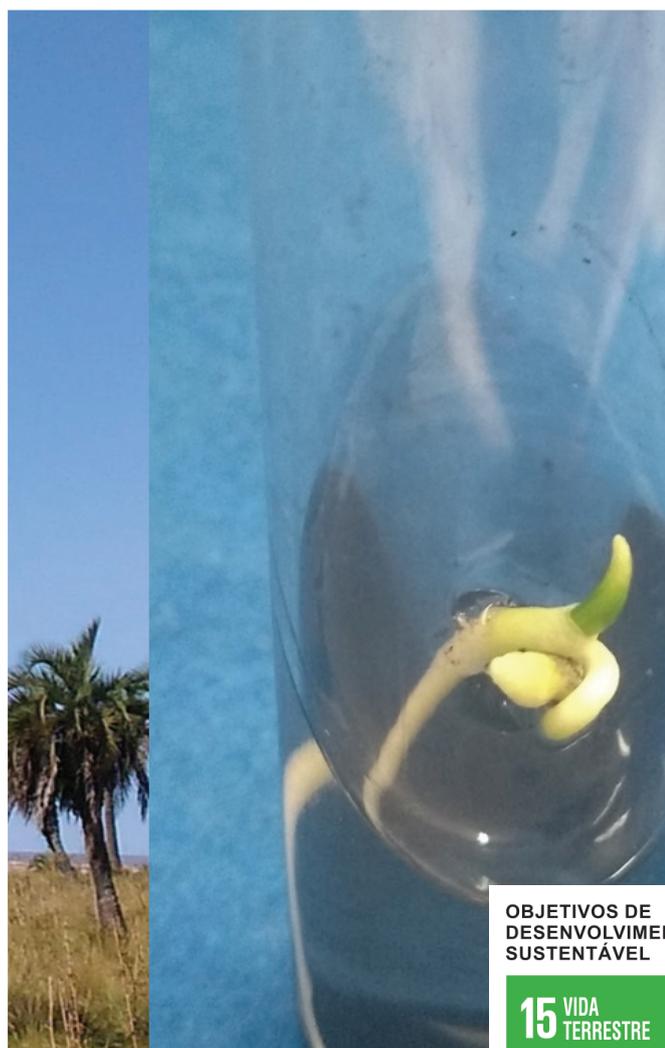


Estabelecimento In Vitro e Criopreservação de Espécies de  
*Butia* (Arecaceae) para Conservação Ex Situ de Germoplasma



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

15 VIDA  
TERRESTRE



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Clima Temperado  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
337**

Estabelecimento In Vitro e Criopreservação de Espécies de  
*Butia* (Arecaceae) para Conservação Ex Situ de Germoplasma

*Marisa Taniguchi  
Marcelo Piske Eslabão  
Tales Basílio da Silva  
Rosa Líia Barbieri  
Juliana Aparecida Fernando  
Leonardo Ferreira Dutra  
Gustavo Heiden*

***Embrapa Clima Temperado  
Pelotas, RS  
2020***

**Embrapa Clima Temperado**  
BR 392 km 78 - Caixa Postal 403  
CEP 96010-971, Pelotas, RS  
Fone: (53) 3275-8100  
www.embrapa.br/clima-temperado  
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações

Presidente  
*Luis Antônio Suíta de Castro*

Vice-Presidente  
*Walkyria Bueno Scivittaro*

Secretário-Executivo  
*Bárbara Chevallier Cosenza*

Membros  
*Ana Luiza B. Viegas, Fernando Jackson,  
Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto  
*Bárbara Chevallier Cosenza*

Normalização bibliográfica  
*Marilaine Schaun Pelufê*

Editoração eletrônica  
*Fernando Jackson*

Foto da capa  
*Marisa Taniguchi*

**1ª edição**  
Obra digitalizada (2020)

**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 Clima Temperado

---

E79 Estabelecimento in vitro e criopreservação de espécies  
de *Butia* (Arecaceae) para conservação ex situ de  
germoplasma / Marisa Taniguchi... [et al.]. – Pelotas:  
Embrapa Clima Temperado, 2020.  
16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /  
Embrapa Clima Temperado, ISSN 1678-2518 ; 337)

1. *Butiá*. 2. Propagação vegetativa. 3. Cultura in vitro.  
4. Criopreservação. I. Taniguchi, Marisa. II. Série.

CDD 634.4

## Sumário

---

Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados.....	9
Discussão.....	12
Conclusões.....	14
Agradecimentos.....	14
Referências.....	14



# Estabelecimento In Vitro e Criopreservação de Espécies de *Butia* (Arecaceae) para Conservação Ex Situ de Germoplasma

Marisa Taniguchi<sup>1</sup>

Marcelo Piske Eslabão<sup>2</sup>

Tales Basílio da Silva<sup>3</sup>

Rosa Lía Barbieri<sup>4</sup>

Juliana Aparecida Fernando<sup>5</sup>

Leonardo Ferreira Dutra<sup>6</sup>

Gustavo Heiden<sup>7</sup>

**Resumo** - Espécies do gênero *Butia* Becc. (Arecaceae) são conhecidas como butiás e utilizadas há séculos pelos habitantes da América do Sul, podendo ser encontradas no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai. Várias dessas espécies apresentam importância econômica e uso na agroindústria, no paisagismo e na produção de artesanatos. No entanto, a conservação de populações naturais e multiplicação dos butiazeiros apresentam limitações. A propagação é feita por sementes, as quais possuem dormência, germinação lenta, baixa e desuniforme, o que onera e limita a produção de mudas em escala comercial e dificulta a conservação ex situ de germoplasma. Assim, o emprego de técnicas de cultivo in vitro e criopreservação são ferramentas promissoras para a propagação e conservação em longo prazo. Nesse contexto, este trabalho objetivou estabelecer in vitro e criopreservar quatro espécies ocorrentes no Bioma Pampa: *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*. Foram realizados dois experimentos de cultivo in vitro e dois de criopreservação a partir de metodologias pré-estabelecidas. Os melhores percentuais obtidos de germinação de embriões de butiá sob cultivo in vitro nos dois experimentos foram de 100% para *B. lallemantii*, 92% para *B. paraguayensis* e 75% para *B. odorata* e *B. yatay*. No primeiro ensaio de criopreservação, foi obtida germinação de 30% dos embriões de *B. yatay* e 15% de *B. odorata*, enquanto os embriões de *B. paraguayensis* e *B. lallemantii* não germinaram após os 30 dias de criopreservação. No segundo experimento, havia material disponível apenas para duas espécies, sendo obtida germinação de 84% dos embriões de *B. odorata* e 72% de *B. paraguayensis* após os 30 dias de criopreservação. Conclui-se que as metodologias utilizadas para o estabelecimento in vitro e a criopreservação são promissoras para a conservação ex situ de espécies do gênero *Butia*. Futuros ensaios demandam mais conhecimento sobre a fisiologia de sementes e testes adicionais das metodologias de criopreservação para se aumentar a porcentagem de embriões germinados e aperfeiçoar essas técnicas.

