos fatores que podem explicar a tendência a perda da viabilidade no congelamento (HONG e ELLIS, 1996; CAMILLO et al., 2009). Como citado anteriormente, a matriz de alginato de sódio simula o endosperma do embrião, mas não oferece a mesma rigidez e nem a mesma proteção.

No T3, observou-se que houve uma pequena taxa de intumescimento dos embriões (Figura 3), mas não houve germinação. Frugeri, 2016, trabalhando com embriões zigóticos de *B. capitata*, constatou que as melhores taxas de germinação foram obtidas com 4 horas de dessecação dos embriões zigóticos em câmara de fluxo laminar e submetidas a nitrogênio líquido, apresentando taxa de germinação após a criopreservação superior a 76%. Presume-se que, com o uso do alginato de sódio, a sílica gel retirou o teor de água presente na cápsula e não o presente no embrião. O alginato de sódio ao ser polimerizado com o cloreto de cálcio, embora exerça uma proteção sobre o explante, pode sofrer uma forte e rápida desidratação ao entrar em contato com o ar, tornando a cápsula endurecida e dificultando, ou mesmo impedindo, o desenvolvimento dos explantes e conseqüentemente o rompimento da cápsula (LAMBARDI, 2006). Já o nível de intumescimento encontrado sugere que embora o embrião tenha sobrevivido à criopreservação, ele não foi capaz de romper a barreira produzida pelo alginato de sódio, impedindo a sua germinação. Sugerimos, assim, o uso de nitrato de potássio (100 mM), para que ocorra a descomplexação da cápsula, facilitando a germinação do embrião (CAMPOS, 2016).

FIGURA 3- Embrião intumescido após 90 dias de cultivos depois de ser exposto a dessecação em sílica gel e congelado a -80°C



Fonte: Arquivo pessoal

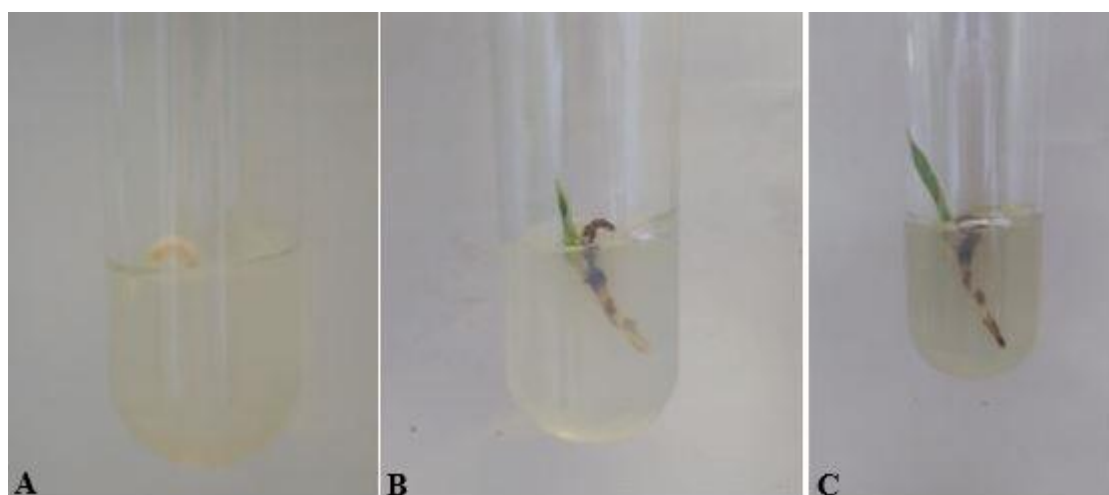
No T4 os embriões encapsulados foram submetidos a uma desidratação pela exposição às soluções com diferentes concentrações de sacarose e tratados com a solução de vitrificação PVS3. Os embriões submetidos a este tratamento também não foram capazes de germinar. A solução de vitrificação PVS3 foi usada, uma vez que dados anteriores mostraram que os embriões somáticos de palmeiras são sensíveis a dimetilsulfóxido (DMSO) que está presente na solução crioprotetora PVS2 (KHAWNIUM et al, 2011). No entanto, a criopreservação de calos e poliembriões de dendezeiro (*E. guineenses*) utilizando PVS2 apresentaram resultados positivos (AL-BAHRANY e AL-KHAYRI, 2012; SURANTHRAN et al.,2012). Na criopreservação de poliembriões de dendezeiros, a incubação em PVS2 por mais de 10 min causou sua morte (SURANTHRAN et al.2012). De forma semelhante, quando os poliembriões não foram incubados em PVS2 e imersos em nitrogênio líquido, eles também morreram. No entanto, a incubação durante 5 min em PVS2 resultou em uma taxa de sobrevivência de 45% e germinação após a criopreservação. Estes resultados sugerem que, embora a família seja a mesma, a compatibilidade com soluções crioprotetoras depende da espécie e do tempo de imersão. Portanto, se fazem necessários testes em diferentes tempos com os crioprotetores PVS2 e PVS3 para determinar qual o melhor tratamento para a espécie *B. capitata*.