**Termos para indexação:** butiazeiro; *Butia lallemantii*; *Butia odorata*; *Butia paraguayensis*; *Butia yatay*.

<sup>1</sup> Bióloga, mestre em Fisiologia Vegetal, doutoranda em Fisiologia Vegetal, Ufpel, Pelotas, RS.

<sup>2</sup> Biólogo, mestre em Agronomia, doutorando em Agronomia, Ufpel, Pelotas, RS..

<sup>3</sup> Graduando de Ciências Biológicas, Ufpel, Pelotas, RS.

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, RS.

<sup>5</sup> Bióloga, doutora em Biologia Vegetal, professora da Ufpel, Pelotas, RS.

<sup>6</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

<sup>7</sup> Biólogo, doutor em Botânica, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

## In Vitro Establishment and Cryopreservation of *Butia* (Arecaceae) Species for Ex Situ Conservation of Germplasm

**Abstract** - Species of the genus *Butia* Becc. (Arecaceae) are known as pindo palms and have been used for centuries by the inhabitants of South America. These species are found in Brazil, Paraguay, Argentina, and Uruguay. Several of them are economically important and used in the food industry, in landscaping and in the production of handicrafts. Despite its importance and usefulness, the conservation of natural populations and the multiplication of *Butia* palms have limitations. The propagation is made by seeds which present dormancy with slow, low and uneven germination, which limits the production of seedlings on a commercial scale and hinders the ex situ conservation of germplasm. Thus, the use of in vitro cultivation and cryopreservation techniques are promising tools for propagation and long-term conservation. In this context, this work aimed to establish in vitro and cryopreserve four species occurring in the Pampa Biome: *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis*, and *B. yatay*. Two in vitro cultivation experiments and two cryopreservation experiments were carried out, testing pre-established methodologies. The best results on embryos germination under in vitro cultivation in both experiments were 100% for *B. lallemantii*, 92% for *B. paraguayensis*, and 75% for *B. odorata* and *B. yatay*. In the first cryopreservation test, the germination of 30% of the embryos of *B. yatay* and 15% of *B. odorata* occurred, while the embryos of *B. paraguayensis* and *B. lallemantii* did not germinate after cryopreserved for 30 days. In the second experiment, only two species were available and germination of 84% of *B. odorata* embryos and 72% of *B. paraguayensis* were obtained after 30 days of cryopreservation. The methodologies used for in vitro establishment and cryopreservation show promising results for the ex situ conservation of species of the genus *Butia*. However, better knowledge about seed physiology and additional tests of cryopreservation methodologies are necessary to achieve higher percentage of germinated embryos and to further improve these techniques.

**Index terms:** Pindo palm, *Butia lallemantii*, *Butia odorata*, *Butia paraguayensis*; *Butia yatay*.

## Introdução

---

A família das palmeiras (Arecaceae ou Palmae) é uma das mais utilizadas pelos seres humanos (Büttow et al., 2009). Espécies do gênero *Butia* Becc., pertencentes a essa família e conhecidas como butiás, são utilizadas há séculos pelos povos do continente americano (Schneider et al., 2017). O gênero ocorre naturalmente na América do Sul, podendo ser encontrado no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Eslabão et al., 2016).

As espécies de *Butia* apresentam grande importância econômica e diversas possibilidades de uso, desde a produção de artesanatos, utilização no paisagismo (Lopes et al., 2011), bem como na agroindústria, devido aos atributos nutricionais e medicinais. A polpa possui altos teores de fibras alimentares, sendo uma opção de consumo importante para a saúde humana (Martins et al., 2019). Metabólitos secundários, como cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos, são encontrados nos frutos de butiá e possuem grande interesse, principalmente, sob o ponto de vista farmacológico (Matos et al., 2019).

Apesar da importância e utilidade, a conservação de populações naturais e multiplicação do butiazeiro têm limitações. A propagação é feita por sementes, as quais apresentam dormência, germinação lenta, baixa e desuniforme, o que onera e limita a produção de mudas em escala comercial (Meerow; Broschat, 1991; Fior et al., 2011; Lopes et al., 2011; Waldow et al., 2013). Diversas espécies do gênero são constantemente ameaçadas pelo extrativismo predatório, aliado às ações de desmatamento, queimadas, e agricultura intensiva. O manejo inadequado do campo associado à pecuária nos butiazais remanescentes prejudica a regeneração natural e a perpetuação nessas áreas (Rivas; Barbieri, 2014).

Trabalhos que utilizam ferramentas biotecnológicas para conservação agregam alternativas viáveis e elucidam novas possibilidades para preservação das espécies. Dentre essas ferramentas, a cultura de tecidos tem sido utilizada para a propagação de plantas nativas que são raras ou ameaçadas de extinção e se destaca como um método de conservação (Pêgo et al., 2013; Ree; Guerra, 2015). O cultivo in vitro é utilizado para conservação por curto prazo, sendo o resgate e a cultura in vitro de embriões zigóticos indicadas como técnicas viáveis (Oliveira et al., 2016). Porém, quando a intenção é a conservação em longo prazo, a criopreservação é o método que garante o armazenamento e conservação viável do germoplasma, por período ilimitado, em pequenos volumes. Esse método consiste em conservar o material biológico vivo, reduzindo o metabolismo celular, sem a perda da viabilidade, a temperaturas ultrabaixas (-196 °C), permanecendo protegido de contaminação e exigindo pouca manutenção (Engelmann, 2011; Kaczmarczyk et al., 2011; Pence, 2011).

Atualmente, das 21 espécies conhecidas do gênero *Butia* (Eslabão et al., 2016; Ellert-Pereira et al., 2020), 8 encontram-se na lista de espécies ameaçadas do estado do Rio Grande do Sul (FZB, 2020). No que concerne aos estudos sobre o potencial da conservação, em curto e longo prazo, diferentes autores testaram técnicas de cultura de tecidos com espécies de butiá, no entanto as informações são incipientes. São encontrados relatos de trabalhos com *B. capitata* (Mart.) Becc. (Ribeiro et al., 2011; Dias et al., 2015), *B. eriospatha* (Mart. ExDrude) Becc. (Minardi et al., 2011; Waldow et al., 2013; Salomão et al., 2017), *B. odorata* (Barb. Rodr.) Nobslick e *B. yatay* (Mart.) Becc. (Fior et al., 2013; Eslabão et al., 2016; Ferreira et al., 2017; Campos et al., 2020; Fior et al., 2020; Vargias et al., 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias para o estabelecimento in vitro e criopreservação de espécies de butiá é uma ferramenta importante para garantir a conservação ex situ do germoplasma de espécies do gênero, permitindo a multiplicação in vitro de acessos promissores para atividades atuais de conservação e uso sustentável e ações futuras de melhoramento genético. Tais resultados beneficiam em curto prazo, pesquisadores que se dedicam ao estudo do gênero e, em médio e longo prazo, um público mais amplo, como agricultores, empresários e consumidores dessas frutas.

O objetivo do presente trabalho foi testar metodologias para o estabelecimento in vitro e criopreservação de quatro espécies de *Butia* (*B. lallemantii* Deble & Marchiori, *B. odorata* (Barb. Rodr.) Nobslick, *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) Bailey e *B. yatay* (Mart.) Becc.) visando a conservação ex situ de germoplasma do gênero.

## Material e Métodos

---

### Material utilizado

Sementes foram coletadas em campo e armazenadas em câmara fria por 12 meses (primeira coleta) e por 3 meses (segunda coleta). Para cada uma das espécies amostradas para a obtenção das sementes, foi preparado um voucher para identificação taxonômica, cujo testemunho encontra-se depositado no Herbário da Embrapa Clima Temperado (ECT). As sementes de *B. lallemantii* foram coletadas em Alegrete-RS (*Taniguchi 4*, ECT0004114), *B. odorata* em Tapes-RS (*Eslabão 3*, ECT0002614), *B. paraguayensis* em Pontão-RS (*Taniguchi 1*, ECT0003967) e *B. yatay* em Giruá-RS (*Eslabão 4*, ECT0003436). A quantidade de sementes para cada ensaio foi limitada pela disponibilidade de frutas, no mesmo estágio de maturação, principalmente para as espécies *B. lallemantii* e *B. yatay*, que além de terem populações naturais reduzidas, sofrem dispersão pela fauna.

### Desinfestação das sementes e excisão de embriões

Os diásporos armazenados em câmara fria foram rompidos com auxílio de torno manual de bancada. As sementes foram removidas e desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2,5% de cloro ativo e duas gotas de Tween 20®, por 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram imersas em Tecsa-Clor® (Dióxido de Cloro) e Fegatex® (Cloreto de Benzalcônio/Cloreto de etilbenzalcônio) 1% (v/v) durante 5 minutos e submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Em seguida, os embriões zigóticos foram excisados e imediatamente encaminhados para os ensaios de cultivo in vitro ou criopreservação.

### Cultivo in vitro

**Experimento 1:** diásporos de *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*, armazenados em câmara fria por 3 meses, foram desinfestados e excisados. Os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura MS 75% (Murashige; Skoog, 1962), contendo sacarose (40 g L<sup>-1</sup>), carvão ativado (2 g L<sup>-1</sup>), PVP (1 g L<sup>-1</sup>), inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>) e suplementado com dosagens de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>). O meio de cultura foi solidificado com Phytigel (2,5 mgL<sup>-1</sup>) e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C, durante 20 minutos. O material foi cultivado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C com irradiância de fótons de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, cada repetição constituída por um tubo contendo um embrião. Aos 30 dias foi avaliada a germinação conforme a protrusão da radícula.

**Experimento 2:** diásporos de *B. odorata* e *B. lallemantii* armazenados em câmara fria por 3 meses foram desinfestados e excisados. Os embriões zigóticos excisados foram inoculados em MS 75% (Murashige; Skoog, 1962), complementado com sacarose (40 gL<sup>-1</sup>), carvão ativado (1,5 g L<sup>-1</sup>), PPM (1 ml L<sup>-1</sup>), PVP (1 g L<sup>-1</sup>), inositol (0,25 g L<sup>-1</sup>) e suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5, 2,0 mg L<sup>-1</sup>). O meio de cultura foi solidificado com ágar (6,5 g L<sup>-1</sup>) e o pH foi ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem a 120 °C, durante 20 minutos. O material foi cultivado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C com irradiância de fótons de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Foram utilizadas cinco repetições, cada repetição composta por três tubos de ensaio, contendo um embrião cada tubo. Aos 30 dias foi avaliada a germinação conforme a protrusão da radícula.

### Criopreservação

**Experimento 1** (baseado em Vargas et al., 2020): diásporos de *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*, armazenados em câmara fria por 12 meses, foram desinfestados e excisados. Em seguida, os embriões zigóticos foram pré-tratados (T2) ou não (T1, Controle), por imersão em solução crioprotetora de sacarose (0,4 M) durante 60 minutos. Depois de submetidos ao pré-tratamento, os embriões foram imer-

so em PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*), por 20 minutos a 0 °C e, posteriormente, imersos em nitrogênio líquido permanecendo por 5 dias a -196 °C. Para o recultivo, os embriões foram retirados do resfriamento, aquecidos a 37 °C por 2 minutos em banho-maria, lavados em solução de sacarose 1,2 M para remoção residual do PVS2, e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1,5 g L<sup>-1</sup>), PVP (1 g L<sup>-1</sup>) e solidificado com Phytigel (2,5 mg L<sup>-1</sup>). Posteriormente, as placas foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 27±2 °C. Aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, a partir de quatro repetições por tratamento, cada repetição constituída por uma placa contendo cinco embriões.