TABELA 2: Porcentagem de germinação e intumescimento por tratamento

	<b>Tratamento do Embrião</b>	<b>Intumescimento (%)</b>	<b>Germinação (%)</b>
<b>Controle</b>	Não encapsulado	91,7	91,7
<b>T1</b>	Encapsulado com matriz de AS	70,8	70,8
<b>T2</b>	Encapsulado com matriz de AS e congelado	0,0	0,0
<b>T3</b>	Encapsulado com matriz de AS e desidratado com sílica gel antes do congelamento	8,3	0,0
<b>T4</b>	Encapsulado com matriz de AS desidratado com sacarose e tratado com solução PVS3 antes do congelamento	0,0	0,0

AS = Matriz de alginato

FIGURA 5. Germinação dos embriões com 30 dias de cultivo (A); 75 dias de cultivo (B); 90 dias de cultivo (C).



Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 5, podemos observar o desenvolvimento dos embriões com 30, 75 e 90 dias de cultivo respectivamente. Na Figura 5 A, aos 30 dias, já podemos notar o alongamento do haustório seguido de uma curvatura. Na Figura 5 B, a formação de raízes e início do desenvolvimento de suas folhas são evidentes. Na Figura 5C, notamos um nível maior de desenvolvimento quando comparado com a figura 5 B.

Existe uma grande diversidade no comportamento das sementes de Arecaceae quanto a tolerância a dessecação. Espécies de ambientes úmidos são geralmente classificadas como recalcitrantes pois costumam não tolerar a dessecação, enquanto espécies de ambientes secos são geralmente classificadas como ortodoxas por tolerarem um maior índice de dessecação (DICKIE et al., 1992; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2012). O estudo realizado por Frugeri (2016) demonstrou a possibilidade de criopreservação da espécie *B. capitata*, classificada como recalcitrante para dessecação, quando coletadas em ambientes de clima seco, como o cerrado. Tal clima é diferente do clima característico da região Sul do Brasil, que é mais úmido, sugerindo um comportamento fisiológico diferente, que justificaria a não criopreservação de embriões zigóticos da espécie resgatados no sul do Brasil.

TABELA 3: Valores das médias para os tratamentos T0 e T1

	<b>Tratamento do Embrião</b>	<b>Nº Folhas</b>	<b>Tamanho das Folhas</b>	<b>Nº Raízes</b>	<b>Tamanho de Raízes</b>
<b>T0</b>	Não encapsulado	0,86a	4.37a	0,77a	2,11 <sup>a</sup>
<b>T1</b>	Encapsulado	0,46b	4.03a	0,63a	2,81 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo test T ( $\alpha=0.05$ ; g.l. = 23).