**Experimento 2** (adaptado de Salomão et al., 2017): diásporos de *B. odorata* e *B. paraguayensis* armazenados por 3 meses em câmara fria foram desinfestados e divididos em dois conjuntos (A: diásporos, B: sementes). O conjunto A continha 200 diásporos e foi dividido em 2 tratamentos (A1 e A2) de 100 diásporos cada um. No tratamento A1, os diásporos foram acondicionados em sacos plásticos aluminizados, vedados com parafilm, enquanto no tratamento A2 foram acondicionados apenas em saco plástico. Os tratamentos aplicados no conjunto A foram congelados rapidamente por imersão direta em nitrogênio líquido (-196 °C). O conjunto B, contendo 200 sementes, foi subdividido em 2 tratamentos (B1 e B2) de 100 sementes cada. No tratamento B1, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos aluminizados, vedados com parafilm® e congelados por imersão direta em nitrogênio líquido (-196 °C). No tratamento B2, as sementes foram submetidas a uma segunda assepsia em câmara de fluxo laminar. Concluída a assepsia, as sementes foram embebidas por 4 horas em água destilada autoclavada e os embriões foram resgatados e inoculados em cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1,5 g L<sup>-1</sup>), PVP (1 g L<sup>-1</sup>) e solidificado com ágar (6,5 g L<sup>-1</sup>). Aos 30 dias de criopreservação, as amostras A1, A2 e B1 foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas rapidamente por imersão em banho-maria a aproximadamente 38°C por 3 minutos e permaneceram em fluxo laminar em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, foram separadas de acordo com os tratamentos: A1) diásporos acondicionadas em sacos plásticos aluminizados, vedados com parafilm® e criopreservados; A2) diásporos acondicionados em sacos plásticos não-aluminizados e criopreservados; B1) sementes acondicionadas em sacos plásticos aluminizados, vedado com parafilm® e criopreservadas; B2) controle, com sementes não criopreservadas. Para os tratamentos A1 e A2, após criopreservação, os diásporos foram rompidos em torno manual, e as sementes foram removidas e desinfestadas conforme protocolo citado anteriormente. Após a assepsia das sementes dos três tratamentos (A1, A2 e B1), as sementes foram embebidas por 4 horas em água destilada autoclavada, e os embriões foram resgatados e inoculados em cultivo MS contendo sacarose (40 g L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1,5 g L<sup>-1</sup>), PPM (1 mL L<sup>-1</sup>), PVP (1 g L<sup>-1</sup>), 2,4-D (2,0 mg L<sup>-1</sup>), inositol (0,1 g L<sup>-1</sup>) e solidificado com ágar (6,5 g L<sup>-1</sup>). Os cultivos foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 27±2 °C. Aos 30 dias, a porcentagem de sobrevivência foi avaliada, a partir de 5 repetições constituídas por um frasco, contendo cinco sementes cada um. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (Ferreira, 2011), comparando as frequências pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%.

## Resultados

---

### Cultivo in vitro

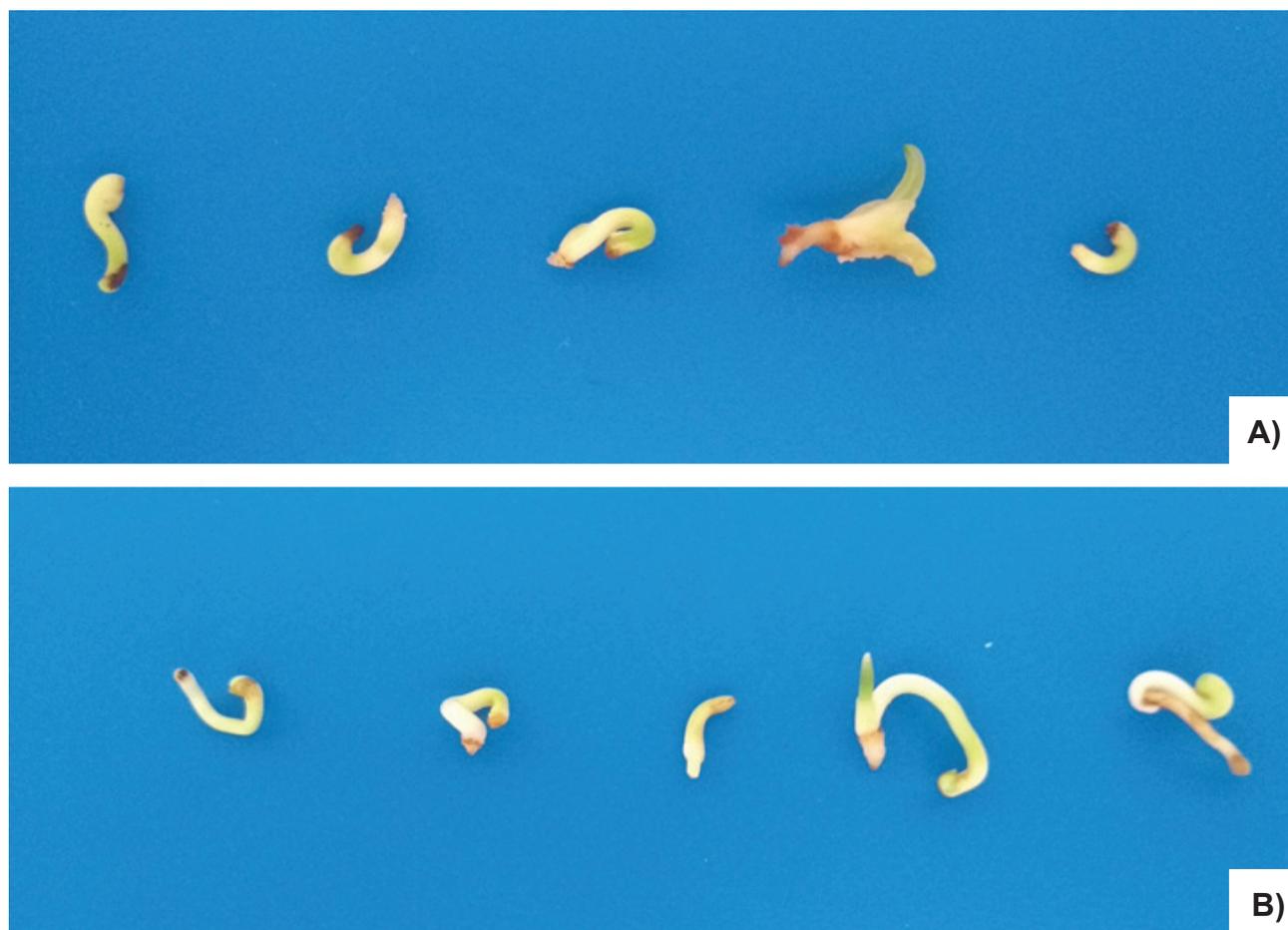
**Experimento 1:** foram obtidos percentuais de germinação in vitro de embriões de até 75% para *B. odorata* e *B. yatay* e 92% para *B. paraguayensis* (Tabela 1). Entre os 10 e 30 dias de cultivo in vitro foi observada a formação da radícula.