Na Tabela 3 podemos observar os valores das médias obtidas por tratamento para número e tamanho de folhas e raízes (cm), as folhas foram medidas em centímetros da base ao ápice. Podemos observar que o número de raízes e seu tamanho não diferem estatisticamente entre os tratamentos e são menores quando comparados com o número de folhas. Sharpe, 1984) demonstrou que o desenvolvimento de raízes em embriões zigóticos de *E. guineenses* foi mais rápido em plântulas quando o cultivo foi feito em meio de cultura contendo o carvão ativado e foi menor ou ausente em meios de cultura sem o carvão ativado. O carvão ativado age como adsorvente de substâncias oxidantes o que acaba elevando o índice de germinação de plântulas.

O resultado positivo no enraizamento de *B. capitata* deste trabalho deve-se provavelmente ao uso meio MS/2. Trabalhos relatados anteriormente mostraram que na presença de sacarose e concentrações de sais entre 50 e 75% da concentração original do meio MS proporcionam menor nível de oxidação (RIBEIRO, 2011).

Embora o tamanho das folhas e o tamanho das raízes não diferiram entre os tratamentos, as plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos encapsulados apresentam uma altura maior quando comparado com o controle (Figura 4). Isso provavelmente acontece

devido a matriz de alginato ser constituída de macro e micronutrientes essenciais que simula o e endosperma encontrado naturalmente.

FIGURA 4- Comparação da germinação do embrião zigótico não-encapsulado (seta), com o embrião zigótico encapsulado (sem seta).



Fonte: Arquivo pessoal

## 5 CONCLUSÃO

Concluiu-se com o presente trabalho que foi possível isolar e germinar embriões zigóticos maduros de *Butia capitata*, tanto os que foram encapsulados quanto os que não foram, quando não ocorreu o congelamento. Constatando que o encapsulamento não protegeu o embrião do congelamento, e as técnicas utilizadas para realizar a proteção do embrião não foram suficientes, sugerindo a necessidade de novos estudos para a criopreservação e avanços para a conservação *ex situ* da espécie.

## REFERÊNCIAS

AL-BAHRANY AM, AL-KHAYRI JM. **Optimizing in vitro cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)**. *Biotechnol* 11:59–66. 2012

BANDEIRA, Fabiana Schmidt et al. **Germinação in vitro de embriões zigóticos maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose**. *Revista Árvore*, v. 37, n. 4, p. 691-700, 2013.

BENSON, E. E.; LYNCH, P. T.; STACEY, G. N. **Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology**. *AgBiotech News and Information* (United Kingdom), 1998.

BERJAC, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.JM; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed). **Cryopreservation of tropical plant germoplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, v.2, n.3, p.140-155, 2000.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; **Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.44, n.2, p.211-215, fev. 2009.

CAMPOS, Nádia Alves et al. **Tipo de explante e constituição da cápsula na produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*)**. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2016.

DA CONCEIÇÃO NEVES, Silma et al. **Germinação in vitro de embriões de coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação**. *Revista de Biologia Neotropical/Journal of Neotropical Biology*, v. 7, n. 1, p. 47-54, 2010.

DA SILVA LÉDO, Ana et al. **Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

DANTAS, A. C.; STEFENON, V. M. **Tissue cultures in apples and their implications in genetic breeding:** In: STEFENON, V.M. (ed.) Micropropagation: methods and effects. Nova Science Publisher: New York. Pp. 97-158. 2019

DIAS, D. S. et al. **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. and LININGTON, I.M. **Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically importante plant family.** *Biodiversity and Conservation*, 1, 112-119. 1992

ENGELMANN, F. **In vitro conservation methods.** Biotechnology in agriculture series, p. 119-162, 1997.

ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.; OLIVER, J.(eds.); **Coconut embryo in vitro culture: Part II.** Malásia: International Plant Genetic Resources Institute, Regional office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), 190P. 2002

ERIG, ALAN & MÁRCIA WULFF, SCHUCH. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural.** *Ciência Rural*. 35. 10.1590/S0103-84782005000400039. 2005

FRUGERI, Giuliano Carvalho. **Caracterização de diásporos e conservação ex situ de populações de *Butia capitata* [Mart.(Becc.) Arecaceae].** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Tese/dissertação (ALICE), 2016.