**Tabela 1.** Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de *Butia odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay* (Arecaceae), inoculados em meio de cultivo MS, após 30 dias de cultivo in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2020.

2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	<i>B. odorata</i>	<i>B. paraguayensis</i>	<i>B. yatay</i>
	Germinação (%)		
Controle	75 ns*	85 a	75 a
0,5	75	92 a	42 b
1,0	67	92 a	75 a
1,5	59	92 a	67 ab
2,0	59	17 b	59 ab
CV %	28,87	21,52	23,54
Pr>Fc	0,57	0,00	0,03

\*Médias seguidas com a mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. ns\*: não significativo. CV: coeficiente de variação. Pr>Fc: quando maior ou igual a 0,05 não significativo pelo teste F.

**Experimento 2:** os melhores percentuais de germinação in vitro de embriões de *B. odorata* (75%) e *B. lallemantii* (100%) foram obtidos nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, respectivamente (Figura 1 e Tabela 2). Aos 30 dias de cultivo in vitro foi observada a formação da radícula e parte aérea nos embriões germinados, porém sem diferença significativa entre os tratamentos.



**Figura 1.** Plântulas de *Butia odorata* (A) e *B. lallemantii* (B). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020. Foto Marisa Taniguchi.

**Tabela 2.** Porcentagem de germinação de embriões zigóticos de *Butia lallemantii* e *B. odorata* (Arecaceae), inoculados em meio de cultivo MS com diferentes concentrações de 2,4-D, após 30 dias de cultivo in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2020.

2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	<i>B. lallemantii</i>	<i>B. odorata</i>
	Germinação (%)	
0,0	40 b	47 ab
0,5	87 ab	27 b
1,0	70 ab	47 ab
1,5	100 a	54 ab
2,0	80 ab	74 a
CV (%)	36,27	44,19
Pr>Fc	0,02	0,03

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns<sup>\*</sup> não significativa. CV: coeficiente de variação. Pr>Fc: quando maior ou igual a 0,05 não significativo pelo teste F.

## Criopreservação

**Experimento 1:** foi obtida germinação de 30% dos embriões de *B. yatay* e 15% de *B. odorata*, enquanto os embriões de *B. paraguayensis* e *B. lallemantii* não germinaram após os 30 dias de criopreservação (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de germinação de embriões de *B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*, após criopreservação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019.

Tratamento	<i>B. lallemantii</i>	<i>B. odorata</i>	<i>B. paraguayensis</i>	<i>B. yatay</i>
	Germinação (%)			
Controle	0 ns <sup>*</sup>	0 b	0 ns <sup>*</sup>	0 b
Sacarose (4M)	0 ns <sup>*</sup>	15 a	0 ns <sup>*</sup>	30 a
CV%	0,00	94,28	0,00	54,43
Pr>Fc	0,00	0,00	0,00	0,00

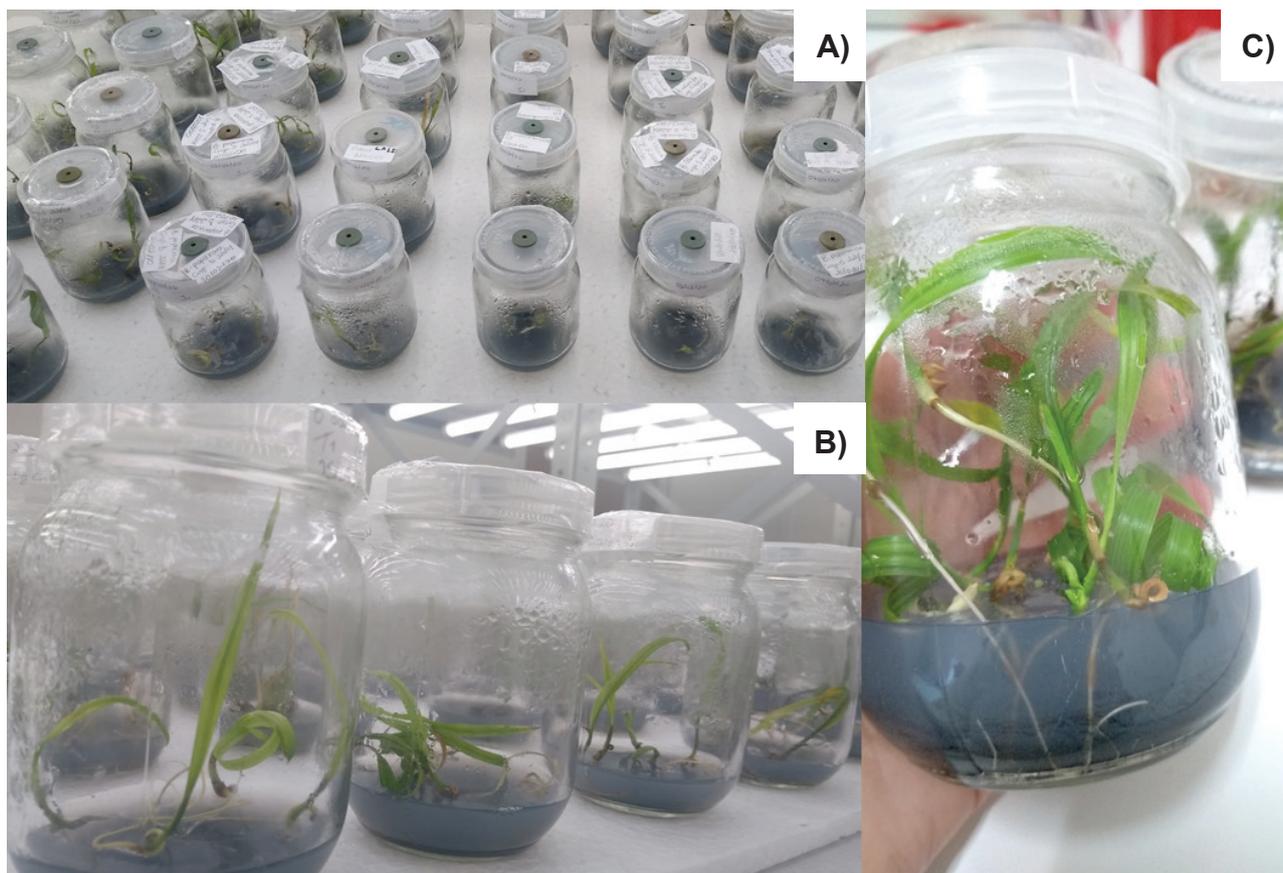
Médias seguidas com a mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. ns<sup>\*</sup> não significativa. CV: coeficiente de variação. Pr>Fc: quando maior ou igual a 0,05 não significativo pelo teste F.

**Experimento 2:** foi obtida germinação de 84% dos embriões de *B. odorata* e 72% de *B. paraguayensis* após os 30 dias de criopreservação (Figura 2 e Tabela 4).

**Tabela 4.** Porcentagem de germinação de sementes de *B. odorata* e *B. paraguayensis*, após criopreservação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2020.

Tratamento	<i>B. odorata</i>	<i>B. paraguayensis</i>
	Germinação (%)	
T1. Sementes Controle	88 a	92 a
T2. Sementes EN.NL	76 a	60 b
T3. Diásporo EN.NL	84 a	72 b
T4. Diásporo NL	0 b	0 c
CV%	13,49	13,83
Pr>Fc	0,00	0,00

Tratamentos: T1) controle com sementes não criopreservadas; T2) sementes ensacadas e criopreservadas em nitrogênio líquido; T3) diásporos ensacados e criopreservados em nitrogênio líquido; T4) diásporos não ensacados e criopreservados em nitrogênio líquido. (EN.NL – ensacadas e criopreservadas em nitrogênio líquido; NL – imersas em nitrogênio líquido). As médias seguidas com a mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. CV: coeficiente de variação. Pr>Fc: quando maior ou igual a 0,05 não significativo pelo teste F.



**Figura 2.** *Butia odorata* (A) e *B. paraguayenses* (B) germinados após teste de criopreservação e plantas de *B. odorata* derivadas do tratamento de criopreservação de diásporos (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020. Foto Marisa Taniguchi.

## Discussão

### Cultivo in vitro

Em função dos resultados obtidos, foi observado que o cultivo in vitro acelera os processos metabólicos que induzem a germinação, em comparação à germinação ex vitro. Fior et al. (2013), testando a germinação ex vitro de *B. odorata* com diferentes tratamentos, observaram a emergência de 72% dos embriões, quando realizada a escarificação das sementes. A variação resulta das respostas fisiológicas de cada espécie e deve-se ao fato de que cada embrião corresponde a um genótipo distinto, o que pode influenciar na viabilidade e variabilidade do processo de germinação. No entanto, essas variações não prejudicaram a obtenção de um protocolo que se apresenta com potencial uso na conservação dessas espécies a curto prazo, pois, além do alto índice de germinação, o período necessário para a mesma foi de 30 dias, superando os testes de germinação ex vitro, realizados por Fior et al. (2013). O cultivo in vitro também permite a formação de banco de germoplasma, a manutenção e multiplicação de genótipos em um espaço de armazenamento reduzido, distante de estresses bióticos e abióticos e independentemente das condições climáticas (Cid, 2010; Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2018), facilitando a troca de material e a utilização do mesmo para estudos futuros sobre a multiplicação e conservação.

Esses resultados são genótipo-dependentes; além disso, a concentração de hormônios e o estágio de maturação das sementes, associados ao processo de deterioração, podem ter se acentuado na temperatura de 5 °C da câmara fria. Leva-se em consideração efeitos negativos que podem ser provocados pelas baixas temperaturas, em sementes recalcitrantes e intermediárias, como a redução dos valores de germinação.

Verificou-se que, na germinação, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, para essas espécies do gênero *Butia*, indicando que não há necessidade de adição de fitorreguladores no meio de cultura. Outro fato que deve ser considerado é o uso de maior concentração de inositol ( $0,25 \text{ g L}^{-1}$ ), no meio de cultivo do experimento 2. O aumento da concentração de vitaminas pode estimular o crescimento e a morfologia dos propágulos (Villa et al., 2008), uma vez que o inositol pode influenciar como catalisador metabólico no crescimento de órgãos, por apresentar função de estimular o crescimento geral (George, 1993).

Hoffmann et al. (2014) descreveram que o longo processo germinativo de endocarpos de *B. eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. deve-se à resistência mecânica do endocarpo e à impermeabilidade à água e às trocas gasosas, fatores que contribuem para intensificar a dormência. Para *B. capitata*, foi observado que a sinalização da remoção do opérculo resultou em um catabolismo ABA mediado por  $\text{O}_2^-$  promovendo a germinação das sementes (Bicalho et al., 2019). Nesse sentido, ao se realizar o resgate dos embriões, elimina-se a dormência mecânica, acelerando o processo de germinação. Acredita-se que o resgate de embriões foi o fator contrastante, já que o rompimento das barreiras físicas durante esse processo facilita a germinação. As diferenças comuns na maturação de sementes e no armazenamento, mesmo que de dias entre o experimento 1 e 2, também podem ter interferido diretamente nas reservas energéticas e minerais do embrião, o que pode ter onerado o alongamento do pecíolo cotiledonar. Essas questões explicam as respostas dos embriões de *B. odorata* nos dois experimentos de cultivo in vitro.