GAGLIARDI, R. F. et al. **Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of in vitro-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants.** *CryoLetters*, v. 24, n. 2, p. 103-110, 2003.



GONZALEZ-ARNAO, Maria Teresa; ENGELMANN, Florent. **Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane.** *CryoLetters*, v. 27, n. 3, p. 155-168, 2006.

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

HONG, T.D. and ELLIS, R.H. **A Protocol to Determine Seed Storage Behaviour,** International Plant Genetic Resources Institute, Rome.1996

KHAWNIUM, T. et al. **Simple vitrification protocol for cryopreservation of oil palm using embryogenic culture.** *Journal of Agricultural Technology*, v. 7, n. 2, p. 519-529, 2011

LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; OZUDOGRU, E.A. **Synthetic seed technology in ornamental plants.** In Teixeira da Silva JA (ed), *Floriculture, ornamental and plant biotechnology.* Global Science books. UK. 2:347-354, 2006

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. **Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira.** *Lavras: Ciência e Agrotecnologia*, V.34, n.2, 2010.

LOPES, P. S. N.; AQUINO, C. F.; MAGALHÃES, H. M.; JÚNIOR, D. S. B. **Tratamento físico-químico para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari.** *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, jan./mar 2011.

LOPES DA SILVA et al. . **Applications of micropropagation in plant biotechnology.** 2019. In: STEFENON, V.M. (ed.) *Micropropagation: methods and effects.* Nova Science Publisher: New York. Pp. 2-24. 2019

MATSUMOTO, T. et al. **Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method.** *Cryo-letters (United Kingdom)*, 1995.

MERCADANTE-SIMÕES, MARIA OLÍVIA et al. **Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas**

**Gerais.** Unimontes Científica, v. 8, n. 2, p. 143-150, 2008.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEVES, S.C., RIBEIRO, L.M., SILVA, P.O. and Andrade, I.G. **Germinação *in vitro* de embriões de coquinho azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae) obtidos de frutos com diferentes graus de maturação.** *Revista Biológica Neotropical*, **7**, 47-54. 2010

OLIVEIRA, N. C. C., et al. *Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae).* *Trees*, **27**(6), 1633–1645. doi:10.1007/s00468-013-0910-0 2013

PEREIRA, J. et al. **Parâmetros para a produção e conversão de sementes sintéticas de orquídeas e avaliação de utilização na conservação *in vitro*.** *Ornamental Horticulture*, v. 13, p. 977-980, 2007.

REED, B.M. et al. **Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L.** *Biodiversity & Conservation*, v. 10, n. 6, p. 939-949, 2001.

RIBEIRO, L.M., NEVES, S.C., SILVA, P.O. and ANDRADE, I.G. **Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo** [Germination of zygotic embryos and *in vitro* development of *Butia capitata* (Mart.) Becc.]. *Revista Ceres*, Viçosa, **58**, 133-139. 2011

SANTOS, I. R. **Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **12**(70-84). 2000.

SAKAI, Akira; ENGELMANN, Florent. **Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review.** *CryoLetters*, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SHARPE, W. R. et al. **Handbook of plant cell culture. Volume 2. Crop species.** New York: Macmillan Publishing Co, 1984.

SISUNANDAR, S.; **Cryopreservation for Germplasm Conservation: Progress Report on Indonesian Elite Mutant Coconut “Kopyor”**. Proceeding International Conference on Global Resource Conservation. 2014.

SURANTHRAN P, GANTAIT S, SINNIAH UR, SUBRAMANIAM S, ALWEE SSRS, ROOWI SH. **Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids**. Plant Growth Regul 66:101–109, 2012.

TEIXEIRA, J. B. **Development of in vitro techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 1991.