## Criopreservação

Vargas et al. (2020) observaram alto índice de germinação de *B. yatay* após criopreservação. Porém, o mesmo protocolo de criopreservação (experimento 1) não protegeu os embriões, possivelmente ainda viáveis, dos danos da temperatura ultrabaixa. Quando as soluções crioprotetoras ou os protocolos de crioproteção são ineficazes, podem ocorrer danos aos tecidos, devido à cristalização de água intracelular, danificando as células (Santos, 2000; Araújo et al., 2019). O conteúdo de água das sementes é ponto importante para ser trabalhado no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação (González-Benito et al., 2009). Fior et al. (2020) abordam que sementes de palmeiras em geral não podem ser armazenadas por um longo período. Para o gênero *Butia*, ainda não há uma classificação precisa para todas as espécies, para fins de conservação, podendo haver comportamentos recalcitrantes, intermediários e ortodoxos, como descritos por Dias et al. (2015), que relataram o comportamento intermediário em sementes de *Butia capitata* (Mart.) Becc.; já Fior et al. (2020) classificam as sementes de *Butia odorata* como ortodoxas. Em geral, de acordo com a tolerância à dessecação, as sementes ortodoxas suportam a redução do teor de água (até 2-5%) sem que ocorram danos estruturais, e podem ser armazenadas por longos períodos (Hong; Ellis, 2002; Cunha et al., 2019). Enquanto isso, sementes recalcitrantes perdem a viabilidade quando a umidade é reduzida (15% a 50%), apresentando vida curta, o que dificulta o manejo/armazenamento (Medeiros; Eira, 2006; Lan et al., 2012; Cunha et al., 2019). Por sua vez, as sementes intermediárias toleram a perda de água entre 10% a 12%, porém não toleram o armazenamento e resfriamento por longos períodos (Ellis et al., 1990; Marques et al., 2018; Fior et al., 2019). Desse modo, os baixos resultados de germinação, após a criopreservação no experimento 1, podem também estar relacionados ao tempo de armazenamento do material (12 meses). Dentre as técnicas de conservação, a criopreservação mostrou-se a mais promissora para *Butia capitata* (Frugeri, 2016; Dias et al., 2015).

Metodologias de congelamento e descongelamento podem ser testadas para se adaptar às necessidades de cada espécie. Variações intra e interespecíficas quanto aos requerimentos básicos para a conservação ex situ são observadas no gênero *Butia* (Salomão et al., 2015), sendo que o sucesso das metodologias de criopreservação é dependente da tolerância à dessecação da semente e da capacidade de contornar a formação de gelo durante o resfriamento e o aquecimento. Assim, estabelecer o teor de água no material a ser criopreservado é considerado um ponto crítico do processo (Stegani et al., 2017). As espécies intermediárias e recalcitrantes necessitam de maiores porcentagens de umidade para a regeneração do eixo embrionário e são foco de estudos para armazenamento em longo prazo. Dessa forma, estudos adicionais precisam ser conduzidos para avaliação do teor de umidade mais adequado, em conjunto com o teste de crioprotetores intra e extracelulares, com vistas a promover uma alta porcentagem de recuperação dos embriões criopreservados.

O protocolo de criopreservação (experimento 2), baseado em Salomão et al. (2017), forneceu resultados satisfatórios. Esses autores criopreservaram diásporos de *B. eriospatha*, para evitar danos ao endosperma das sementes e a redução ou perda da viabilidade, e obtiveram regeneração de 100% dos embriões após a criopreservação. Dessa forma, futuros ensaios apontam para aperfeiçoamentos dessa segunda técnica, como ponto de partida para ajustes de protocolo de criopreservação de espécies de *Butia* mais eficientes.

A carência de informações básicas sobre o comportamento fisiológico das sementes das diferentes espécies de *Butia*, avaliadas neste estudo, representa um fator limitante no aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação, e estudos nesse sentido são encorajados.

Apesar das limitações proporcionadas pela dificuldade de obtenção de diásporos em quantidades suficientes, devido à baixa disponibilidade de frutos de algumas espécies, e em épocas semelhantes às demais, em decorrência da área de ocorrência e biologia de cada espécie, foi possível estabelecer a germinação e cultivo in vitro de embriões de quatro espécies (*B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*). Em relação aos protocolos de criopreservação testados, os resultados obtidos (entre 0 e 30% de germinação) com o protocolo proposto por Vargas et al. (2020) foram insatisfatórios para *B. lallemantii* (0%), *B. odorata* (15%), *B. paraguayensis* (0%) e *B. yatay* (30%), enquanto a metodologia proposta por Salomão et al. (2017) proporcionou uma porcentagem satisfatória de germinação dos embriões de *B. odorata* (84%) e *B. paraguayensis* (72%). Pesquisas futuras devem ser direcionadas a adaptações de métodos mais direcionados para cada espécie, visando a conservação ex situ de recursos genéticos de *Butia*.

## Conclusões

---

As metodologias testadas de estabelecimento in vitro, para as quatro espécies estudadas de *Butia*, são satisfatórias, apresentando boa porcentagem de germinação (*B. lallemantii*, *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay*). Já para a criopreservação, a metodologia de Vargas et al. (2020) não demonstra ser eficaz, mas esse resultado pode ter sido influenciado pelo tempo de armazenamento das sementes disponíveis. Portanto, a metodologia adaptada de Salomão et al. (2017) apresenta resultados promissores para duas espécies (*B. odorata* e *B. paraguayensis*, acima de 70%) e recomenda-se a adaptação dessa segunda metodologia em futuros ensaios de criopreservação de *B. lallemantii*, *B. yatay*, observando-se o tempo de armazenamento das amostras.

## Agradecimentos

---

À Capes, pelas bolsas de doutorado (MT e MPE); e ao *Neotropical Glasslands Conservancy* e ao CNPq (441493/2017-3), pelo suporte financeiro para execução da pesquisa.

## Referências

---

- ARAÚJO, D. S.; SOARES, F. S.; SOBRINHO, S. P.; LUZ, P.B. Crioprotetores na criopreservação de sementes de *Passiflora mucronata* Lam. *Iheringia, Série Botânica*, v. 74, p. 2446-8231, jun. 2019.
- BICALHO, E. M.; SANTOS, T. R. S.; GARCIA, Q. S. Abscisic acid and the antioxidant system are involved in germination of *Butia capitata* seeds. Short communication. *Acta Botanica Brasílica*, v. 33, n. 1, p. 174-178, jan./mar. 2019.
- BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G. Traditional knowledge associated with the use of butia palm (*Butia* spp., arecaceae) in the southern of Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 4, p. 1069-1075, dez. 2009.
- CAMPOS, S. S.; PEREIRA, J. E. S.; BERND, R. B.; FIOR, C. S.; SERGIO, F.; SCHWAZ, S. F. Embriogênese somática como alternativa para multiplicação in vitro de *Butia odorata* a partir de embriões zigóticos maduros. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 92, supl.1, 2020. Epub 27 de julho de 2020.
- CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303 p.
- CUNHA, M. C. L.; SOUZA, M. A. S.; MORAIS, R. M.; SANTANA, G. M. Teor de umidade e perda de viabilidade de sementes de *Cynophalla flexuosa*. *Advances in Forestry Science* v. 6, n. 2, p. 575-581, jun. 2019.
- 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, abr. 2015.

- ELLERT-PEREIRA, P. E.; ESLABÃO, M. P.; HEIDEN, G. **Butia in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15703>. Acesso em: 7 set. 2020.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, set. 1990.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, fev. 2011.
- ESLABÃO, M. P.; ELLERT-PEREIRA, P. E.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Mapeamento da distribuição geográfica de butiá como subsídio para a conservação de recursos genéticos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. 52 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 252).
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- FERREIRA, M. Z.; SARTO, M. T.; ESLABÃO, M. P.; HEIDEN, G.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F. **Germinação de embriões in vitro de Butia odorata (Arecaceae)**. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 26.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO UFPEL, 19.; SEMANA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 3., 2017, Pelotas. Anais... Pelotas: UFPEL, 2017.
- FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZ, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Revista Ciência Rural**, v. 41, p. 1150-1153, jul. 2011.
- FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Emergência de plântulas de *Butia odorata* (BARB. RODR.) Noblick em casa de vegetação. **Revista Árvore**, v. 37, n. 7, p. 503-510, dez. 2013.
- FIOR, S. C.; CAMPOS, S. S.; SCHWARZ, S. F. Tolerância à dessecação e armazenamento em temperatura sub-zero de sementes de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick. **Iheringia, Série Botânica**, v. 75, p. 2446-8231, maio 2020.
- FRUGERI, G. C. **Caracterização de endocarpos e conservação ex situ de populações de Butia capitata [Mart. (Becc.) [Arecaceae]**. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- FZB (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL). **Lista de espécies da flora ameaçada do Rio Grande do Sul. Consulta à lista final**. Disponível em: [https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id\\_modulo=2&id\\_uf=23&ano=2013](https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=2&id_uf=23&ano=2013). Acesso: 01 set. 2020.
- GEORGE, E. F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; ÁVILA, T. Germination and embryo rescue from Passiflora species seeds post-cryopreservation. **Cryoletters**, v. 30, n. 2, p. 142-147, fev. 2009.
- HOFFMANN, J. F.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *Butia* spp. (Arecaceae): an overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122-131, nov. 2014.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: VOZZO, J. A. (Ed.). **Tropical Tree Seed Manual**. Washington, DC: USDA Forest Service, 2002. p. 125-136.
- KACZMARCZYK, A.; TURNER, S. R.; BUNN, E.; MANCERA, R. L.; DIXON, K.W. Cryopreservation of threatened native Australian species: what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 17-25, dez. 2011.
- LAN, Q. Y.; LUO, Y. L.; MA, S. M.; LU, X.; YANG, M. Z.; TAN, Y. H.; WANG, X. F.; LI, Z. Y. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2012.
- LOPES, P. S. N.; AQUINO, C. F.; MAGALHÃES, H. M.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Pesquisa e Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 1, p. 120-125, jan./mar. 2011.
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. An Introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (Ed.). **Plant cell culture protocols: methods in molecular biology**, v. 1815, p. 3-13, jul. 2018.
- MARQUES, A.; BUIJS, G.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 11, p.1083-1095, jun. 2018.
- MARTINS, J. S.; MELO, E. M.; FALLAVENA, L. P.; HERTZ, P. F. Avaliação nutricional de *Butiá (Butia yatay)* processado. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. 1-7, 2019.
- MATOS, M. T.; MULLER, N. T. G.; MACHADO, D.; VETTORATO, J. G.; AMARAL, J. G. Characterization of foliar secondary metabolites in *Butia yatay* (Mart.). **Revista Tecnológica**, v. 28, n. 1, p. 31-38, nov. 2019.
- MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 127).
- MEEROW, A. W.; BROCHAT, T. K. **Palm seed germination**. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1991.
- MINARDI, B. D.; VOYTENA, A. P. L.; RANDI, A. M.; ZAFFARI, G. R. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. **INSULA Revista de Botânica**, v. 40, p. 70-81, maio 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, jul. 1962.
- OLIVEIRA, R. A. D.; NEVES, S. 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, nov. 2016.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.
- PENCE, V. C. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 176-187, fev. 2011.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** v. 51, p. 589-602, out. 2015.

RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. D. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, v. 58, n. 2, p. 133-139, mar./abr. 2011.

RIVAS, M.; BARBIERI, R. L. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do butiá**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 59 p.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; WALTER, B. M. T. Coleta e conservação de recursos genéticos ex situ: sementes de espécies. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; SILVA, A. da (Ed.). **Sementes florestais: da ecologia à produção**. Londrina: Abrates, 2015. p. 167-178.

SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I.; BARRIOS, S. C. B.; MUNDIM, R. C. **Avaliação de metodologias para a conservação de germoplasma de *Butia eriospatha* (Mart. ex. Drude) Becc. - Arecaceae**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 24 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 324).

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

SCHNEIDER, F.; KREUTZ, M. R.; MACHADO, N. G.; WOLF, S. Investigações arqueológicas no Vale Do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil. **Clio Arqueológica**, v. 32, n. 2, p. 139-186, dez. 2017.

STEGANI, V.; ALVES, G. A. C.; BERTONCELLI, D. J.; FARIA, R. T. Preservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 15-21, nov. 2017.

VARGAS, D. O.; FERREIRA, L. V.; SARTO, M.T.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F. Short Communication. Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção. **Rodriguésia** v. 71, p. 2175-7860, out. 2020.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; ZÁRRAGA, D. Z. A. Effect of glycine and inositol concentrations on two in vitro cultivated temperate fruit trees. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1637-1642, set./out. 2008.

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, set./out. 2013.

**Embrapa**

---

***Clima Temperado***

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL