

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL



**PROTOCOLOS PARA CONSERVAÇÃO EX SITU DE RECURSOS
GENÉTICOS DE *BUTIA* (ARECACEAE) E *SOLANUM* (SOLANACEAE)**

Marisa Taniguchi

ABRIL/ RS
2022

Marisa Taniguchi

**PROTOCOLOS PARA CONSERVAÇÃO EX SITU DE RECURSOS
GENÉTICOS DE *BUTIA (ARECACEAE)* E *SOLANUM (SOLANACEAE)***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Fisiologia
Vegetal da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em
Fisiologia Vegetal.

Marisa Taniguchi

Mestre em Fisiologia Vegetal/UFLA

Orientador

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Coorientadores

Dra. Juliana Aparecida Fernando

Dr. Gustavo Heiden

ABRIL/RS

2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T161p Taniguchi, Marisa

Protocolos para conservação *ex situ* de recursos genéticos de *Butia* (Arecaceae) e *Solanum* (Solanaceae) / Marisa Taniguchi ; Leonardo Ferreira Dutra, orientador ; Gustavo Heiden, Juliana Aparecida Fernando, coorientadores. — Pelotas, 2022.

201 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Criopreservação. 2. Recursos genéticos. 3. Extinção. 4. Pampa. I. Dutra, Leonardo Ferreira, orient. II. Heiden, Gustavo, coorient. III. Fernando, Juliana Aparecida, coorient. IV. Título.

CDD : 574.5265098165

BIOGRAFIA

Marisa Taniguchi, filha de Georgina Aparecida de Santana e Tokushi Taniguchi (*in memoriam*), nasceu em 23 de julho de 1984, em Lavras-MG. Iniciou o ensino fundamental na Escola Estadual Cristiano de Souza, estudou no Centro para Desenvolvimento do Potencial e Talento (CEDET), concluiu o ensino fundamental na Escola Municipal Paulo Menicucci. Coursou o ensino médio na escola estadual João Batista Hermeto, finalizando em 2002. De 1999 a 2010, trabalhou no comércio, com diferentes funções: Serviços gerais, atendente, vendedora externa, balconista, secretária, recepcionista, auxiliar de escritório e artesã. Em março de 2010, ingressou no curso de Ciências Biológicas-Licenciatura à distância, no Centro Universitário do Sul de Minas, concluindo o curso em fevereiro 2013. Entre julho de 2012 a janeiro de 2013 foi estagiária em laboratório químico de controle de qualidade na área de pesquisa e desenvolvimento, com foco no rerrefino de óleo lubrificante usado, sendo contratada como Analista de Pesquisa e desenvolvimento em janeiro de 2013, até o final de julho do mesmo ano, pela empresa PROLUMINAS, Varginha - MG. Em agosto de 2013, ingressou no Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras-MG, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação de espécies ornamentais e nativas do Cerrado, sob a orientação da Prof^a. Dra Patrícia Duarte de Oliveira Paiva se tornando mestra em Agronomia e Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras (UFLA- MG) (2015). Em 2016, foi voluntária auxiliando na área de enriquecimento ambiental e bem-estar animal (Parque Zoobotânico Dr. Mário Frota- MG) e trabalhou como professora de Ciências, Biologia e Química, também participou de projetos de extensão com educação ambiental (Secretaria de Educação do Estado de MG), foi professora contratada para Educação de Jovens e Adultos na Unidade Prisional de Varginha-MG. Entre 2020 e 2021. Se tornou professora e pesquisadora convidada na Fazenda Terra Booma, participando de projetos relacionados a conservação do cerrado e produção de alimentos orgânicos, ministrando aulas, palestras e treinamentos. Como doutoranda em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL/RS), atuou na área de Fisiologia Vegetal, desenvolveu trabalhos e coorientou alunos da graduação em Biologia e Agronomia, nos seguintes temas: conservação ex vitro, técnicas de cultura de tecidos e estresse ambiental, com espécies nativas e silvestres de potencial alimentar, medicinal e ornamental. Participa como pesquisadora convidada, para inserção do projeto Prospecta: Biofábrica da Amazônia, no mercado da bioeconomia de Manaus, com produção de mudas sustentáveis e conservação da biodiversidade da Amazônia. Se mantém atuante como pesquisadora parceira em ações para conservação de sementes crioulas, espécies nativas e produção sustentável, colaborando como voluntária, em equipes de pesquisa no Cerrado e na Amazônia.

A todos aqueles que usam seu conhecimento para incentivar sonhos, que lutam por justiça social e que dedicam o seu melhor, na árdua tarefa de ludibriar a opressão do sistema, promovendo a formação profissional, crítica e humana.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a essa força, que nomeio de Deus, que me possibilita encontrar seres humanos maravilhosos, que se tornam apoio e família, por onde passo.

A Universidade Federal de Pelotas, ao Instituto de Biologia, ao departamento de Botânica e ao setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida de aprendizado.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e a CNPq pelos projetos nos quais tive inserida.

A Embrapa Clima Temperado, por conceder a estrutura, para pesquisa, em especial, agradeço as profissionais, Fernanda Quintanilha Azevedo; Ana Cláudia Barneche de Oliveira, Natércia Lobato Pinheiro Lima e Caroline Marques Castro, obrigada.

Ao NGC (Neotropical Grassland Conservancy), pela concessão da bolsa de campo, para jovens pesquisadores, que contribuiu muito para minha pesquisa e coletas de campo.

Ao meu orientador Leonardo Ferreira Dutra, por toda a sua confiança, respeito e consideração, por me inspirar com seu coração e olhar humano, grande foi a sorte que tive, de ter sido sua orientada, pela liberdade que me foi concedida de desenvolver minhas aptidões como pesquisadora e pelo apoio dado.

A coorientadora Juliana Aparecida Fernando, que além de me incentivar para não desistir diante de tantos obstáculos, me apoiou a obter conhecimento e crescer sempre, obrigada pelo incentivo durante todo esse tempo, por não desistir dos nossos trabalhos e vamos seguir sempre, na parceria e amizade.

Ao coorientador Gustavo Heiden, por ser mais que coorientador, por ser referência de profissional, por me receber como parte da equipe e me dar as oportunidades de aprendizado, pelos momentos em que me mostrou que podia fazer melhor.

Ao professor Prof. Dr. João R.V. Iganci, obrigada pelas falas de apoio, pelas palavras de carinho sempre com um café, foi inspiração com a sua dedicação

nos trabalhos e na força para defender suas ideias e sonhos e torná-las reais, não tenho palavras para agradecer ter uma ilustração sua no meu trabalho.

Ao Dr. Keller Soares por sua contribuição com material de pesquisa e apoio aos meus trabalhos, tamanha é a minha alegria de ter meu trabalho apoiado por profissionais como você.

A Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, Laboratório de Anatomia Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP e ao Dr. Edison Zeffa, Laboratório de Zoologia de Invertebrados da Universidade Federal de Pelotas, UFPel, por disponibilizarem as dependências dos laboratórios para a captura das imagens.

A Alexandra Elbakyan por proporcionar o acesso ao conhecimento, em tempos que o recurso financeiro é tão escasso.

Aos alunos da pós-graduação de Fisiologia Vegetal em especial: Francine, Àdrya, Bruna, Yutcélia, Douglas, Roberta, Kézia, Sheila, Gabriel, Gabriela, Stefhania, Fabiane, Eduardo e Darwin, por todos os bons momentos compartilhados.

Aos professores da pós-graduação de Fisiologia Vegetal por todos os ensinamentos em especial Luciano do Amarante, Gustavo Maia Souza, Valmor João Bianchi, Eugenia Jacira Bolacel Braga e Sidnei Deuner.

As amigas do instituto de Botânica, Professora Carol, Professora Rita, Cristina, e Carina, por todo carinho e acolhimento, sinto saudades sempre.

A minha estimada amiga Thaize Debatin Wehrmeister, que é uma dadiva na minha vida, por ter sido apoio nos meus momentos mais difíceis em Pelotas, por se mostrar uma alma linda e generosa, fazendo dos meus dias muito mais bonitos, você faz parte dessa vitória.

Aos amigos do LCT Athos, Aline, Mônica, Guilherme, Matheus, Letícia, Laura, Cinthia, Nino, Andrio, Juliana e Marcos, cada um de vocês fizeram dos meus dias mais leves, alegres e bonitos, terão sempre um lugar especial no meu coração.

Ao casal Thaís e Júlio que se tornaram amigos tão queridos, que mesmo distantes fisicamente, seguem aqui no meu coração.

Ao Tales Silva Basilico, meu primeiro coorientado, esteve presente comigo em todos os momentos, parte desse caminho, só foi percorrido com sua ajuda, sem você com certeza minha jornada não teria sido tão feliz.

A Ingrid Lessa, amiga, agradeço por essa amizade que traz conforto e carinho.
A Gabriela Rosa, minha amiga querida, que transmite sempre essa energia linda e essa luz, obrigada por sempre me amar e me apoiar.

Aos amigos do Laboratório de recursos genéticos da Embrapa: Rodrigo Nicolão, Paulo, Guilherme, Marcelo Slabão, Matheus, Athur, Ikham, Fernando e Gabriela obrigada por toda a torcida.

A Débora Bärwaldt Dutra, que desde o início do doutorado foi amiga e apoio em Pelotas.

A Daiane R Vall, que fez sua amizade sempre presente, obrigada por esse sorriso fraterno que iluminou até meus dias mais nublados, te considero uma irmã querida.

As minhas eternas meninas, que se fizeram presentes em todos os momentos Ana Paula Jarosesk e Camila Dallman, só posso agradecer por compartilharem tanto comigo, por me ensinarem tanto na convivência, por serem família, amo vocês.

Aos amigos que me acompanham sempre em pensamento, aqueles que posso ficar anos sem conversar, mas a amizade vai ser a mesma sempre: Patrícia Olímpio, Debora Domiciano, Rafaela e Rafael Oliveira, Ana Cristina, Daniella, Camila Faria, Drucylla Mattos, por todo o apoio e amizade fraterna.

A Cibele Mercherd Gallo, Guiga, Vó Maria, Lucia, João, Fernanda; família Mercherd, vocês são parte da minha vida, para sempre obrigada por tudo.

Ao Maicon Schneider, que surgiu na minha vida com um sol, trazendo brilho, por deixar minha vida mais colorida e preencher ela com amor, por ser o meu cantinho de acolhimento e força, principalmente em momentos como o início da pandemia, te amo.

A minha querida estimada Ruth Guzman, que me apresentou um mundo de boas intenções e bondade, obrigada por me tornar uma pessoa melhor.

A minha irmã Renata Fonseca Mesquita, que me acompanha em todos os meus momentos, não tenho palavras para descrever o quanto é importante na minha vida, serei sempre grata por essa amizade, te amo.

Ao meu querido Ender, que fez dos meus dias mais alegres e me fez tão bem, mesmo em momentos sombrios, como da pandemia, obrigada por me instigar a procurar novos horizontes.

Ao meu estimado amigo Edenilson Santos, obrigada por me aturar, por não me deixar desistir de ser a pesquisadora que tanto sonhei e ver em mim, mais do que vi nos momentos finais do doutorado.

A família Leis, Ribamar, Lucas, Diego, Izabel e Maria Helena, como fui feliz ao encontrar vocês, Deus coloca boas pessoas no meu caminho, para que sejam família, quando estou longe da minha.

A família Booma, que me acolheu tão bem Rafael, Ian, Raphaeli, Leonice, Alda, João, Dione, Juranilson, Altair, Thel, Junior, Carol, Geovana, Alexandre, Stefany, Nira, Acauã, Daniel, Laura, Thayna, em especial ao Cem Mufase, não tenho palavras para agradecer a confiança que tem em mim.

Aos voluntários e aprendizes Booma, em especial: Mei, Rafaela, Barbara, Laura, Lara, Yulhy, Regina, Bianca, Cauê, Carol, Valer; Xoth, Thyara, Carlos, Renata, Yan, Fernanda, André, Bruno, Rafael, Ryan, Nayara, Amanda, Flora, Thiago e ao meu querido amigo- irmão Tom (*in memoria*), vocês são, um dos motivos da minha persistência em continuar na pesquisa, além de serem carinho e aprendizado em forma de convivência e amor.

Ao meu irmão de coração Celismar de Oliveira, por estar sempre pronto a me escutar, acolher e apoiar, obrigada por fazer parte da minha vida irmão.

Aos funcionários da Unidade prisional de Varginha, cada um de vocês fez parte da minha construção profissional e humana, Francisca, Iracélia, Abi, Katia, Célia, Luciene, Orfeu, Francisca, James, Célia, Katia, vocês são exemplos de humanidade, que jamais esquecerei.

As famílias Azevedo, Pinheiro e Pereira, que sempre foram apoio para meu filho e minha mãe, na minha ausência.

A Neide dos Santos Oliveira, minha apoiadora incondicional, que sempre se preocupou comigo e se fez mãe de coração, obrigada por todas as palavras de incentivo.

A minha madrinha Carmem, padrinho Expedito e família que sempre me apoiaram, com muito amor.

A todos os meus familiares, que estão sempre na torcida por minhas vitórias, em especial aos meus tios e tias que permaneceram sempre mandando boas energias, que fizeram presentes em oração desde o início de tudo.

Aos meus irmãos, Clélia, Cleber, Marcelo e Marcos, pelo apoio de sempre nas minhas lutas.

As minhas cunhadas, Vanessa Assis, Jéssica e Juliana, que na minha ausência se fizeram presentes na vida da minha mãe, de coração obrigada.

Ao meu querido filho, Eduardo Taniguchi Correa, por sua compreensão perante a minha ausência no seu dia a dia, nos últimos 12 anos, por ser você do jeitinho que é meu amor, sendo sempre o meu maior motivo para levantar todas as manhãs e seguir em frente.

A minha mãe, Georgina Aparecida Santana, a real merecedora dessa vitória, me perdoe por todas as ausências, obrigada por seu amor incondicional, esse título é seu.

A Flávia Domingues Pereira, minha psicóloga e amiga, sem a sua ajuda e generosidade, esse momento não seria possível, você além de contribuir para minha saúde mental, salvou a minha esperança.

Por fim, mas não menos importante a Marisa Taniguchi, obrigada por não desistir, você fez mais do que acreditou ser possível, superou a si mesma e conseguiu chegar no dia de hoje. Indiferente de tudo, ao olhar para traz, tenha certeza de que fez o melhor que pode, com as possibilidades que tinha em cada situação, durante todos os dias da sua vida, continue a sonhar.

A todos aqueles que não foram citados, mas que participaram da minha vida em algum momento, o meu muito obrigada, sou um mosaico que leva um pedacinho de cada um de vocês e por estarem no meu caminho, agradeço imensamente.

Essa tese é de vocês também!

“Temos que ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Pois, o impossível custa um pouco mais, e derrotados são apenas aqueles que abaixam os braços e se entregam. A vida não é fácil para nenhum de nós. Cada indivíduo tem seu próprio caos para lidar, mas dizem que é de dentro do caos, que nascem as estrelas mais brilhantes”.

(MARIE CURIE; JOSE MUJICA)



(Arte: Prof. Dr. João R.V. Iganci)

Resumo

TANIGUCHI, Marisa. PROTOCOLOS PARA CONSERVAÇÃO EX SITU DE RECURSOS GENÉTICOS DE *BUTIA* (ARECACEAE) E *SOLANUM* (SOLANACEAE). 2022. 201 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Buscar alternativas que conservem os recursos genéticos nativos e silvestres da biodiversidade brasileira é extremamente necessário, pela manutenção da diversidade vegetal e para garantir o futuro da base alimentar humana. Dessa forma, o presente estudo visa adaptar protocolos de conservação ex situ que podem atender a conservação em longo prazo de espécies do gênero *Butia* e espécies de batata silvestre. Para espécies de *Butia* foram realizados o cultivo in vitro, a organogênese e metodologias de criopreservação. Para o gênero *Butia* obteve-se êxito no cultivo in vitro das três espécies analisadas, utilizando 4,5 μ M de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenóxiacético), alcançando 90% de germinação em *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick, 80% para *Butia lallemantii* (Deble & Marchiori) e *Butia exilata* Deble & Marchiori. Para organogênese o tratamento com 35,60 μ M de silício, promoveu o desenvolvimento de parte aérea sendo 96% para *B. odorata*, 88% para *B. lallemantii* e 75% para *B. exilata*. Na criopreservação os melhores resultados foram obtidos com a adaptação da droplet vitrificação, com 80% de germinação dos embriões criopreservados de *B. odorata*, 65 % para *B. lallemantii* e 75% para *B. exilata*. O presente trabalho permitiu a criopreservação das três espécies do gênero *Butia*, podendo assim disponibilizar esse material genético em criobancos, ressaltando que esses resultados são inéditos para as espécies para *B. lallemantii* e *B. exilata*. Para as espécies de batata silvestre realizou-se a micropropagação, a produção de unidades encapsuláveis e a germinação de sementes botânicas e a criopreservação, utilizando a metodologia de congelamento rápido, tanto para material vegetal estabelecido in vitro, como para sementes botânicas. Na micropropagação não houve diferenças significativas para a concentração de sais do meio de cultivo e sem necessidade da utilização de reguladores de crescimento, para indução de brotações ou enraizamento, obtendo-se mais de 90% de aclimatização para as plântulas de, *S. chacoense*, *S. malmeanum* e *S. calvencens*. Para a composição da matriz de encapsulamento, o melhor resultado foi com 50% de sais do meio de cultivo em que houve 96% de germinação das cápsulas de *S. chacoense*. Na criopreservação ocorreram 82% de regeneração de gemas de *S. chacoense*, 72% para *S. malmeanum* na metodologia de encapsulamento, saturação e vitrificação, enquanto para *S. calvencens* houve 96% de regeneração das gemas no encapsulamento e vitrificação. Para a germinação das sementes botânicas, indica-se o tratamento T2 (imersão em solução contendo 250 μ M de GA₃), em que 92% de germinação ocorreu em *S. malmeanum*, 40% para *S. commersonii* e *S. tuberosum* 72%. Na criopreservação de sementes botânicas com imersão em PVS2 por 30 minutos, atingiu-se 68% em *S. malmeanum*, 28% *S. commersonii* e 65% *S. tuberosum* de germinação.

Palavras-chave: Criopreservação; Extinção; Pampa; Recursos Genéticos.

Abstract

TANIGUCHI, Marisa. PROTOCOLS FOR EX SITU CONSERVATION OF *BUTIA* (ARECACEAE) AND *SOLANUM* (SOLANACEAE) GENETIC RESOURCES. 2022. 201f. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Postgraduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Searching for alternatives that conserve the native and wild genetic resources of Brazilian biodiversity is extremely necessary, for the maintenance of plant diversity, and to guarantee the future of the human food base. Thus, the present study aims to adapt ex situ conservation protocols that can meet the long-term conservation of species of the *Butia* genus and wild potato species. For *Butia* species, in vitro cultivation, organogenesis and cryopreservation methodologies were carried out. For the genus *Butia*, success was achieved in the in vitro cultivation of the three analyzed species, using 4.5 μM of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), reaching 90% germination in *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick, 80% for *Butia lallemantii* (Deble & Marchiori) and *Butia exilata* Deble & Marchiori. For organogenesis, the treatment with 35.60 μM of silicon promoted the development of part area, being 96% for *B. odorata*, 88% for *B. lallemantii* and 75% for *B. exilata*. In cryopreservation, the best results were obtained with the adaptation of droplet vitrification, with 80% germination of cryopreserved embryos of *B. odorata*, 65% for *B. lallemantii* and 75% for *B. exilata*. The present work allowed the cryopreservation of the three species of the genus *Butia*, thus making this genetic material available in cryobanks, emphasizing that these results are unprecedented for the species for *B. lallemantii* and *B. exilata*. For wild potato species, micropropagation, production of encapsulable units and germination of botanical seeds and cryopreservation were carried out, using the rapid freezing methodology, both for plant material established in vitro and for botanical seeds. In micropropagation there were no significant differences for the concentration of salts in the culture medium and without the need to use growth regulators to induce shoots or rooting, obtaining more than 90% of acclimatization for the seedlings of *S. chacoense*, *S. malmeanum* and *S. calvencens*. For the composition of the encapsulation matrix, the best result was with 50% of salts from the culture medium in which there was 96% germination of *S. chacoense* capsules. In cryopreservation, 82% of *S. chacoense* bud regeneration occurred, 72% for *S. malmeanum* in the encapsulation, saturation and vitrification methodology, while for *S. calvencens* there was 96% of bud regeneration in encapsulation and vitrification. botanical seeds, treatment T2 (immersion in a solution containing 250 μM of GA3) is indicated, in which 92% germination occurred in *S. malmeanum*, 40% for *S. commersonii* and 72% for *S. tuberosum*. In the cryopreservation of botanical seeds with immersion in PVS2 for 30 minutes, 68% germination was reached in *S. malmeanum*, 28% *S. commersonii* and 65% *S. tuberosum*.

Keywords: Cryopreservation, Extinction, Pampa, Genetic Resources.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ANA	Ácido naftaleno-acético
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
BAP	6-benzilaminopurina
ES	Embrião somático
ESM	Embriogênese somática
GA3	Ácido giberélico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LS	Loading solution - Solução de carregamento
MS	Meio de cultivo MS de Murashige; Skoog (1962)
MES	Meio de embriogênese somática
NAA	Ácido 1-naftalenoacético
NL	Nitrogênio Líquido
PVS2	Solução de Vitrificação de Plantas número 2
PVS3	Solução de Vitrificação de Plantas número 3
RS	Recovery solution -Solução de descarregamento
TCL	Camada finas de células
NAA	Ácido 1-naftalenoacético
2,4- D	O ácido diclorofenóxiacético
μM	Micro molar
UN	Unidades Encapsuláveis

Lista de apêndices

Apêndices A - Artigos de participação como coautora

A.1 FERREIRA, LETÍCIA VANNI; VARGAS, DAIANE PEIXOTO; FORMOSO, RAFAELA SILVA; TANIGUCHI, MARISA; FERREIRA, LIANA VIVIAM; CORADIN, JULIANA HEY; DUTRA, LEONARDO FERREIRA. **Composição da matriz de encapsulamento de gemas axilares de morangueiro ‘San andreas’: *in vitro* e sobrevivência *ex vitro***. Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 101851-101859, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/22123/17668>>

A.2 VARGAS, D. P.; FERREIRA, L. V.; TANIGUCHI, M.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F. **Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção**. Rodriguesia, v. 71, p. 0370-6583, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2175-7860202071093>>.

A.3 FERREIRA, LETICIA VANNI; TANIGUCHI, MARISA; BARRETO, CAROLINE FARIAS; SILVA, TALIS BASÍLIO; ANTUNES, LUIS EDUARDO CORREA; DUTRA, LEONARDO FERREIRA. **Indução de brotos *in vitro* em maracujazeiro doce BRS mel do cerrado**. Brazilian Journal of Development, v

A.4 DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; SILVA, T. B.; SARTO, M. T.; BORTOLIN, G. S.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S.; REISSER JUNIOR, C.; AMARANTE, L.; HAERTER, J.; DUTRA, L. F. **Responses of *Solanum tuberosum* L. to water deficit by matric or osmotic induction**. Potato Research, v. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11540-020-09489-3>>.

Apêndices B - Textos em jornais de notícias/revistas.

B.1 JAROSEZNISKI, A. P.; MACHADO, I. E. F.; FERREIRA, M. Z.; DORNELES, A. O. S.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Cultivo *in vitro* e unidades encapsuláveis: estratégias eficazes para conservação ex situ de recursos genéticos de batatas-silvestres**. Revista Batata Show, v. 58, p. 24 –

B.2 SILVA, T. B.; COPATTI, A. S.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Criopreservação de recursos genéticos de batata**. Revista Batata Show, p. 64-66, 2021. Disponível em: <<https://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista/edicao-60/>>.

Apêndices C - Resumos expandidos apresentados em anais de congressos

C.1 ARDILES, R. E. G.; TANIGUCHI, M.; DUTRA, D. B.; CARVALHO, J. O.; FERREIRA, L. V.; DUTRA, L. F. **Tempo de desidratação na viabilidade de unidades encapsuláveis de batata doce (*Ipomoea batatas*)**. In: XIX Encontro de Pós-Graduação, 2017, Pelotas. III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2017.

C.2 ALVES, M. V.; TANIGUCHI, M.; ARDILES, R. E. G.; TESSARO, D.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F. **Desidratação de unidades encapsuláveis de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2017, Pelotas. III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2017.

C3 TANIGUCHI, M.; PAIVA, P. D. O.; REIS, V. M.; SILVA, D. P.; NERY, F. C.; PAIVA, R. **Criopreservação de sementes de *Alibertia sessilis* Shum por desidratação em sílica gel**. In: IV Simpósio Brasileiro de Biologia da Conservação, 2017, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

C.4 FERREIRA, M. Z.; SARTO, M. T.; KLASSEN, G. L.; VASCONCELLOS, M. L.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Multiplicação *in vitro* de *Solanum comersonii* (Solanaceae)**. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.

C.5 KUNDE, R. J.; SILVA, B. E. P.; SARTO, M. T.; CASTRO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; MORAES, D. M. **Potencial de uso do extrato de *Tagetes erecta* no cultivo *in vitro* de batata-doce**. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica., 2018, Pelotas. 4ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão., 2018.

C.6 TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Unidades encapsuláveis de gemas de *Solanum calvescens* (Solanaceae)**. In: XX Encontro de Pós-Graduação ENPÓS, 2018, Pelotas. 4ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.

C.7 SILVA, T. B.; FERREIRA, L. V.; SARTO, M. T.; BARRETO, C. F.; CORREA, L. E.; DUTRA, L. F. **Indução de brotos em maracujazeiro doce BRS mel do cerrado cultivado *in vitro***. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.

C.8 ESLABAO, M. P.; SARTO, M. T.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Germinação *in vitro* de *Butia odorata* (Arecaceae) sob influência de 2,4-D**. In: XX ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO - ENPOS, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.

C.9 FERREIRA, M. Z.; TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Silício no cultivo *in vitro* de batata silvestre**

(Solanum, Solanaceae). In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.

C.10 SILVA, T. B.; DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; TANIGUCHI, M.; CASTRO, C. M.; DUTRA, L. F. **Acúmulo de biomassa e produção de tubérculos em plantas de batata submetidos a estresse osmótico.** In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.

C.11 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Organogênese *in vitro* em *Butia lallemantii* (Arecaceae).** In: XXI Encontro de PósGraduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, realizado na UFPEl, 2019.

C.12 ESLABAO, M. P.; TANIGUCHI, M.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Influência de fitorreguladores em explantes de botões florais de *Butia lallemantii* (Arecaceae).** In: XXI Encontro de Pós-Graduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.

C.13 COPATTI, A. S.; TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; DALLMANN, C. M.; SILVA, T. B.; DUTRA, L. F. **Propagação *in vitro* de lúpulo cascade, utilizando benzilaminopurina como indutor de brotação.** In: XXI Encontro de Pós-Graduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.

C.14 MIRANDA, T. M.; TANIGUCHI, M.; ARAUJO FILHO, J. C. P. J.; SILVA, TALIS BASÍLIO; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Silício no desenvolvimento *in vitro* de batatas silvestres sob estresse de calor.** In: XXIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2020, Pelotas. 6º SIIPE Semana Integrada UFPEL 2020, 2020.

C.15 SILVA, T. B.; TANIGUCHI, M.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Desenvolvimento *in vitro* de *Solanum calvences* sob deficiência de nitrogênio.** In: XXIX Congresso de Iniciação Científica, Pelotas. 6º SIIPE Semana Integrada UFPE, 2020.

Apêndices D - Resumos apresentados em anais de congressos

D.1 SARTO, M. T.; ESLABAO, M. P.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Criopreservação ex situ de espécies de Butia (Arecaceae).** In: V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018, FORTALEZA. V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018.

D. 2 SARTO, M. T.; SANTOS, J. S.; MACHADO, I. E. F.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Indução de calos in vitro em Solanum calvescens (Solanaceae).** In: V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018, FORTALEZA. V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018.

D.3 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; DORNELES, A. O. S.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Criopreservação de Solanum chacoense (Solanaceae).** In: 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Petrolina. Anais do 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. 2019.

D.4 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Cultivo in vitro de batatas silvestres.** In: 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2019, Petrolina.

D.5 SARTO, M. T.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F. **Otimização do cultivo in vitro de butiazeiro (Butia odorata, Arecaceae).** In: 70º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2019, Maceió. 70º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA e 36ª REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2019.

D.6 TANIGUCHI, M.; GOVEIA, G. G.; DALLMANN, C. M.; DUTRA, L. F. **Obtenção de unidade encapsuláveis de mandioca 'vassourinha'.** In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2020, Edição on-line. VI Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2020.

Apêndices E - Demais tipos de produção técnica

E.1 TANIGUCHI, M.; ESLABAO, M. P.; SILVA, T. B.; BARBIER, R. L.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Estabelecimento in vitro e Criopreservação de Espécies de Butia (Arecaceae) para Conservação ex situ de Germoplasma.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 337, 2020.

Apêndices F - Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

F.1 BIO.SABER. **Fisiologia Vegetal e a conservação *ex situ* de recursos genéticos da biodiversidade brasileira.** Plataforma YouTube, 01 jul. 2020. Disponível em: <https://youtu.be/2_DKgYVZAbY>.

F.2 REDE REPOUSO AGROECOLOGIA. **Métodos de conservação de sementes.** Plataforma YouTube, 17 set. 2021. Disponível em: <<https://youtu.be/3gemepkl2bg>>.

F.3 REDE REPOUSO AGROECOLOGIA. **Mudanças climáticas, sementes crioulas e segurança alimentar.** Plataforma YouTube, 10 set. 2021. Disponível em: <<https://youtu.be/7rrleHMPWYk>>.

F.4 TANIGUCHI, M. **Prospecta: Biofábrica Amazônia.** Plataforma YouTube, mar. 2022. Disponível em: <https://youtu.be/zvFr1Sh_gxE>.

Apêndices G - Participação em bancas de trabalhos de conclusão

G.1 OLIVEIRA, J. H. F.; WALBER, C. D.; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Adryelle Subtíl de Quadros. **Fitoterápicos: higiene e cura a base de plantas.** 2021 - Escola SESI Ensino Médio Heitor José Muller.

G.2 GALLO, C. M.; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Abel da S. Costa Sobrinho e Albertino G. dos Santos Neto. **Aspectos do saneamento básico no Brasil e uma análise do Estado de Alagoas.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade São Vicente de Pão de Açúcar.

G.3 GALLO, C. M.; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Juliene dos Santos Silva e Quiteria Suzana Candido de Matos. **Etnobotânica de plantas medicinais na comunidade quilombola mocambo - Porto da Folha - Sergipe.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade São Vicente.

G.4 GUERIOS, M. H. S.; TANIGUCHI, M.; ROSA, G. G. Participação em banca de Débora Goulart Iodi e Lorena Pittet. **Métodos de propagação de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.).** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Positivo

Apêndices H - Participação em bancas de comissões julgadoras

H.1 WALBE, C.; OLIVEIRA, J.; TANIGUCHI, M. **A influência do espectro de cores no crescimento das plantas.** 2020. Escola SESI Montenegro.

H.2 SARTO, M. T. **VII Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Clima Temperado Ciência na prática.** 2018. Embrapa Clima Temperado.

Apêndices I - Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de Conclusão de Curso

I.1 Talis Silva Basílico. **Criopreservação de *Solanum Commersonii malmeanum*. 2020.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas. Orientador: Marisa Taniguchi.

Iniciação Científica

I.2 Rodrigo Nicolão. **Relatório de estágio curricular supervisionado. 2019. Iniciação Científica.** (Graduando em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Marisa Taniguchi.

Sumário

Capítulo 1	50
CONSERVAÇÃO EX SITU E A CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	50
1. Introdução Geral	27
2. Revisão de literatura	29
2.1 Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais	29
2.2 Cultura de tecidos vegetais como ferramenta para conservação	30
2.2.2 Micropropagação	31
2.2.3 Resgate de embriões zigóticos	32
2.2.4 Unidades encapsuláveis	33
2.2.5 Criopreservação	34
3. Referências	37
Capítulo 2	50
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DO GÊNERO	50
<i>Butia</i> (Arecaceae)	50
1 Introdução	51
2 Referencial teórico	53
2.1 Gênero <i>Butia</i>	53
2.1.1 <i>Butia lallemantii</i> (Deble & Marchiori)	56
2.1.2 <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick	57
2.1.3 <i>Butia exilata</i> Deble & Marchiori	59
3 Materiais e métodos	61
3.1 Material vegetal	61
3.2 Cultivo in vitro de embriões	64
3.2.1 Assepsia das sementes	64
3.2.2 Resgate de embriões zigóticos	66
3.3 Organogênese via Thin Cell Layer (TCL)	67
3.3.1 Análises anatômicas dos explantes da organogênese via TCLs	70
3.4 Criopreservação	70
3.4.1 Assepsia das sementes	70
3.4.2 Resgate de embriões e pré-cultivo	71
3.4.3 Adaptação da Droplet vitrification	71
3.4.4 Adaptação do Encapsulamento-Vitrificação	74
3.4.5 Adaptação da Vitrificação	75
3.4.6 Aclimatização	77
4. Análises estatísticas	77
5 Resultados e discussão	78
5.1 Germinação e cultivo in vitro	78
5.2 Organogênese via TCLs	87
5.3 Criopreservação	96
5.3.1 Adaptação da Droplet vitrification	96
5.3.2 Adaptação do encapsulamento- vitrificação	99
5.3.3 Adaptação da vitrificação	102
5.3.4 Aclimatização	105
6. Conclusões	108
7.Referências	109
Capítulo 3	119
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE BATATA SILVESTRE	119

1. Introdução	120
2. Referencial teórico	122
2.1 Batatas silvestres	122
2.2 A Conservação dos recursos genéticos de Batata Silvestre	123
2.3 Espécies de batatas silvestre	125
2.3.1 Espécies de batatas silvestre: <i>Solanum chacoense</i> Bitter	126
2.3.2 Espécies de batatas silvestre: <i>Solanum commersonii</i> Dunal	127
2.3.3 Espécies de batatas silvestre: <i>Solanum malmeanum</i> Bitter	128
2.3.4 Espécies de batatas silvestres: <i>Solanum calvescens</i> Bitter	130
2.4 Sementes botânicas de batatas silvestres	131
3. Materiais e métodos	134
3.1 Material vegetal	134
3.2 Micropropagação	134
3.2.1 Estabelecimento in vitro (Segmentos nodais)	134
3.2.2 Indução de brotações	135
3.2.3 Unidades encapsuláveis	136
3.2.4 Aclimatização	137
3.3 Criopreservação	138
3.3.1 Droplet vitrification	138
3.3.2 Adaptação da constituição da matriz de encapsulamento, para criopreservação	139
3.3.3 Encapsulamento-Vitrificação	139
3.3.4 Otimização das técnicas de criopreservação: Encapsulamento; crio placa e droplet vitrificação	140
3.4 Cultivo in vitro de sementes botânicas de batata silvestre	143
3.4.1 Criopreservação de sementes botânicas	144
4 Análise estatística	145
5. Resultados e discussões	146
5.1 Micropropagação	146
5.2 Unidades Encapsuláveis	150
5.3 Criopreservação	152
5.3.1 Droplet vitrification	152
5.3.2 Encapsulamento e vitrificação	155
5.3.3 Otimização das técnicas de criopreservação: Encapsulamento; droplet vitrificação e crio placa	156
5.4 Cultivo in vitro de sementes botânicas de batata silvestre	160
5.4.1 Criopreservação de sementes botânicas	162
6. Conclusões	167
7. Considerações finais	168
8. Referência bibliográfica	169

Capítulo 1

CONSERVAÇÃO EX SITU E A CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

1. Introdução Geral

Atualmente as alterações climáticas, observadas na Terra, tais como o aumento da temperatura, distribuição irregular de chuvas e elevação do nível do mar, estão relacionadas ao efeito estufa e são alvo de estudos globais (CHAPPELKA; GRULKE 2016). Os gases responsáveis por essas mudanças climáticas, como o dióxido de carbono, o metano, o óxido nitroso e outros contaminantes para o ambiente da Terra, aumentaram rapidamente nos últimos 100 anos (CHAVES et al. 2017). Essa atuação dos gases de efeito estufa, alterando de maneira física e química o clima, impacta negativamente todos os ciclos biológicos (CLIMATE CHANGE EVIDENCE; CAUSES, 2020).

Deste modo, os organismos integrantes da biodiversidade vegetal, podem perder características de crescimento, desenvolvimento, aspectos ligados à constituição de flores, frutos e, conseqüentemente, de reprodução, essencial para a perpetuação destas espécies (LE TREUT et al., 2007; CIDADANIA, MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE, 2017). Calcula-se que de cada seis espécies, uma possivelmente será afetada e poderá ser extinta, devido ao aquecimento global e, a América do Sul, é considerada uma das regiões do planeta que terá grande impacto (URBAN, 2015).

Além disso, os biomas enfrentam várias adversidades antrópicas e, frente aos efeitos das mudanças climáticas, apresentarão perdas incalculáveis para os ecossistemas e os sistemas humanos. Neste contexto, a conservação ex situ de recursos genéticos torna-se uma estratégia, que pode reduzir os impactos negativos, causados à biodiversidade vegetal. Para conservação ex situ, a utilização da biotecnologia destaca-se, com as técnicas de cultura de tecidos vegetais, que possibilita resguardar as espécies da ameaça de extinção (PÁDUA, 2018). Além disso, o estabelecimento de protocolos in vitro, para a conservação de espécies selvagens ou nativas, permitem a criação de bancos de dados de referência para futuros estudos (CORDEIRO et al., 2012).

A escolha da técnica de conservação in vitro depende do tipo de cultura e de condições disponíveis no laboratório (SILVA et al., 2018). Conseqüentemente, vários protocolos alternativos são desenvolvidos para se adaptarem às espécies conservadas, sendo importantes o tipo de explante e o

tempo de armazenamento, a fim de manter a capacidade de recuperação da cultura (ENGELMANN 2008; SHIBLI et al., 2006). O processo mais indicado para conservação em longo prazo é a criopreservação, método de conservação que permiti o acesso imediato ao germoplasma de interesse e mantém a diversidade genética, sem comprometer sua estabilidade (ENGELMANN 2004; SHIBLI et al., 2006; RAI et al., 2009).

Ações e pesquisas para conservação de populações de espécies vegetais, principalmente àquelas de elevada importância ambiental, socioeconômica e ameaçadas de extinção, são extremamente importantes e urgentes. Portanto, esse trabalho tem como objetivo principal, utilizar as ferramentas da biotecnologia, para adaptar protocolos de conservação em longo prazo para espécies do gênero *Butia* (Arecaceae) e espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae).

2. Revisão de literatura

2.1 Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais

A biodiversidade ou diversidade biológica, normalmente é apresentada como a riqueza de espécies existentes em uma dada região (GANEN; DRUMMOND, 2011). Essa riqueza tem sido cada dia mais ameaçada, devido ao aumento das atividades extrativistas, aliado à intensificação das atividades socioeconômicas e às mudanças climáticas, consideradas umas das maiores preocupações mundiais da atualidade (PECL et al., 2017).

Existem estratégias para proteger espécies em perigo de extinção sob a forma de conservação *in situ* e *ex situ* (NASCIMENTO et al., 2015). A conservação *in situ* é a conservação de ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seu entorno natural. A conservação *ex situ* é a manutenção do recurso genético fora do ambiente natural e utilizada para proteger coleções de plantas de uma potencial ameaça de perda e para armazenar sementes ou materiais vegetais em condições artificiais, manter sua viabilidade em longo prazo e disponibilidade para uso (BOROKINI, 2013; MUTHONI; SHIMELIS; MELIS, 2019).

Iniciativas relacionadas à conservação *in situ* e *ex situ* de espécies nativas e as parentes silvestres de culturas (CWRs) também foram estabelecidas em muitos países (FAO, 2011). Destaca-se a necessidade de salvaguardar estratégias para garantir a diversidade de plantas comestíveis e promover seu uso sustentável (CANTWELL et al., 2022).

Cabe considerar também, que a interferência humana intensifica a necessidade de se utilizar métodos *ex situ* de conservação, o que permite maior garantia na sobrevivência das espécies e pode ser considerada mais eficiente entre as formas de conservação de bancos de germoplasma de plantas (PINTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2015). No Brasil, esforços têm se intensificado na coleta e conservação *ex situ* do germoplasma de espécies nativas e silvestres relacionadas a importantes culturas.

2.2 Cultura de tecidos vegetais como ferramenta para conservação

A cultura de tecidos vegetais é amplamente empregada na área da agricultura, horticultura, silvicultura e melhoramento de plantas. São um conjunto de diferentes técnicas da biotecnologia, utilizadas para propagação em massa, eliminação de vírus, produção de metabólitos secundários, moléculas projetadas e clonagem in vitro, obtendo plantas livres de doenças, em larga escala e rápida multiplicação de genótipos de plantas raras (ALTPETER et al., 2016; ESPINOSA; GARZA; SARCIA, 2018). Assim, a cultura de tecidos pode ser indicada, para determinadas espécies quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação convencional (PORTO, 2009).

O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, em que qualquer célula viva no organismo vegetal, contém a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, ou seja, uma célula vegetal já diferenciada pode ser induzida a voltar ao estado meristemático, redefinindo seu padrão de diferenciação celular e desenvolvendo novos órgãos e até mesmo indivíduos inteiros (PASQUAL et al., 1997; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; TERMIGNONI, 2005).

A cultura de tecidos, também pode ser aplicada para conservação de recursos genéticos, com a inclusão em bancos de germoplasma, aumentando a facilidade de troca de material genético (PINHAL et al., 2011; KELLER et al., 2013; JUNGHANS; SOUZA, 2013). Além de possibilitar o armazenamento e reprodução de espécies, que apresentam sementes com comportamento fisiológico intermediário ou recalcitrantes. Portanto, a cultura de tecidos apresenta maior vantagem sobre os métodos convencionais de conservação para esses materiais vegetais (SIDDIQUE, 2003; KELLER, et al., 2013; OJO; PANDE; NAILWAL; 2018).

O sucesso da cultura de tecidos depende de vários fatores como o equilíbrio na utilização de reguladores de crescimento, disponibilidade de nutrientes, fotoperíodo, qualidade de luz e temperatura (PINHAL et al., 2011). Dentre estes fatores, importante destacar o efeito dos hormônios vegetais, em que uma única classe hormonal pode influenciar eventos fisiológicos de diversa natureza (KERBAUY, 2012). Dessa maneira, é possível intervir na regulação hormonal das plantas por meio dos reguladores de crescimento acrescentados

ao meio de cultura que, de forma balanceada, permite influenciar na multiplicação e alongamento das células de todos os órgãos da planta e de forma independente, estimulando mudanças no comportamento das raízes, caule e folhas (CARVALHO et al, 2006).

Para conservação a longo prazo, a cultura de tecidos vegetais tem sido utilizada com foco nas espécies vegetais ameaçadas de extinção, por meio das metodologias de criopreservação (DIAS, et al., 2016; OJO; PANDE; NAILWAL; 2018). Neste sentido, os protocolos para conservação *ex situ* dos recursos genéticos vegetais, devem garantir, além da manutenção do material vegetal por longos períodos, a estabilidade genética durante o armazenamento (BETTONI, 2019).

Portanto, a cultura de tecidos com técnicas e tratamentos adequados, aliados a capacidade de regeneração de certos tecidos vegetais é considerada a ferramenta imprescindível, para a conservação em longo prazo de espécies vegetais ameaçadas de extinção.

2.2.2 Micropropagação

A micropropagação é uma forma de multiplicação assexuada conduzida *in vitro* sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura (REINHARDT et al., 2018). Nessa técnica, explantes são induzidos à multiplicação celular *in vitro*, mediada ou não, por fitorreguladores, produzindo grande quantidade de novos indivíduos, genotípica e fenotipicamente idênticos (PEREIRA, 2014).

Essa tecnologia a favor dos estudos voltados para a expansão comercial é uma alternativa para a propagação de espécies vegetais, amplamente empregada como técnica comercial para fornecer a produção de plantas todo ano (GHOSH; IGAMBERDIEC; DEBNTH 2021). Essa ferramenta biotecnológica também permite a produção de compostos bioativos, que podem contribuir para utilização consciente da biodiversidade (KARUPPUSAMY, 2009). Em 2002, a FAO publicou um relatório em associação com a AIEA (International Atomic Energy Agency—Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture)

abordando as técnicas de cultura in vitro para a produção de compostos bioativos de maior valor (FAO/IAEA, 2002), demonstrando que as ferramentas da biotecnologia, estão presentes em diversas áreas.

2.2.3 Resgate de embriões zigóticos

O resgate de embriões zigóticos pode ser utilizado como fonte de explantes para o cultivo in vitro em programas de conservação ou melhoramento genético, pois apresentam baixo índice de contaminação, já que estão alojados em ambiente asséptico dentro da semente (ZHANG; LESPINASSE, 1991; HU; FERREIRA, 1998). Além disso, embriões zigóticos são considerados uma opção como explante para criopreservação por vitrificação. Os tecidos embrionários favorecem a penetração dos crioprotetores, a desidratação, a variabilidade genética e permitem a germinação uniforme e rápida quando comparado com sementes inteiras (SANTANA-BUZZY et al. Al., 2007; BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2011).

O estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogenético (CHALUPA, 1999). Em geral, embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são considerados quase autotróficos, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia, podendo germinar e crescer em um meio inorgânico (HU; FERREIRA, 1998).

No entanto, quando há variação no estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados, a escolha de meio de cultura adequado para o desenvolvimento é importante. Assim como, condições de luminosidade e temperatura, utilização de reguladores de crescimento, condições da planta matriz e a qualidade dos frutos, são considerados fatores essenciais na cultura de embriões (GEORGE, 1996; PERIK, 1997). A técnica de cultivo in vitro de embriões zigóticos tem sido utilizada com sucesso em várias plantas, inclusive para algumas espécies de palmeiras como o *Cocos nucifera* (LÉDO et al.; 2007, FOGAÇA et al.; 2008, SOUZA et al.; 2011, EBERT et al.2014), permitindo a superação de barreiras genéticas à germinação (HU; FERREIRA, 1998).

2.2.4 Unidades encapsuláveis

O desenvolvimento de unidades encapsuláveis é uma técnica de cultura de tecidos de plantas, que consiste em encapsular propágulos como embriões somáticos, embriões zigóticos, ápices caulinares, gemas axilares e microbrotos (CID, 2004; AHMED et al., 2015). Estes propágulos quando encapsulados também são chamados de “sementes sintéticas” e são usados para facilitar o armazenamento de curto prazo, para troca de germoplasma e inclusive para semeadura tardia e conversão em plantas (GUERRA et al., 1999; GANTAIT; KUNDU, 2017; GANTAIT; VIJAYAN; MAJEE, 2017).

Considera-se que a unidade encapsulável, possua a capacidade de imitar uma semente e converter-se a uma planta normal em condições in vitro ou ex vitro, sendo o sucesso desse método de propagação altamente influenciado pela composição na formação da cápsula, que além da proteção, é responsável pela disponibilização de nutrientes para o explante, facilitando o crescimento, a sobrevivência e germinação do explante (SINGH et al., 2010).

Como agente encapsulante, o alginato de sódio tem sido o mais empregado, fato atribuído à sua solubilidade à temperatura ambiente, habilidade de gel permeável com o cloreto de cálcio, boa propriedade geleificante, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (GUERRA et al., 1999). Tanto o alginato de sódio quanto o cloreto de cálcio desempenham um importante papel na complexação e na qualidade da cápsula, mas com a finalidade de melhorar a conversão das unidades encapsuláveis, tem sido introduzido, na matriz de encapsulamento, o carvão ativado, osmorreguladores como sorbitol e manitol, e reguladores de crescimento (PEREIRA et al., 2008; TAHA et al., 2012).

Contudo, fatores como porcentagem de alginato, constituição da matriz e tempos de exposição ao cloreto de cálcio, devem ser estudados, uma vez que todos esses fatores exercem influência na taxa de emergência das unidades encapsuláveis (CASTILLO et al., 1998; PATEL et al., 2000).

As unidades encapsuláveis para a criopreservação, técnica de encapsulamento-desidratação foi proposta pela primeira vez por Febre e Dereuddre (1990). Desde então, muitos estudos utilizaram a osmoproteção, proporcionada pelo encapsulamento, para garantir a estabilidade do material durante a criopreservação. O encapsulamento-desidratação aliado à

criopreservação é indicado para a conservação de espécies tropicais com sementes recalcitrantes, por reduzir os danos causados aos tecidos vegetais diante das soluções crioprotetoras e as ultrabaixas temperaturas (SHIBLI et al., 2016).

2.2.5 Criopreservação

A criopreservação consiste no processo de resfriamento e armazenamento da estrutura vegetal como células, tecidos ou órgãos vegetais em nitrogênio, (LN; -196 °C) ou vapor LN (-160 °C), para que as atividades celulares sejam reduzidas, evitando a degradação do material genético, resultando na diminuição ou até mesmo na paralisação do metabolismo celular (MELETTI et al., 2007; REED, 2008; KACZMARCZYK et al., 2011; BENELLI, 2021). Esse método de conservação demonstra vantagens como a redução ou eliminação de danos causados no DNA, diminuição na necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade. A criopreservação pode contornar problemas como doenças e danos ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos, além disso, o material é armazenado em pequenos volumes e, teoricamente, pode-se armazená-lo por período ilimitado (ENGELMANN, 2011; PENCE, 2011; SKUBITZ, 2017).

A maioria dos materiais utilizados na criopreservação (suspensões de células, calos, meristemas, embriões) contém quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento, causadas pela formação de cristais de gelo intracelulares, quando expostos a ultra-baixas temperaturas, que podem causar a morte celular durante o processo de congelamento (REED, 2008; BENELLI, 2021).

A técnica de criopreservação baseia-se na remoção de toda a água congelável dos tecidos por desidratação física ou osmótica e posterior congelamento ultrarrápido (BENELLI, 2021). Assim, as células devem ser desidratadas artificialmente para que fiquem protegidas dos danos causados pela cristalização da água. Portanto, a desidratação é uma etapa importante para

elaboração de protocolos eficazes de criopreservação (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; GONZALEZ-ARNAO, et al., 2008; ENGELMANN, 2011).

Uma vez que a temperatura ultrabaixa interrompe as reações metabólicas e bioquímicas na célula, fatores como adição de crioprotetores no meio de pré-cultivo, definição do tempo de exposição do explante a soluções crioprotetoras e o melhor meio de regeneração depois da imersão em nitrogênio líquido, devem ser testados anteriormente para cada espécie e cada tipo de explante (CASTRO et al., 2011), sendo estes cuidados, imprescindíveis para a escolha da técnica (PANIS; LAMBARDI, 2005).

As técnicas de criopreservação que apresentam como base a vitrificação, a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e metaestável. Nesse processo, as células ao serem desidratadas atingem estado vítreo e, a viscosidade obtida, restringe a difusão de substratos e produtos dentro das células, promovendo diminuição da atividade metabólica e estabilidade ao longo do tempo (SAKAI; ENGELMANN, 2007; GOMES-COPELAND et al., 2012; FALTUS; BILAVCIK; ZAMECNIK, 2021).

Assim, podemos considerar que a vitrificação envolve a remoção total ou parcial da água passível de congelamento para evitar a formação de cristais. Sendo realizado o congelamento ultrarrápido em nitrogênio líquido, com uma prévia desidratação física ou osmótica dos explantes e, constantemente atingem bons resultados de regeneração do material vegetal (KAVIANI, 2011; BENELLI et. al., 2013).

Na *Droplet vitrification*, os explantes passam por um pré-tratamento antes da exposição a uma gota de solução de vitrificação vegetal (PVS2) em papel alumínio e posterior imersão no nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). O interesse principal é a obtenção de taxas de congelamento/descongelamento muito elevadas, devido ao pequeno volume de crioprotetor utilizado e pelas propriedades de alta transferência de calor do alumínio (SAKAI; ELGENMANN, 2007).

A criopreservação é atualmente a abordagem biotecnológica mais inovadora que permite a conservação segura em longo prazo da biodiversidade vegetal, sem risco de modificações genéticas (BENELLI, 2021). Além disso, a manutenção dos bancos de genes de campo são caros e a cultura está exposta a muitos perigos, portanto, a criopreservação é um método viável para

conservação e que pode ser auxiliados por estudos anatômicos, ultraestruturais, moleculares, fisiológicos e procedimentos de cultura in vitro. A criopreservação é um processo reversível, desde que seja eficaz o suficiente para formar tecidos vegetais vitrificados (ZAMECNIK, FALTUS, BILAVCIK, 2021) e que possam ser regenerados formando uma planta completa.

3. Referências

BETTONI, J. C.; SOUZA, J. A. Crioterapia: uma potencial ferramenta para erradicação de vírus em plantas. **Revista Agronomia Brasileira**. Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal – SP. v. 2. 2019.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: viability, dormancy and environmental control**. Berlin: Springer-Verlag, 375 p. 1982.

BIDABADI, Siamak Shirani; JAIN, S. Mohan. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 702, 2020.

BOJÓRQUEZ, Q.J.E.A.; SÁNCHEZ, C. L. A.; GAMBOA, T. N. F.; QUINTALTUN, F.; MINERO, G.Y.; MARTÍNEZ, E. M.; SANTOS, B.C. Effect of plant growth regulators on in vitro germination of coffee zygotic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v. 10: p. 19056- 19065. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, p. 365. 2009.

BRÜCHER, H. **BATATAS SILVESTRES BRASILEIRAS Seção Tuberarium do gênero Solanum na Região Sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999.

BUTTOW, M.V.; CASTRO, C. M.; SCHWARTZ, E.; TONIETTO, A.; BARBIERI, R. L. Caracterização molecular de populações de butia capitata (arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, p. 230-239. 2010.

CARPUTO, D.; BARONE, A.; CARDI, T.; SEBASTIANO, A.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S. J. Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). **Proceedings of National Academy of Science**, New York, v. 94, p. 12013-12017. 1997.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: **EMBRAPA Algodão**, (EMBRAPA Algodão. Documentos, 115) 22 p. 2003.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. de A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S. V.; PIMENTEL, N.W. Embriogênese Somática. Campina Grande: Embrapa Algodão (**Boletim Técnico; Documento,152**). 2006.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de culturas de tecidos d plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7, n.1, p. 30-60, 2011.

CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, v.17, p.172-176, 1998.

CASTRO, S.V., et al. Intracellular Cryoprotant Agents: characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 2 p. 957. 2011.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). **In Somatic embryogenesis in woody plants** (S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.5, p.31-43. 1999.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Brisbane, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

CID, L.P.B. Sementes Sintéticas: O desenvolvimento de sementes encapsuladas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. n.32, janeiro/junho, p.4-7, 2004.

CLIMATE CHANGE EVIDENCE & CAUSES. Londres: The Royal Academi, v. 1, n. 10, 20 dez. 2020. Anual. Disponível em: https://royalsociety.org/~media/royal_society_content/policy/projects/climate-evidence-causes/climate-change-evidence-causes.pdf. Acesso em: 11 mar. 2022.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. v. 10, p.349-356, 2001.

EMGELMANN, F. **Plant cryopreservation: progress and prospects. In vitro Cellular & Developmental Biology**, New York, v. 40, n. 5, p. 427-433, 28, 2004.

ENGELMANN, F. et al. The development of encapsulation dehydration. In: Reed BM (Ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer Corvalis: **Springer**. p. 59-75. 2008.

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, Feb. 2011.

FAO. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: **FAO**, 336p. 1996.

FAO/OECD. 2012. Building resilience for adaptation to climate change in the agriculture sector. Proceedings of a joint FAO/OECD Workshop. A. Meybeck, J., Lankoski, S., Redfern, N., Azzu & V., Gitz. Rome, **FAO**. 2012.

FEBRE, J. & DEREUDDRE, J. (1990). Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of solanum shoot-tips. **Cryoletters**, 11, 413–426.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.35, n 6, p. 1039- 1042, dez. 2014.

FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169, 1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. 1999.

GARCIA JL, TRONCOSO J, SARMIENTO R; TRONCOSO A. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v 69; p. 95-100, 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3ª ed. The Background Springer. v. 1, 709 p. 2008.

GHOSH, A., IGAMBERDIEV, A.U. & DEBNATH, S.C. Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. *Mol Biol Rep* **48**, 823–841 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6>.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.92, p. 1-13. 2008.

GRATAPAGLIA, D .; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169, 1998.

GUERRA, P. P; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Ed.) **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília Embrapa-SPI; Embrapa-CNPH, 1999.

HARTMANN, H.T; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.JR.; GENEVE, R.L.; **Plant propagation, principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey. 2002.

HAWKES, J.G., HJERTING, J.P. **The potatoes of Argentina,Brazil, Paraguay and Uruguay**. Oxford: Clarendon,.525p.1969.

HERINGER A.S.; VALE E. M.; BARROSO T.; SANTA-CATARINA C.; SILVEIRA V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theor Exp Plant Physiol** 25 (2):116-124. 2013.

H. BRÜCHER. **BATATAS SILVESTRES BRASILEIRAS Seção Tuberarium do gênero Solanum na Região Sul do Brasil**. Brasília:EMBRAPA,1999.

HAWKES, J.G., HJERTING, J.P. **The potatoes of Argentina,Brazil, Paraguay and Uruguay**. Oxford : Clarendon,.525p.1969.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G.. Cultura de embriões. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH. p.371-393. 1998.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, S.A. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013.

KACZMARCZYK, A.; RUTTEN, T.; MELZER, M.; KELLER, E.R.J. "Ultrastructural changes associated with cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips," **CryoLetters**, vol.29, no. 2, pp. 145–156, 2008.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species: what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27:137-138. 1965.

KARUPPUSAMY, S., A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **J. Med. Plants Res.** 3, 1222–1239, 2009.

KELLER, E. R. J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 431 p. 2012.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Wallingford, v. 38, n.5, p. 415-422, Sept/Oct. 2002.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

LEDO, A.S; LAMEIRA, O.A, BENBADIS, A.K; MENEZES I.C; LEDO C.A.S; OLIVEIRA, M.S.P..Cultura in vitro de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira Fruticultura**. 23:13–22.2001.

LEDO AS, GOMES KKP, BARBOZA SBSC, VIEIRA GSS, TUPINAMBA EA, ARAGA~O WM.. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasil** 42:147–154, 2007.

LI DZ, PRITCHARD HW. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends Plant Sci**, 14:1360–1385, 2009.

LIMA-BRITO, Alone; RESENDE, Sheila Vitória; LIMA, Carolina Oliveira de Cerqueira; ALVIM, Bruno Matos; CARNEIRO, Claudia Elena; SANTANA, José Raniere Ferreira de. In vitro morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 502-510,

LOPES P.S.N.; AQUINO C.F.; MAGALHÃES H.M.; JÚNIOR D.S.B. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (MARTIUS) BECCARI e-ISSN 1983-4063 **Pesquisa e Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, jan./mar. 2011

MAUNDER M (eds) **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Island Press, Washington DC, pp 389–418, 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

MAUNDER M, GUERRANT EO, HAVENS K, DIXON KW. **Realizing the full of ex situ contributions to global plant conservation**. In: Guerrant EO, Havens K,

MAUNDER, M. (eds) *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington DC, pp 389–418, 2004.

MERCADANTE-SIMÕES M.O; FONSECA R.S; RIBEIRO L.M; NUNES Y.R.F. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, 8:143-149, 2006.

MELETTI, L. M. M. et al. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 6, n. ½, p. 13-20, abr/jun. 2007.

MENDONÇA, M.S.; OLIVEIRA, A.B.; ARAÚJO, M.G.P.; ARAÚJO, L.M.. Morfo-anatomia do fruto e semente e *Oenocarpus minor* Mart. (ARECACEAE). **Revista Brasileira de Sementes** 30: 90-95.2008.

- MELO B.; PINTO J.E.B.P.; LUZ J.M.Q.; PEIXOTO J.R.; JULIATTI F.C.,
Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e
desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirubeira
[*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25:p.1301-
1306, 2001.
- 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**, Florianópolis, n. 40, p. 70-81. 2011.
- MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho-
azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas
Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Instituto de
Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros,
2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays
with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3,
p. 473-497, 1962.
- ONISHI N, SAKAMOTO Y, HIROSAWA T. Synthetic seeds as an application of
mass production of somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult*;39:137–
45.1994.
- MUSTAFA, Y. T.; VAN LAAKE P.E.; STEIN, S. **Modeling for Improving
Forest Growth Estimates**. IEEE Transactions on Geoscience and Remote
Sensing. Bayesian Network .49 (2): 639-649.2011.
- NASHIKI, A., JANSKY, S.H. & BETHKE, P.C. **The Effect of Mother Plant
Fertilization and Stratification on the Germination of True Potato Seed**.
Am. J. Potato Res. **98**,194–201 (2021).
- NHUT, D.T. et al. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under
superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and
Organ Culture**, The Hague, v.73, p.43-52, 2003.
- OLIVEIRA, A.B.; MENDONÇA, M.S.; ARAÚJO M. G. P. Aspectos anatômicos
do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart.: uma
palmeira da Amazônia. **Acta bot. bras.** 24(1): 20-24. 2010.

ONISHI N, SAKAMOTO Y, HIROSAWA T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Cult** ;39:137–45.1994.

PADUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró- embriogênicas de dendezeiro (Elaeis guineenses Jacq.)**. 2012, 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PADUA, Juliano Gomes. Conservation of crop genetic resources in Brazil in the context of the target 9 of the Global Strategy for Plant Conservation. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 1557-1565, dez. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

PANIS, B., LAMBARDI, M. **Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees**. Rome: FAO, 2005.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 45-55. 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. 1ª ed. Lavras, UFLA/FAEPE, 74p. 2001.

PATEL, A. V. et al. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**, v.19, n.9, p.868-874, 2000.

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, Feb. 2011.

PEREIRA, M. R. **FONTES ALTERNATIVAS DE MINERAIS E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA CV. WILLIAMS**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINTO, G.; LOUREIRO, J.; LOPES, T.; SANTOS, C. Analysis of genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.580-587, 2004.

RAHMAH, S. A. M.; PING, K. S.; SUBRAMANIAM S.. Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities of Brassidium Shooting Star Orchid Safrina. **Scientific World Journal**. 10 p. Malaysia. 2015

RAI MK, ASTHANA P, SINGH SK, JAISWAL VS, JAISWAL U. The encapsulation technology in fruit plants—a review. **Biotechnol Adv**; 27:671–9.2009.

REDENBAUGH K, SLADE D, VISS P, FUJII JAA. Synthetic seed technology for mass cloning of crop plants: problems and perspectives. **Hortscience** ;22:796–814.1987.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer. 513p. 2008.

REITZ, R. 1974. **Palmeiras**. In **Flora ilustrada catarinense** (R. Reitz, ed.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1974.

REINHARDT, Domingo Haroldo R. C. et al. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 6, p. 1-22, 3 dez. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018302>.

RIBEIRO L.M; NEVES S.C; NEVES, SILVA P .O.; ANDRADE I.G, Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.2, p. 133-139, mar/abr, 2016.

REYNOLDS, E.S. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy**. Journal of Cell Biology, v17, p.208-212, 1963.

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

ROCHA, B.E.G. **Variabilidade isoenzimática e teor de matéria seca dos clones de batata silvestre (*Solanum spp.*)**. Pelotas, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento)– Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPEL, 1997.

ROCHA, H. S. Biófabrics: estrutura física e organização. In: JUNGHAS, T.G.; SOUZA, A. da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas, BA. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. p 121-152. 2009.

ROSSATO, M. **Recursos genéticos de palmeiras nativas do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 136 f. 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p.30-33, 1990.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n.3, p. 151-172, 2007.

SANTANA, B. N.; ROJAS, H. R.; GALAZ, Á. R.M.; KU, C. J.R.; MIJANGOS, C.J.; GUTIÉRREZ, P. L.C.; LOYOLA, V.V. M. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 43:507-520. 2007.

SEMA. **Decreto nº 42.009, de 31 de dezembro de 2002**. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especiesameaçadas.pdf>>. Acesso em: 5 de janeiro 2017.

SILVA, Diogo Pedrosa Corrêa da; OZUDOGRU, Elif Aylin; REIS, Michele Valquíria dos; LAMBARDI, Maurizio. In vitro conservation of ornamental plants. **Ornamental Horticulture**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 28-33,. 2018.

SINGH, J.; TIWARI, K.N. High-frequency in vitro multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – A valuable medicinal plant. **Industrial Crops and Products**. v. 32, p. 534-538. 2010.

SINGH SK, RAI MK, ASTHANA P, SAHOO L. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). **Acta Physiol Plant**; 32:607–10, 2010.

SPOONER, D.M., M. GHISLAIN, R. SIMON, S.H. JANSKY, AND T. GAVRILENKO. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. **Botanical Review** 80: 283–383.2014.

STEIN, V. C.; PAIVA, R. VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. Subso. Affinis (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v. 34, n.5, p. 789-796, 2010.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

SUBRAMANIAM, S. et al. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium sonia* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 19, p. 3902-3907, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013.

TOMLINSON, P. B. **The structural biology of palms**. Oxford: Clarendon Press, 1990.

TONIETTO, A.; SCHLINDWEIN, G.; TONIETTO, S. M. Usos e potencialidades do butiazeiro. **Circular Técnica**, Porto Alegre: FEPAGRO. n. 26. 28p. 2009.

TOMAZ, Z.F.; SCHUCH, M.W.; PEIL, R.M.N.; TIMM, C.R.F. Desenvolvimento de porta-enxertos de pessegueiro obtidos por miniestacas, em duas épocas, e sistema de cultivo sem solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.4, p.988-995, 2014.

TZEC-SIMA, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M.L. In vitro rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 42:54-58 2006.

URBAN MC. **Accelerating extinction risk from climate change**. Science, Washington, v. 348, n. 6234, p. 571-573, 2015.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos tropicais em paisagens intensamente cultivadas. In: **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Gainesville: Conservation International do Brasil, Universidade Federal de Minas Gerais, University of Florida. p. 135-154, 1995.

WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation, **Protoplasma**, vol.249, no.2, pp.323–335, 2012.

WITHERS, L. A; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES et al. [ed.]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p.297-330. 1998.

ZAMBRANA, N.Y.P.; BYG, A.; SVENNING, C.C.; MORAES, M.; GRANDEZ, C.; BALSLEY, H. Diversity of palm uses in the western Amazon. **Biodiversity and Conservation**. 16:2771-2787. 2007.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh) by 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae** 46:215-223.1991.

Capítulo 2
ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DO GÊNERO
***Butia* (Arecaceae)**

1 Introdução

As palmeiras pertencem à Arecaceae, terceira família botânica mais importante, amplamente distribuída e cultivada em todo o mundo, compreendendo cerca de 2600 espécies, das quais 48 são nativas do Brasil (LORENZI et al., 2010; BASU et al., 2014; SOUZA et al., 2020). Além disso, apresentam importância socioetnobotânica e ecológica para os povos tradicionais, devido à utilização como fonte de alimento, remédios populares, fibras e artesanato tradicional (SOUZA, 2020; NERI-NUMA et al., 2018; CAMPOS et al., 2019).

O gênero *Butia* (Becc.) Becc. destaca-se por apresentar espécies endêmicas do Brasil, com interesse agroindustrial, potencial ornamental, medicinal e alimentício (MARTINS, 2003; MOURA, 2008; ESLABÃO et al., 2017; TANIGUCHI et al., 2020). Os frutos têm sabor ácido adocicado, e são amplamente utilizados na fabricação de sucos, sorvetes, picolés e licores, enquanto o tronco e a inflorescência liberam seiva que é utilizada para problemas respiratórios, demonstrando a importância cultural e econômica do butiá para as populações regionais (MARTINS, 2003; ROSSATO, 2007; MOURA, 2008; BUTTOW et al., 2010).

A propagação é sexuada e as sementes apresentam dormência morfológica ou morfofisiológica relacionada com as limitações impostas pelos envoltórios, com embriões subdesenvolvidos, ocorrendo germinação desuniforme e lenta. De modo geral, o tempo requerido para que a germinação ocorra é de oito meses a dois anos (FIOR et al., 2011; LOPES et al., 2011; WALDOW et al., 2013; JAGANATHAN et al., 2021). Apesar do alto potencial de uso, o gênero encontra-se ameaçado de extinção, consequência da constante devastação do habitat natural, sendo as espécies listadas como parte da flora ameaçada de extinção na União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2016). Portanto, a busca por técnicas alternativas de conservação, proporcionando a inclusão e a manutenção de espécies em bancos de germoplasma in vitro é de extrema importância (KELLER et al., 2013; VARGAS et al., 2020).

Nesse contexto, a cultura de tecidos assegura a exploração sustentável, principalmente em ecossistemas ameaçados, garantindo a conservação de espécies de interesse econômico (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; PINHAL et al., 2011; MORAES et al., 2012). Essas estratégias permitem que um único explante seja multiplicado em período de tempo relativamente curto e espaço reduzido, sob condições controladas, independentemente da estação e clima (AKIN-IDOWU et al., 2009; SINGH, 2018; OSENI; PANDE; NAILWAL, 2018).

A escolha das espécies baseou-se em revisão bibliográfica, inferindo espécies ameaçadas de extinção com interesse para conservação da biodiversidade do estado do Rio Grande do Sul (SOARES; LONGHI, 2011; FIOR; SOUZA; SCHWAR, 2012; HERINGER et al, 2013; VARGAS et al. 2014; ESLABÃO et al., 2017). As pesquisas com cultura de tecidos para *Butia* sp. ainda são incipientes, relatando alguns estudos sobre germinação em casa de vegetação, cultivo in vitro e criopreservação (FIOR, 2011; SALOMÃO et al., 2017; TANIGUCHI et al., 2020; VARGAS et al., 2020). No entanto, não há relatos de estudos in vitro para *B. exilata* Deble & Marchiori. Já para *B. lallemanti* Deble & Marchiori e *B. odorata* (Barb.Rodr.) Noblick e os únicos estudos voltados para conservação em longo prazo foram reportados por Taniguchi et al. (2020).

Considerando a escassez de estudos, a necessidade de implementar protocolos para criopreservação e a ameaça de extinção de espécies do gênero *Butia*, no estado do Rio Grande do Sul, o presente trabalho objetivou adaptar protocolos da cultura de tecidos, para otimizar a conservação ex situ.

2 Referencial teórico

2.1 Gênero *Butia*

O gênero *Butia* (Becc.) Becc. (Arecaceae) apresenta espécies nativas do Brasil com alto potencial agroindustrial, pertencendo à subtribo *Buttinae*, tribo *Cocoeae*, representado por palmeiras com disposição ascendente dos folíolos, formando uma letra “V” em corte transversal, e pela presença de poros no endocarpo (MARCATO, 2004). Compreende 23 espécies encontradas na América do Sul em áreas das regiões Nordeste (BA), Centro-Oeste (GO, MS), Sudeste (MG, SP) e Sul (PR, SC, RS) do Brasil, no leste do Paraguai, no nordeste da Argentina e no Uruguai (MARCATO, 2004; LORENZI et al., 2010; ELLERT-PEREIRA et al., 2016; ESLABÃO et al., 2016; ESLABÃO, 2017; HEIDEN et al., 2022; SANT’ANNA-SANTOS, 2021).

O butiazeiro pode ocorrer em áreas abertas, desde campos e cerrados até dunas e restingas, sendo comum encontrar os butiazais ou palmares, como populações agregadas, densas e extensas (REITZ, 1974; MARCATO, 2004). Os frutos podem ser utilizados na fabricação de sucos, sorvetes e picolés, e devido às suas características ornamentais o butiazeiro tem ampla procura (MARTINS, 2003; MOURA, 2008; GEYMONAT; ROCHA, 2009).

O uso dos frutos ocorre principalmente pelos grupos de extrativistas e artesãos para a elaboração de produtos à base de frutos e folhas de butiá, que são comercializados por pequenas agroindústrias locais. As características ornamentais aliadas à resistência a baixas temperaturas fazem com que algumas espécies sejam utilizadas na composição de jardins, parques, praças, ruas e avenidas tanto na área urbana como rural (ZAMBRANA et al. 2007; RIVAS et al., 2014).

No entanto, tanto o emprego paisagístico e o uso medicinal, quanto à constituição de pomares são limitados pela dificuldade de produção comercial de mudas, pois a maioria das palmeiras apresenta a reprodução sexuada como única forma de propagação (LORENZI, 2004; GEYMONAT; ROCHA, 2009). Além disso, a germinação das sementes é lenta, baixa e desuniforme. afetando

cerca de 25% das espécies de palmeiras. O período para germinação é superior a 100 dias, podendo alcançar um ano e, a germinação total, menor que 20% (TOMLINSON, 1990; FERNANDES, 2008; MOURA, 2008).

Algumas espécies apresentam dormência, mecanismo que impede a germinação de sementes viáveis mesmo quando colocadas em condições favoráveis (MARCOS FILHO, 2005). Os butiás decompõem-se em poucos dias apresentando dificuldade para sua comercialização in natura. Esta alta perecibilidade dos frutos é caracterizada pelas elevadas taxas respiratórias, sendo necessário o imediato resfriamento a 0°C de frutos colhidos no estágio de maturação verde-amarelo, visando preservar a sua qualidade pós-colheita (BUENO et al. 2002; MEGGUER, 2006).

Em geral, as espécies de *Butia* possuem alto potencial medicinal devido aos compostos bioativos e propriedades antioxidantes, aumentando o interesse pelos frutos nativos. Esse interesse incentiva a propagação em larga escala estimulando o consumo in natura, pesquisas sobre composição química, características dos frutos e a conservação dessas espécies (TONIETTO et al., 2008).

Atualmente, no estado do Rio Grande do Sul ocorrem oito espécies do gênero *Butia*, sendo que três espécies (*B. exilata* Deble & Marchiori, *B. eriospatha* Becc. e *B. yatay* (Mart.) Becc.) ocorrem no Bioma Mata Atlântica e seis espécies (*B. catarinenses* Noblick & Lorenzi, *B. lallemantii* Deble & Marchiori, *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick, *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) L.H.Bailey, *B. witeckii* K. Soares & S. J. Longhi e *B. yatay*) ocorrem no Bioma Pampa (ESLABÃO et al., 2015) (Figura 1).

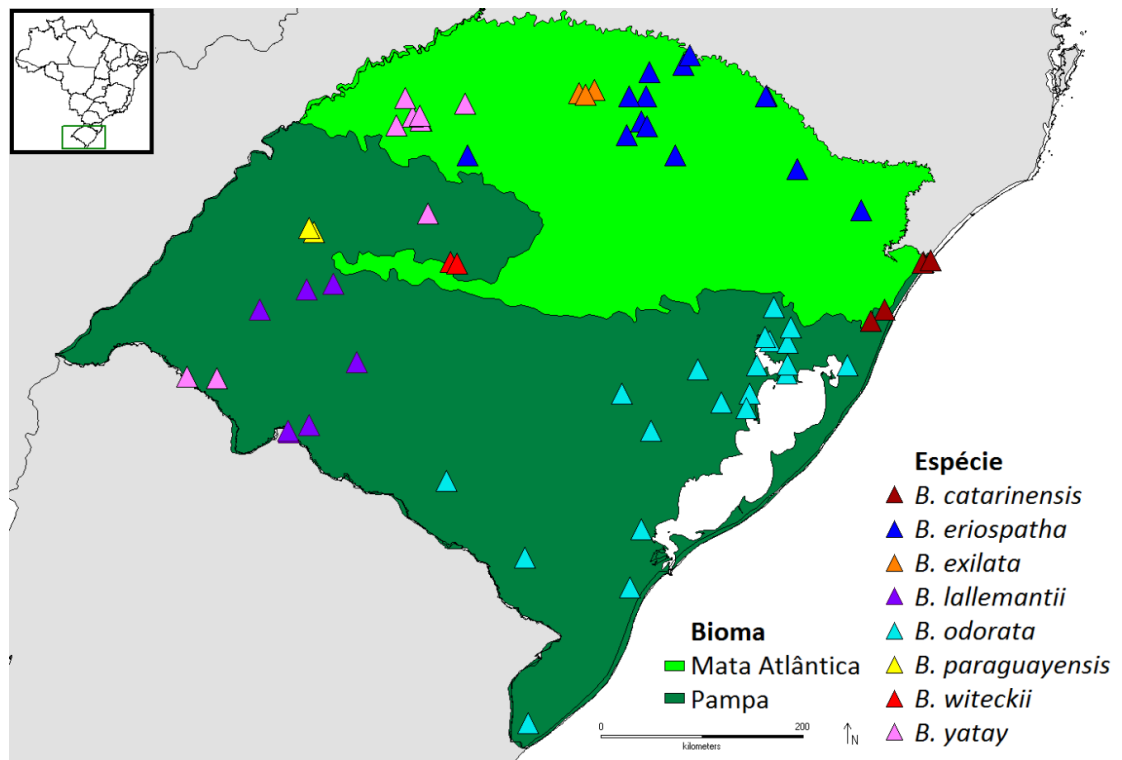


Figura 1: Distribuição geográfica das espécies de *Butia* nos Biomas Mata Atlântica e Pampa no Rio Grande do Sul.

Fonte: ESLABÃO et al., 2015.

Cabe evidenciar que as espécies deste gênero encontram-se constantemente ameaçadas devido à degradação do seu habitat natural pela agricultura intensiva, desmatamento, extrativismo predatório e formação de pastagens, o que limita o estabelecimento de bancos de sementes, sendo que butiazais vastos se tornam cada dia mais raros (MERCADANTE et al., 2006; BARBIERI et al., 2015).

Algumas espécies estão listadas entre as ameaçadas de extinção da flora silvestre do Rio Grande do Sul, como é o caso de *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick, *B. lallemantii* (Deble & Marchiori.) e *B. exilata* Deble & Marchiori, (SEMA, 2016; ESLABÃO et al., 2016) sendo de interesse para estudos de manutenção e conservação da biodiversidade do estado do Rio Grande do Sul, além de produção em larga escala, seja para uso paisagístico, consumo in natura ou mesmo comercialização de produtos derivados dos frutos.

2.1.1 *Butia lallemantii* (Deble & Marchiori)

B. lallemantii, conhecida como buitá-anão ou butiazeiro-anão, já foi considerada um ecotipo de *B. paraguayensis* (Barb. Rodr.) L.H. Bailey e, apenas no ano de 2006, foi apresentado como nova espécie. Endêmica do Rio Grande do Sul mostra-se importante para os campos gaúchos que são prejudicados pelo fenômeno da arenização, já que *B. lallemantii* integra elevada quantidade de matéria orgânica no solo, o que auxilia a colonização dessas áreas por outras plantas mais exigentes (FREITAS; RIBEIRO; ALVES, 2010). Atualmente sua ocorrência se restringe a pequenos palmares isolados.

É uma palmeira de porte pequeno, cespitosa, com o estipe com até 1 m de comprimento, 25 cm de diâmetro. Possui folhas pinadas e apresenta flores amarelas ou arroxeadas; estaminadas. Seus frutos são alongados, amarelos, alaranjados ou vermelhos quando maduros, com 2,5–3,5 cm de comprimento, tendo um mesocarpo succulento e carnososo. Frutifica durante todo ano, porém, é mais abundante no verão (SOARES et. al, 2014). Atualmente, é uma espécie ameaçada pela expansão das lavouras de soja e monocultura de árvores exóticas (SOARES et. al., 2014), (Figuras 2 e 3).

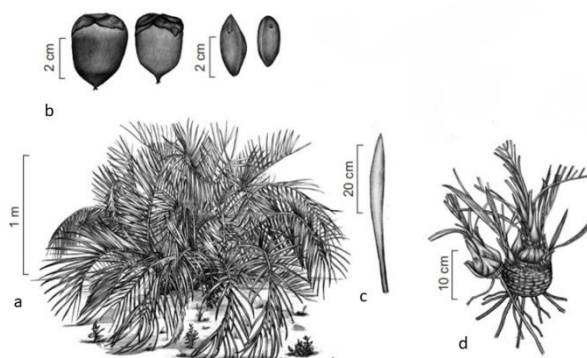


Figura 2: *Butia lallemantii* Deble & Marchiori – a. hábito; b. detalhe dos perfolhos em indivíduo jovem; c. espata glabra; d. frutos; e. endocarpo. (K. Soares & Witeck 37, g –K. Soares)
Fonte: SOARES et. al., 2014



Figura 3: *Butia lallemantii* Deble & Marchiori, Rio Grande do Sul, Brasil

Fonte: Marisa Taniguchi

2.1.2 *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick

B. odorata apresenta-se com grande interesse alimentício e potencial comercial. Com porte de oito a dez metros, podendo atingir até 20 metros, possui estipe simples, as folhas são pinadas, acinzentadas. O fruto é uma drupa carnosa, com uma a três sementes. Esta variação geralmente é diretamente proporcional ao diâmetro do endocarpo (PEDRON; MENESES; MENESES, 2004; GEYMONAT; ROCHA, 2009; LORENZI et al., 2010). Dentre as espécies ocorrentes no Pampa, *B. odorata* é a mais amplamente distribuída (ESLABÃO et al., 2015).

Sua floração ocorre nos meses de primavera e verão e a maturação dos frutos no verão e outono. É uma espécie monoica e apresenta inflorescências interfolares e uma bráctea peduncular com ápice agudo, com flores unissexuadas amarelas, esverdeadas ou arroxeadas. Os frutos com tamanho variáveis, geralmente mais largos do que compridos, mesocarpos doce-

acidulados, sendo o epicarpo amarelo, alaranjado, avermelhado ou púrpura quando maduro (PEDRON; MENESES, 2004; GEYMONAT; ROCHA, 2009; LORENZI et al., 2010; SOARES et al, 2014), (Figuras 4 e 5).

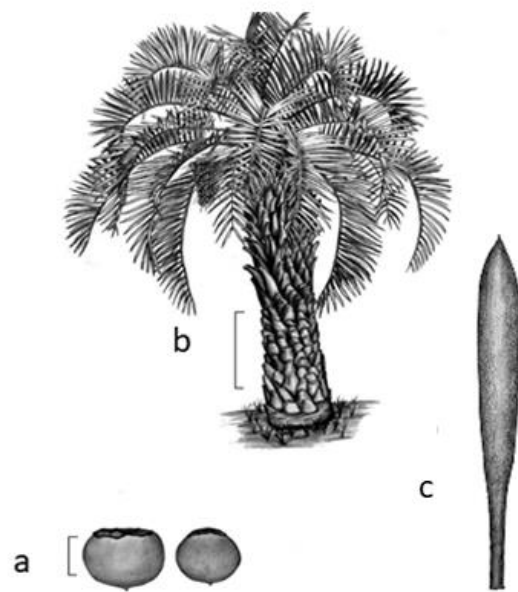


Figura 4: *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick – a. frutos; b. hábito; c. formato da espata fechada; (K. Soares 38 -2.5 HDCF; Lorenzi et al. -6837 HPL).
Fonte: SOARES et. al., 2014



Figura 5. *Butia odorata* (Barb. Rodr.), Rio Grande do Sul, Brasil.

Fonte: Marisa Taniguchi

2.1.3 *Butia exilata* Deble & Marchiori

A espécie é endêmica do estado do Rio Grande do Sul e restrita a uma pequena área, o número de populações é baixo e o número de indivíduos adultos é reduzido (ESLABÃO et al., 2016), o que dificulta a obtenção de material vegetal. Além disso, os poucos indivíduos remanescentes encontram-se em áreas de faixa de domínio sob forte influência de herbicidas, utilizados na cultura da soja, a espécie é avaliada como criticamente ameaçada de extinção (ESLABÃO et al., 2016). O tamanho da população está estimado em menos de 250 indivíduos maduros e com um declínio contínuo observado, projetado ou inferido, no número de indivíduos maduros e pela estrutura populacional com nenhuma subpopulação com mais de 50 indivíduos maduros (IUCN, 2013) (Figuras 6 e 7).

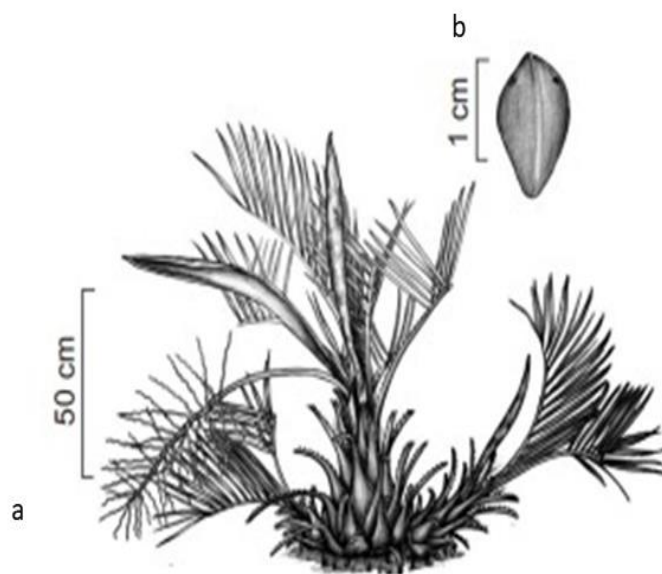


Figura 6 – *Butia exilata* Deble & Marchiori – a. Hábito com folhas parcialmente removidas mostrando a espata com indumento externo; b. endocarpo
Fonte: SOARES et. al., 2014



Figura 7. *Butia exilata* Deble & Marchiori –, Rio Grande do Sul, Brasil.
Fonte: Marisa Taniguchi.

3 Materiais e métodos

3.1 Material vegetal

Sementes e espatas de *Butia* oriundas de três espécies foram utilizadas: *Butia odorata* (Fazenda São Miguel - Tapes/RS), armazenados por 12 meses em câmara fria, *Butia lallemantii* (Alegrete/RS) e *Butia exilata* (Ronda Alta/RS), armazenados por seis meses em câmara fria. A coleta dos frutos foi realizada com tesoura de poda ou podão de acordo com a espécie (Figura 8).



Figura 8 Coleta de *Butia odorata* (Barb.Rodr.) Noblick (Areaceae), Fazenda São Miguel - Tapes/RS, área de conservação in situ da espécie.
Fonte: Marisa Taniguchi.

Os cachos de frutos foram ensacados, etiquetados e beneficiados no Laboratório de Cultura de Tecidos, da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Figura 9 A e B).



Figura 9 (A e B): Frutos de *Butia* sp. (Arecaceae), Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Os frutos foram selecionados de acordo com o estágio de maturação. Posteriormente, despulpados manualmente, lavados em água corrente, os diásporos foram colocados em bandejas com papéis toalha e em ambiente fresco por 24 horas. Após esse período, permaneceram em estufa a 30°C, por uma semana. Os diásporos foram armazenados em câmara fria, a 5°C até a realização dos experimentos (Figuras 10, 11, 12).

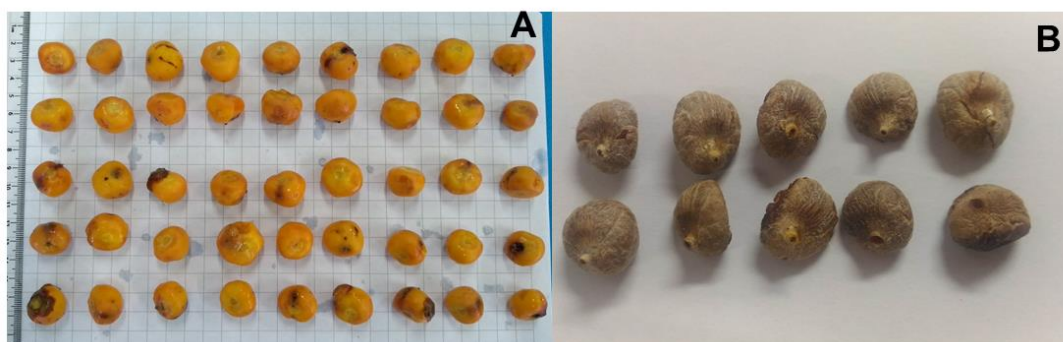


Figura 10: **A** - Frutos; **B** - sementes de *Butia odorata* (Barb.Rodr.) Noblick (Areaceae), Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.

Fonte: Marisa Taniguchi.



Figura 11: **A** - Frutos; **B** - sementes de *Butia lallemantii* Deble & Marchiori (Arecaceae), Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.

Fonte: Marisa Taniguchi.



Figura 12: **A** - Frutos; **B** - sementes de *Butia exilata* Deble & Marchiori (Arecaceae), Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Para testar as estratégias de conservação ex situ escolhidas nesse trabalho, os experimentos foram divididos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Experimentos para validação das estratégias de conservação do gênero *Butia* (Arecaceae).

Experimento (Técnicas adaptadas)	Espécie	Material vegetal (Propágulo)
Germinação:	<i>Butia exilata</i>	Embriões zigóticos
Via o resgate de embriões;	<i>Butia lallemanti</i>	
	<i>Butia odorata</i>	
Organogênese:	<i>Butia exilata</i>	Finas camadas de células
Via TCLs;	<i>Butia lallemanti</i>	do conjunto de tecidos da
	<i>Butia odorata</i>	lígula;
		Folhas
Criopreservação:	<i>Butia exilata</i>	Embriões
Vitrificação;	<i>Butia lallemanti</i>	Sementes
Droplet vitrificatio;	<i>Butia odorata</i>	Diásporos
Encapsulamento e vitrificação;		

3.2 Cultivo in vitro de embriões

3.2.1 Assepsia das sementes

Os diásporos foram quebrados com torno manual de bancada para retirada das sementes (Figuras 13 e 14).

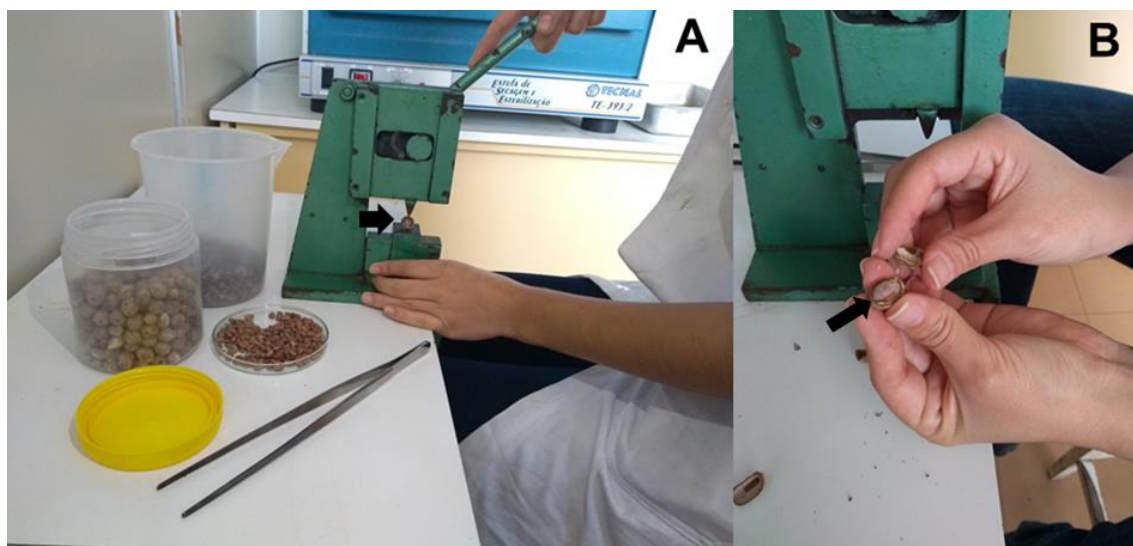


Figura 13: Procedimento de quebra de diásporos de *Butia* sp. (Arecaceae). **A** - Diásporos de *Butia* sendo quebrados em torno manual indicação com as setas; **B**- Diásporo aberto após quebrar, semente indicada com a seta - Embrapa Clima Temperado- Pelotas/RS.
Fonte: Marisa Taniguchi.



Figura 14: Diásporos (ponta da seta) e sementes (seta) de *Butia* sp. (Arecaceae). **A** - *Butia odorata*; **B** - *Butia lallemantii* e **C** - *Butia exilata*. Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.
Fotos: Marisa Taniguchi.

Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2,5 % de cloro ativo e ácido dodecilbenzenosulfônico por 20 minutos em capela de fluxo laminar. Após, foram imersas em Tecsa-Clor® (Dióxido de Cloro), durante 5 minutos e submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada, adaptado de Vargas et al. (2020).

3.2.2 Resgate de embriões zigóticos

Após a assepsia das sementes os opérculos foram removidos com auxílio de lâmina e bisturi em câmara de fluxo laminar. As sementes foram embebidas por 30 minutos em água destilada autoclavada, contendo PPM 1mL^{-1} para o resgate dos embriões (Figuras 15 e 16). Os embriões zigóticos foram excisados e, posteriormente, inoculados em MS 75% (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado 40 g L^{-1} de sacarose e solidificado com Phytigel (2,5%), acrescido de carvão ativado $2,0\text{ g L}^{-1}$ e PVP 1 g L^{-1} , mais $0,1\text{ g L}^{-1}$ de inositol, 1 mL^{-1} de PPM, suplementado com concentrações variadas de 2,4-D ($0,0$; $2,25$; $4,5$; $6,75$ e $9,00\text{ }\mu\text{M L}^{-1}$) e o pH do meio foi ajustado para $5,8\pm 1$ antes da autoclavagem a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos.

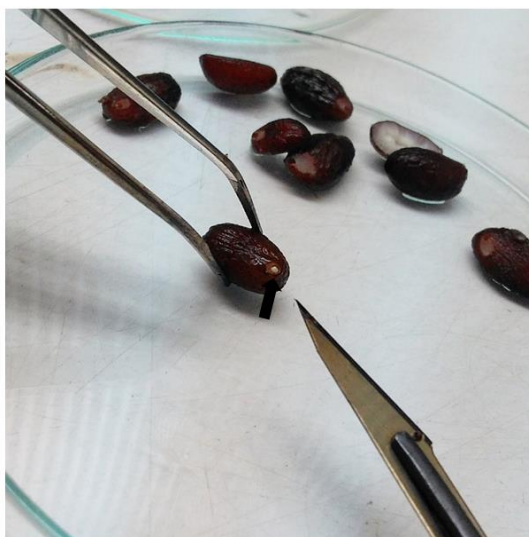


Figura 15: Sementes de *Butia odorata*, com o embrião exposto (seta)
Fotos: Marisa Taniguchi.

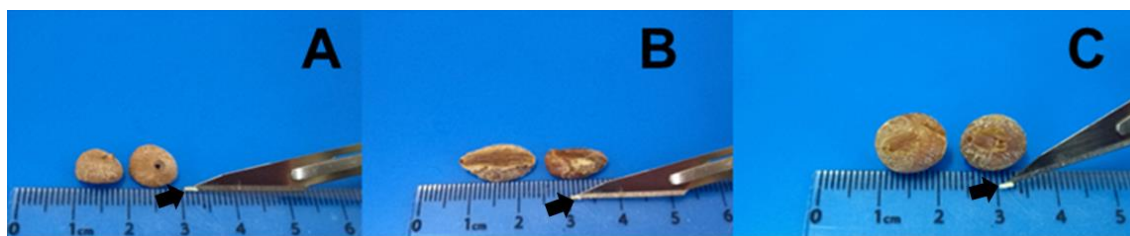


Figura 16: Sementes e embriões extraídos (seta) de *Butia*. **A** - *Butia odorata*; **B** - *Butia lallemantii* e **C** - *Butia exilata*. Embrapa Clima Temperado - Pelotas/RS.
Fonte: Marisa Taniguchi.

Os embriões foram cultivados sete dias no escuro e, posteriormente, mantidos sob luz em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com irradiância de fótons de $36\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por três tubos, contendo um embrião em cada tubo. Aos 30 dias, avaliou-se a porcentagem de germinação, comprimento de parte aérea e de raiz.

Para o percentual de germinação realizou-se a contagem de plântulas normais observadas conforme recomendações para monocotiledôneas (BRASIL, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com parcelas subdivididas segundo fatorial 1 x 5 (1 espécie x 5 tratamentos, concentrações de 2,4-D).

Tabela 2: Tratamentos para germinação do embrião zigótico.

Tratamento uso de 2,4-D no meio de cultura
T1 - Controle - 2,4-D (0,0)
T2 - 2,4-D ($2,25\ \mu\text{M L}^{-1}$)
T3- 2,4-D ($4,50\ \mu\text{M L}^{-1}$)
T4 - 2,4-D ($6,75\ \mu\text{M L}^{-1}$)
T5 - 2,4-D ($9,00\ \mu\text{M L}^{-1}$)

3.3 Organogênese via Thin Cell Layer (TCL)

Foram utilizados explantes foliares com aproximadamente 1 mm e explantes do conjunto de tecidos da lígula com aproximadamente 0,5 mm (originados de plântulas germinadas in vitro a partir de sementes). Para o explante da lígula, foram retiradas as folhas, raízes, tecido haustorial e a bainha foliar verde mais externa das plantas. O tecido remanescente foi seccionado transversalmente em fatias de 0,25–0,5 mm para obter diferentes camadas histogênicas. Assim, aproximadamente 10 cortes transversais, foram obtidos de uma plântula e inoculados em placa de Petri, sendo os explantes divididos aleatoriamente, para cada tratamento. Foram quatro repetições, constando de

uma placa cada, cada placa contendo 10 explantes. A orientação original do explante foi mantida (Figura 17 e 18).

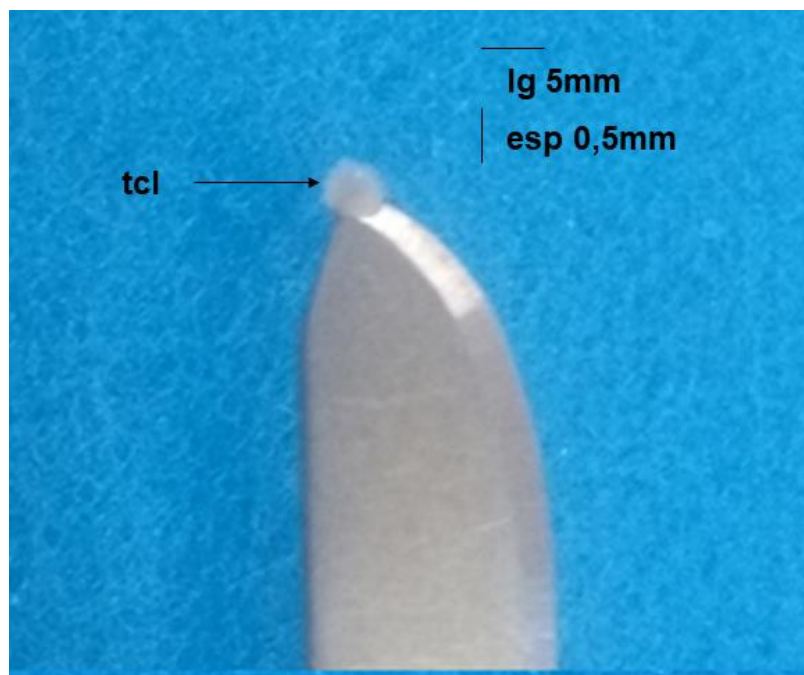


Figura 17: Finas camadas de células TCLs com 0,5 mm da lígula de *Butia* sp.(Arecaceae).

Fonte: Marisa Taniguchi.

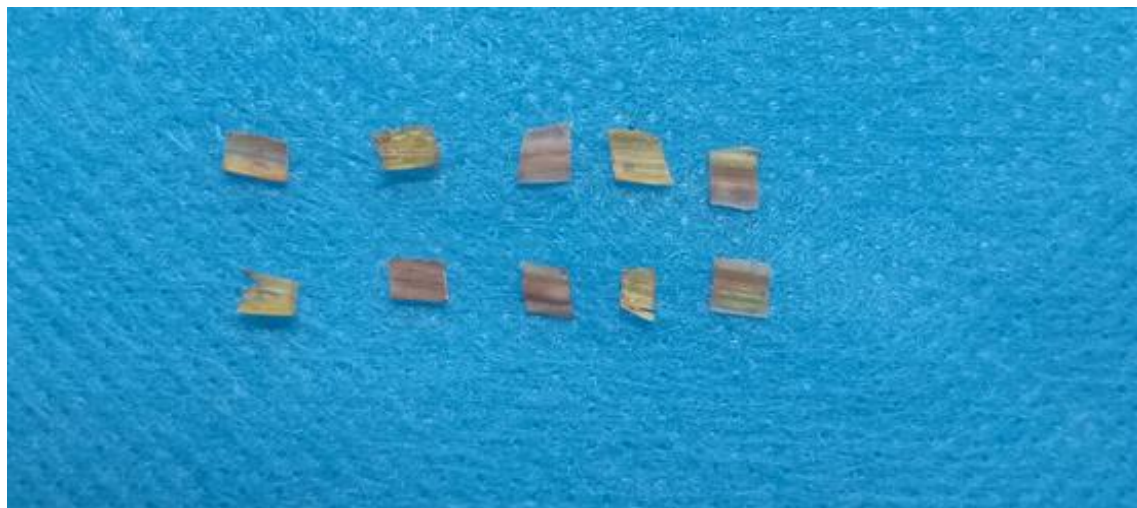


Figura 18: Explantes foliares com 3 mm de *Butia* sp. (Arecaceae).

Fonte: Marisa Taniguchi.

As TCLs de *B. odorata*, *B. lallemanti* e *B. exilata* foram inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido com 30 gL⁻¹ sacarose; 1,0 gL⁻¹ de PVP, gelificado com 2,5 gL⁻¹ de Phytigel, adicionado 0,1 gL⁻¹ de Inositol, 2,0 gL⁻¹ de

carvão ativado; 250 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D; 0,5 g L^{-1} de glutamina e diferentes concentrações de silício (0,0; 35, 60; 71,20 e 106,80 $\mu\text{M L}^{-1}$). Após a inoculação, as placas foram mantidas em BOD por sete dias na temperatura de 35°C, e depois, transferidas para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

As observações foram realizadas a cada três dias nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 (Tabela 3). Aos 20 dias foi avaliada a formação de parte aérea, formação de raízes e entumescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, por espécie, em parcelas subdivididas, segundo fatorial 2 x 5 (2 explantes x 4 tratamentos, 1 controle e 3 concentrações de silício).

Tabela 3: Tratamentos para organogênese via TCLs

Tratamento: Uso de silício no meio de cultura
T1 - Controle - silício (0,0)
T2 - Silício (35,60 $\mu\text{M L}^{-1}$)
T3- Silício (71,20 $\mu\text{M L}^{-1}$)
T4 - Silício (106,80 $\mu\text{M L}^{-1}$)

Para os experimentos com finas camadas de células (TCLs), os cortes foram distribuídos aleatoriamente pelos tratamentos. Assim, cada propágulo teve seus explantes divididos para todos os tratamentos. As condições de luz, em prateleiras e câmaras de crescimento com iluminação e temperatura controlada (BODs) foram também observadas, sendo o material distribuído aleatoriamente e com posicionamento trocado, semanalmente para evitar influência desses fatores.

3.3.1 Análises anatômicas dos explantes da organogênese via TCLs

Os propágulos cultivados in vitro foram coletados a cada três dias e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), modificado com a utilização de tampão fosfato pH 7,2, desidratadas em série etílica ascendente e infiltradas em resina plástica segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo (ANCAP), com navalha descartável. As secções com 5 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) em tampão fosfato e citrato (MCILVAINE, 1921) pH 4,5 e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck®).

A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir de lâminas usando câmera Leica® DC 300F acoplada ao microscópio Leica®DM LB. E para captura das imagens provenientes das amostras de cultivo in vitro aspecto da morfologia externa foi utilizado estereomicroscópio ZEISS-AXIO com câmera acoplada AXIOCam. As análises anatômicas e morfológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal - Departamento de Botânica, Instituto de Biologia (UFPEL) e no Laboratório de Zoologia de Invertebrados - Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia (UFPEL).

3.4 Criopreservação

3.4.1 Assepsia das sementes

Os diásporos foram quebrados com torno manual de bancada para retirada das sementes. Em seguida, dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2,5 % de cloro ativo e ácido dodecilbenzenosulfônico por 20 minutos. Após, foram imersas em Tecsclor® (Dióxido de Cloro), durante 5 minutos e submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada, adaptado de Vargas et al. (2020) e Taniguchi et al. (2020).

3.4.2 Resgate de embriões e pré-cultivo

Após a assepsia, as sementes ficaram por 30 minutos embebidas em água destilada autoclavada, posteriormente os opérculos das sementes foram removidos com auxílio de lâmina e bisturi em capela de fluxo laminar, para o resgate dos embriões. Os embriões resgatados foram pré-cultivados em meio de cultivo (MS 75% com carvão ativado, 2 gL^{-1} ; 1 gL^{-1} de PVP; 1 mL^{-1} de PPM; $0,1\text{ gL}^{-1}$ de Inositol; 3 M de sacarose; $4,5\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D e Phytigel $2,5\text{ gL}^{-1}$) por 20 horas.

3.4.3 Adaptação da Droplet vitrification

Os embriões foram retirados do meio de pré-cultivo (item 3.4.2) e tratados com solução de carregamento (LS: 4, 4g MS + Vitaminas MS, 137g sacarose e 146 ml de glicerol) por 20 minutos, antes da imersão nos tratamentos com soluções crioprotetoras (PVS2; PVS2+1% Floroglucinol; PVS3 e PVS3+1% Floroglucinol) a 0°C , 40 minutos. Todas as soluções foram dissolvidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o pH foi ajustado para $5,8\pm 1$ antes da microfiltração (Figura 19).

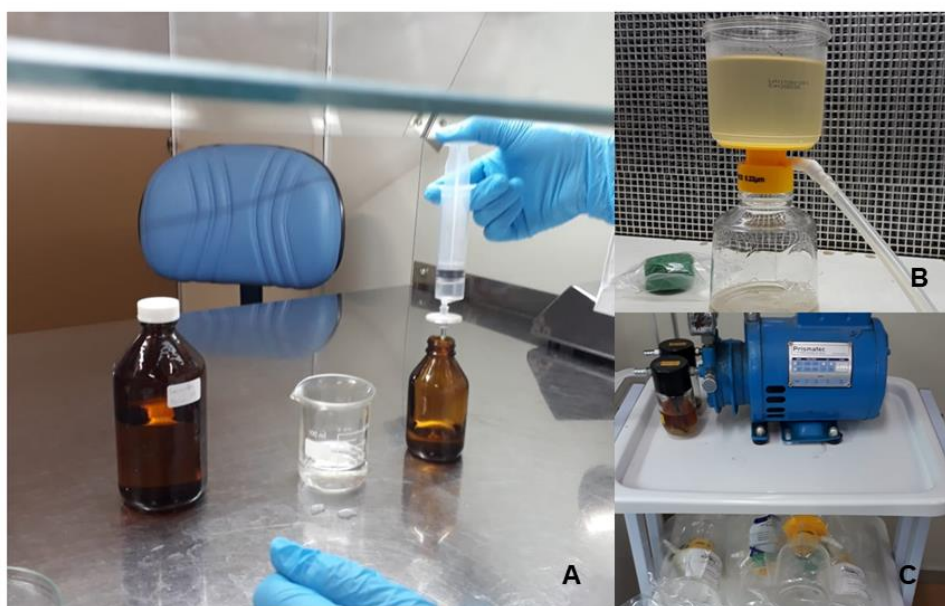


Figura 19: Soluções crioprotetoras; **A** - Filtragem manual com filtro milipore; **B** - Filtro descartável estéril e solução de crioproteção; **C** – Bomba a vácuo.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Após o tratamento em soluções crioprotetoras, os embriões foram dispostos em tiras de papel alumínio (0,5 x 2,0 cm) contendo uma gota de solução crioprotetora, acondicionados em criotubos, antes da imersão em nitrogênio líquido, onde permaneceram por 2 horas. Após esse período, o reaquecimento foi realizado em banho-maria e temperatura de 38 °C por três minutos (Figura 20) e foram reaquecidos por 15 minutos em solução de descarregamento (RS: 4,4 g MS + Vitaminas MS, 410, 6 g sacarose) à temperatura ambiente, adaptado de (PANIS;PIETTE; SWENNEN, 2005; TANIGUCHI et al., 2020)

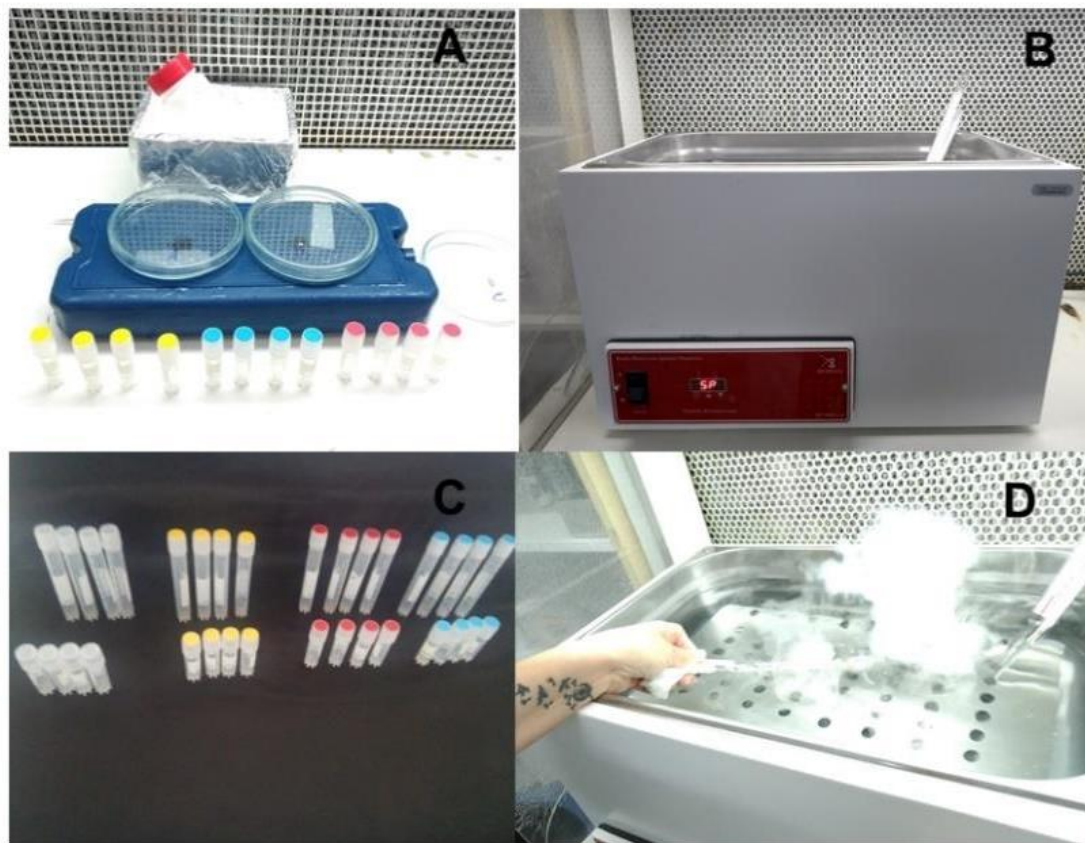


Figura 20: Etapa de descongelamento. **A** - Criotubos e solução crioprotetora PVS2; **B** - Banho Maria; **C** - Criotubos separados por tratamento; **D** – Descongelamento. Embrapa Clima Temperado /RS, 2019.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Após o descongelamento, os embriões foram inoculados em meio de pós-cultivo (MS + 0,3 M de sacarose) e mantidos por aproximadamente 20 horas no escuro e, posteriormente, inoculados em meio de cultivo para germinação e

foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$.

A porcentagem de germinação foi avaliada aos 30 dias de cultivo.

Tabela 5: Composição das soluções crioprotetoras.

Identificação	Tratamento	Composição
T1	Controle	Sem solução.
T2	PVS2	Composto de 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% dimetil sulfóxido e 0,4 M de sacarose.
T3	PVS2 modificado	PVS2 + 1% de floroglucinol.
T4	PVS3	Composto de 50% de glicerol, 50 % de sacarose, diluído em água destilada.
T5	PVS3 modificado	PVS3 + 1% de floroglucinol

Foram utilizadas 3 repetições, cada repetição constituída por uma placa contendo 10 embriões cada (Figura 21). As espécies não foram comparadas entre si e, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas segundo Fatorial 1 x 5 (1 espécie x 5 tratamentos; 1 controle e 4 soluções crioprotetoras – (PVS2; PVS2+1% Floroglucinol; PVS3 e PVS3+1% Floroglucinol).



Figura 21: Placas com meio de cultura. Embrapa Clima Temperado /RS, 2019
Fonte: Marisa Taniguchi.

3.4.4 Adaptação do Encapsulamento-Vitrificação

Os embriões foram retirados do meio de pré-cultivo, adicionadas à matriz de alginato de sódio 3,5% (w/v), para a confecção das unidades encapsuladas. A composição da matriz de encapsulamento foi constituída por alginato de sódio, dissolvida em água destilada MS 75% (MURASHIGE; SKOOG, 1962), complementado com 2,4-D ($2,25 \mu\text{M L}^{-1}$), acrescido de sacarose ($40,0 \text{ g L}^{-1}$), inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$); 1 mL^{-1} de PPM e PVP - polivinilpirrolidona ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e 1 g L^{-1} de carvão ativado. Em seguida, os embriões foram resgatados individualmente e gotejados em solução de cloreto de cálcio (100 mM) por 20 minutos para complexação, imersos em água destilada autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio e descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos, lavados em triplicata com água destilada autoclavada, desidratados em sílica gel de acordo com os tratamentos da Tabela 6. As cápsulas foram imersas em solução de carregamento por 20 minutos (LS: 4, 4g MS + Vitaminas MS, 137g sacarose e 146 ml de glicerol), antes da imersão em PVS2 (Solução 2 de vitrificação, que consiste em $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol, em meio contendo os sais minerais do MS), pH 5,8, a 0°C , por 40 minutos.

Após o tratamento com PVS2, as cápsulas foram inseridas em tubos de criopreservação de 10 mL e imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram de 7 dias. O reaquecimento foi realizado em banho-maria e temperatura de 38 °C por três minutos e, em seguida, as cápsulas foram, imersas em solução de descarregamento a 25 °C por 15 minutos. As cápsulas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 $\pm$ 2°C adaptado (TANIGUCHI et al. 2020). Foram utilizados para cada tratamento 4 parcelas, compostas por 4 placas de Petri contendo 10 embriões encapsulados. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de germinação dos embriões encapsulados

Tabela 6: Desidratação para adaptação do protocolo de encapsulamento-vitrificação
Tratamento: diferentes tempos de desidratação em sílica gel

T1 – Controle - Embriões, encapsulados e inoculados no meio de cultivo
T2 – Embriões encapsulados – criopreservados
T3 - Embriões encapsulados - desidratados em sílica 15 mn - criopreservados
T4 - Embriões encapsulados – desidratados em sílica 30 mn - criopreservados
T5 - Embriões encapsulados – desidratados em sílica 60 mn - criopreservados

3.4.5 Adaptação da Vitrificação

Diásporos de *B. odorata* e *B. lallemantii* armazenados por 12 e 6 meses, respectivamente, em câmara fria, foram divididos em 4 tratamentos (Tabela 7). O experimento foi adaptado de acordo com Salomão et al., (2017), Vargas et al. (2020) e Taniguchi et al. (2020).

Tabela 7: Tratamentos para adaptação do protocolo de vitrificação para criopreservação.

Tratamento: De acordo com o tipo de propágulo para criopreservar

T1 – Controle- Os embriões foram resgatados e inoculados no meio de cultivo
T2 - Embriões foram resgatados, colocados em crio tubo e criopreservados em NL
T3 - Sementes embaladas e criopreservadas em NL
T4 - Diásporos embalados e criopreservados em NL

No tratamento T1, as sementes foram embebidas por trinta minutos em água destilada autoclavada e os embriões resgatados e inoculados em meio de cultivo (MS 75% (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 2,4-D ($4,5 \mu\text{ML}^{-1}$); sacarose (40 gL^{-1}); inositol ($0,1 \text{ gL}^{-1}$); PPM (1 mL^{-1}); carvão ativado ($2,0 \text{ gL}^{-1}$); PVP (1 gL^{-1}) e solidificado com Phytigel ($2,5 \text{ g L}^{-1}$)).

No tratamento T2, as sementes foram embebidas por trinta minutos em água destilada autoclavada e os embriões resgatados e colocados em criotubos de 10 ml, com posterior resfriamento por imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C).

Nos tratamentos T3 e T4, as sementes e diásporos passaram uma breve assepsia, com água destilada e autoclavada em Twim 20[®], secos com papel filtro em temperatura ambiente por 20 horas, posteriormente, acondicionados em sacos plásticos aluminizados, vedados com Parafilm, foram congelados rapidamente por imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C). Aos 30 dias de criopreservação, as amostras T2, T3 e T4 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 criopreservação, os embriões (Tratamento 2) foram inoculados diretamente em meio de cultivo para germinação; as sementes (Tratamento 3), foram embebidas por 30 minutos em água destilada autoclavada, com 1 mL^{-1} de PPM, com os embriões excisados e inoculados em meio de cultivo para germinação; os diásporos (Tratamento 4) foram rompidos em torno manual, as sementes removidas e desinfestadas conforme protocolo citado anteriormente para resgate de embriões. Após a assepsia, as sementes foram embebidas por 30 min. em água destilada autoclavada, com 1 mL^{-1} de PPM. Posteriormente, os embriões foram excisados e inoculados em meio de cultivo para germinação. Os cultivos ficaram no escuro por 7 dias e foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Aos 30 dias, a porcentagem de germinação dos embriões foi avaliada.

Os tratamentos foram organizados com 5 repetições constituídas cada uma, por um frasco, contendo cinco embriões cada frasco. 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%.

3.4.6 Aclimatização

As plântulas enraizadas, obtidas da criopreservação, foram transferidas para bandejas de isopor, preenchido com substrato comercial Plantmax® e acondicionadas sobre estrutura coberta com plástico transparente durante 30 dias, quando foi retirada a cobertura plástica. Foram utilizadas 30 repetições para cada espécie. A taxa de sobrevivência foi avaliada aos 45 dias, a partir de 30 repetições para cada espécie.

4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por espécie e por experimento, não houve comparação entre as espécies. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados não paramétricos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® comparando as frequências pelo teste exato de Tukey com probabilidade de 5%. Já os dados paramétricos, foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011), comparando as frequências pelo teste de Skott-knott com probabilidade de 5%.

5 Resultados e discussão

5.1 Germinação e cultivo in vitro

O cultivo in vitro dos embriões das três espécies de *Butia* apresentaram desenvolvimento não homogêneo (Figura 22).



Figura 22: Embriões de *B. odorata*, inoculados no mesmo dia e coletados aos 30 dias cultivo in vitro, evidenciando que não houve homogeneidade no desenvolvimento

Fonte: Marisa Taniguchi.

O desenvolvimento das plântulas de *Butia*, assim como a germinação não homogênea (TANIGUCHI et al., 2020), é relatado para embriões de palmeiras, característica relacionada ao estágio de maturação dos embriões. Cada embrião é um indivíduo único, apresentando assim uma resposta fisiológica diferente, mesmo diante da ação dos reguladores de crescimento, como as auxinas.

O resgate do embrião das espécies do gênero *Butia*, rompe barreiras físicas que influenciam a dormência e retarda a germinação. Ao inocular o embrião em meio de cultivo, contendo fontes de carbono, auxina, sais minerais e vitaminas, permite-se o desenvolvimento e amadurecimento dos embriões em menor tempo. No meio de cultura utilizado, fez-se o uso de concentrações de auxina, o que possivelmente induziu o alongamento celular e, portanto, pode ter auxiliado desenvolvimento do eixo embrionário. (ALMEIDA et al., 2015). Além disso, as auxinas por serem relacionadas com a permeabilidade das membranas, o que envolve o crescimento de plântulas, podem auxiliar também,

na biossíntese de giberelinas em alguns estádios de desenvolvimento, como na ativação do crescimento vegetativo do embrião e no enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Nesse trabalho verificou-se que entre os nove e 18 dias ocorreu a protrusão da radícula, assim como a formação da parte área. No entanto, houve diferenças entre as espécies de *Butia*, que podem estar relacionadas ao estágio de maturação dos embriões. O tratamento T3 (4,5 µM de 2,4-D) mostrou o melhor resultado de germinação nas três espécies, sendo 93% para *B. odorata* e 80% tanto para *B. lallemantii* e *B. exilata* (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8: Porcentagem de germinação, comprimento de parte área (CPA) e comprimento de raízes (CR) de embriões de *B. odorata* inoculados em meio de cultivo MS, com diferentes concentrações de 2,4-D.

2,4-D (µM)	Germinação (%)	CPA (cm)	CR (cm)
0,0	47% b	0,78 n*	2,20 b
2,25	33% b	0,88	5,64 a
4,50	93% a	0,36	0,72 b
6,75	33% b	0,67	2,68 ab
9,00	33% b	0,70	3,00 ab
CV (%)	21,94	77,46	59,33

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. n* não significativo

Tabela 9: Porcentagem de germinação, comprimento de parte área (CPA) e comprimento de raízes (CR) de embriões de *B. lallemantii*, inoculados em meio de cultivo MS, com diferentes concentrações de 2,4-D.

2,4-D (uM)	Germinação (%)	CPA (cm)	CR (cm)
0,0	33% b	0,16 b	1,34 n*
2,25	33% b	0,92 a	0,46
4,50	80% a	0,64 ab	0,12
6,75	40% b	0,32 ab	1,10
9,00	6% b	0,16 b	0,20
CV (%)	50,27	74,20	163,42

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. n* não significativo

Tabela 10: Porcentagem de germinação, comprimento de parte área (CPA) e comprimento de raízes (CR) de embriões de *B. exilata*, inoculados em meio de cultivo MS, com diferentes concentrações de 2,4-D. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

2,4-D (uM)	Germinação (%)	CPA (cm)	CR (cm)
0,0	33% b	0,72 ab	0,90 n*
2,25	33% b	0,36 b	0,42
4,50	80% a	1,26 a	2,50
6,75	20% b	0,50 b	0,76
9,00	20% b	0,15 b	1,62
CV (%)	55,04	52,24	95,57

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. n* não significativo

A germinação in vitro dos embriões de *B. odorata* ocorreu em menor tempo em torno de 12 a 16 dias, e o desenvolvimento da parte aérea, sobrevivência e resistência na aclimatização foram mais homogêneos (Figuras 23, 24 e 25).



Figura 23: Desenvolvimento de embriões *B. odorata*. (A), *B. lallemantii* (B) e *B. exilata* (C), com 3, 6 e 9 dias de cultivo.

Fonte: Marisa Taniguchi.

(



Figura 24: Diferenças no desenvolvimento de embriões *B. odorata* de 0 a 24 dias

Fonte: Marisa Taniguchi.



Figura 25: Desenvolvimento de embriões *B. odorata* aos 40 dias de cultivo in vitro
Fonte: Marisa Taniguchi.

Os maiores percentuais de germinação para as três espécies foram obtidos quando se utilizou 4,5 μM de 2,4-D. Para *B. odorata* não houve diferença significativa no tamanho da parte aérea e, para comprimento de raiz, o tratamento T2 (2,25 μM de 2,4-D) foi satisfatório. Para o desenvolvimento da parte aérea em *B. lallemantii*, o tratamento T2 (2,25 μM de 2,4-D) foi melhor, porém não houve diferença significativa na formação de raízes. Para *B. exilata* o tratamento T3 (4,5 μM de 2,4-D) apresentou melhor desenvolvimento de parte aérea e não houve diferença significativa para raízes.

A utilização de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D por Ferreira et al. (2017) induziu a germinação de 62% dos embriões de *Butia odorata*, porém 38% dos explantes oxidaram, o que pode ter limitado a germinação. No presente trabalho, os embriões não apresentaram oxidação, sugerindo-se que a concentração do carvão ativado adicionado ao meio de cultivo, adsorveu as substâncias indesejáveis, como compostos fenólicos. Sabe-se que a oxidação dos compostos fenólicos pelas enzimas polifenases podem produzir substâncias tóxicas, inibindo o desenvolvimento e causar a inviabilidade do material vegetal

(COSTA, 2006; NUNES et al., 2008). A presença de auxina no meio de cultura também promoveu alto índice de germinação (80%) em *Butia eriospatha* e, nos tratamentos em que foi adicionado carvão ativado ao meio de cultivo, houve resultados satisfatórios quanto à taxa de germinação dos embriões (MINARDI et al., 2011).

O aumento do comprimento da parte aérea de *Butia* sp. está relacionado à adição de auxina ao meio de cultura observando-se que, neste trabalho, a respostas são genótipo específicas, ressaltando que, a adição deste fitorregulador, em baixas concentrações, induz o crescimento, o desenvolvimento e a expansão dos tecidos vegetais (DARIO et al., 2004). Além disso, a interação da auxina com as vitaminas adicionadas ao meio de cultura influencia diretamente no crescimento e desenvolvimento dos embriões, fato atribuído as suas funções catalíticas.

Importante evidenciar que, para a cultura de embriões, nos estádios iniciais de desenvolvimento, suplementação adicional de sacarose pode ser requerida (MENEZES et al., 2010) e, no presente estudo essa adaptação do protocolo foi necessária, para que a ação da sacarose como reguladora do potencial osmótico do meio de cultura, permitisse maior ou menor difusão de água e nutrientes para o embrião, participando também do fornecimento de energia ou como fonte de carboidrato para os processos de diferenciação celular (SOARES et al., 2011; SOUZA et al., 2021). Esse controle homeostático faz se necessário para o processo de germinação, pois a difusão da água no meio de cultura é decisiva para a ativação enzimática (COSTA; MARCHI, 2008) nos embriões. Ledo et al. (2007) alcançou maiores resultados no cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) em meios contendo elevadas concentrações de sacarose.

A maturidade dos embriões pode também influenciar na germinação (SILVA et al., 1999; COSTA; MARCHI 2008), desenvolvimento e formação da parte aérea das plântulas in vitro, como observado em testes anteriores (resultados não publicados), em que a variação na germinação e no desenvolvimento de parte aérea, ocorre mesmo com a presença de GA3 no meio de cultura. As coletas de *B. odorata* foram realizadas em períodos diferentes às coletas das demais espécies, fato que pode ter proporcionado a germinação do embrião e o melhor desenvolvimento das plântulas. Da mesma forma, embriões

provenientes de frutos maduros de *Astrocaryum* sp. apresentaram altura de plântulas significativamente maior aos imaturos (PEREIRA et al., 2006). A viabilidade e germinação das palmeiras está associada a diversos fatores, mas, no geral, o armazenamento (que pode se relacionar a desidratação, por tempo de armazenamento) e a idade das sementes, influenciam na integridade do embrião e, conseqüentemente, na viabilidade e germinação.

A emissão de raízes deve ser considerada como uma variável chave para a avaliação da cultura de embriões de palmeiras (MELO, 2000), uma vez que, em várias espécies, ocorre a imaturidade do embrião, relacionada com a não diferenciação da radícula. Corroborando esses resultados, Ribeiro et al. (2011) indicaram o cultivo inicial em ambiente escuro para embriões de *Butia capitata*, já que o enraizamento foi favorecido pela ausência de iluminação.

Apesar do resultado não significativo para a formação de raízes de *B. exilata* e *B. lallemantii*, observou-se que o aumento das concentrações de auxina no meio de cultivo in vitro promoveu o balanço hormonal com os reguladores de crescimento contidos no embrião e plântula, promovendo aparecimento de calos e oxidação dos embriões. A permanência das amostras no meio de cultura com auxina, por um longo período ou em maiores concentrações, pode ocasionar efeitos negativos para o desenvolvimento das plantas, sendo inibitórios ou deletérios (LJUNG et al., 2005), uma vez que a produção de calo e a oxidação afetam a formação de plantas normais. Dessa forma, indica-se a troca do meio de cultura aos 20 dias de germinação, para um meio de cultivo sem reguladores de crescimento, ou seja, o meio de germinação utilizado nesse trabalho, sem adição de 2,4-D.

O conhecimento sobre os aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de espécies arbóreas nativas ainda é limitado (GUIMARÃES et al., 2018) e, nesse contexto, é possível incluir as palmeiras do gênero *Butia*. O teor de água das sementes juntamente com a temperatura adequada, favorece a contaminação por fungos de armazenamento, diminuindo a viabilidade das sementes e afetando a germinação (GARCIA, 2019). Em relação as espécies do gênero *Butia* pode-se inferir a ocorrência dessas dificuldades de germinação, o que leva à uma baixa população de plantas, sendo indicado a necessidade de realizar tratamentos pré-germinativos (FIOR et al., 2011).

A propagação da maioria das palmeiras é sexuada e sua germinação é lenta e desuniforme devido à dormência tegumentar, como observado para *B. eriospatha* (MEEROW; BROCHAT, 2017; WALDOW et al., 2013). Para a mesma espécie observou-se resistência mecânica do endocarpo e impermeabilidade à água e às trocas gasosas (HOFFMANN et al., 2014).

A germinação de espécies de *Butia* pode ocorrer de três meses até 12 meses e pode se levar até dois anos para que haja a emergência da plântula (SGANZERLA, 2010; WALDOW et al., 2013), prejudicando a produção de mudas, a formação de plantios e a avaliação de germoplasma (BEUGRÉ et al., 2009). Estudos referentes à fisiologia da germinação facilitam a compreensão desse processo, sendo que algumas características são utilizadas para o reconhecimento dos tipos de germinação em palmeiras, considerados três: remota tubular, remota ligular e adjacente ligular (HENDERSON, 2006; DRANSFIELD et al., 2008). Para as espécies estudadas, a morfologia apresenta o tipo de germinação remota ligular, plântulas com o eofilo expandido e germinação hipógea, com raiz primária em alongamento (Figura 26).

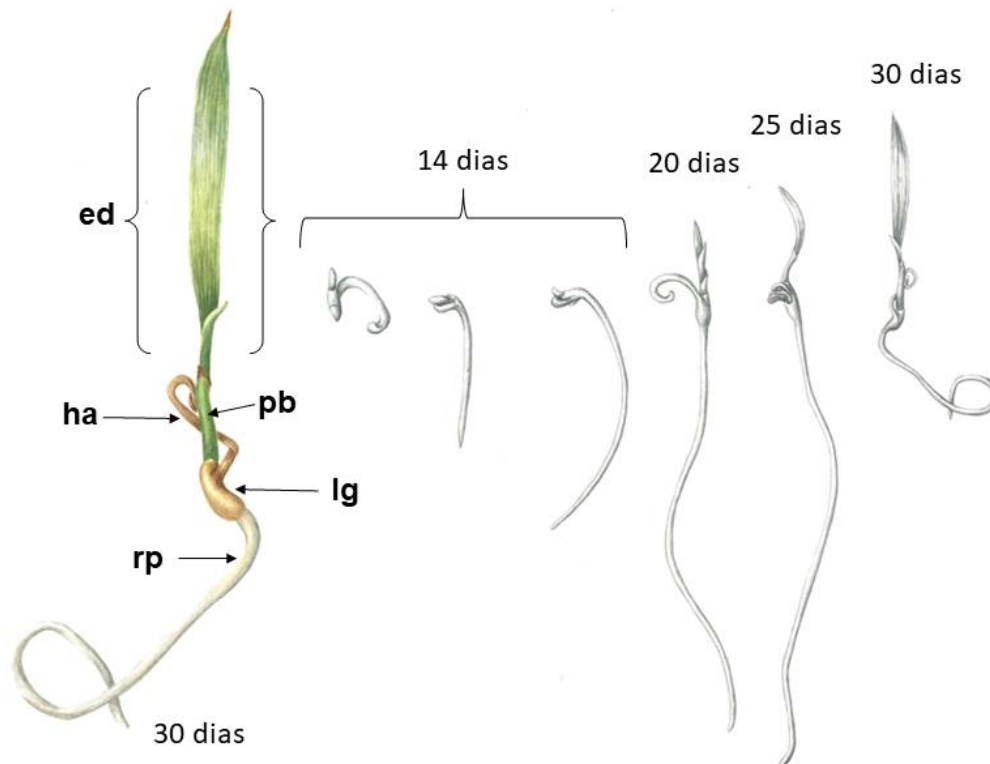


Figura 26: Desenvolvimento da plântula de *Butia* sp. in vitro. 14, 20, 25 e 30 dias de desenvolvimento após a germinação; 8 in vitro. rp- raiz primária; lg- lígula; pb- primeira bainha; ha-haustório; ed- eofilos desenvolvido (Ilustração: Prof. Dr. João Iganci).

Para as três espécies de *Butia* o tempo de armazenamento influenciou a viabilidade das sementes, assim como o resgate de embriões. Os embriões são pequenos, cilíndricos e de maturação tardia e grande parte de sua estrutura consiste no cotilédone (DRANSFIELD et al., 2008). Para melhor conhecimento sobre o processo de desenvolvimento e germinação de *Butia*, foi realizada germinação ex vitro, confirmando o mesmo comportamento in vitro (Figura 27).

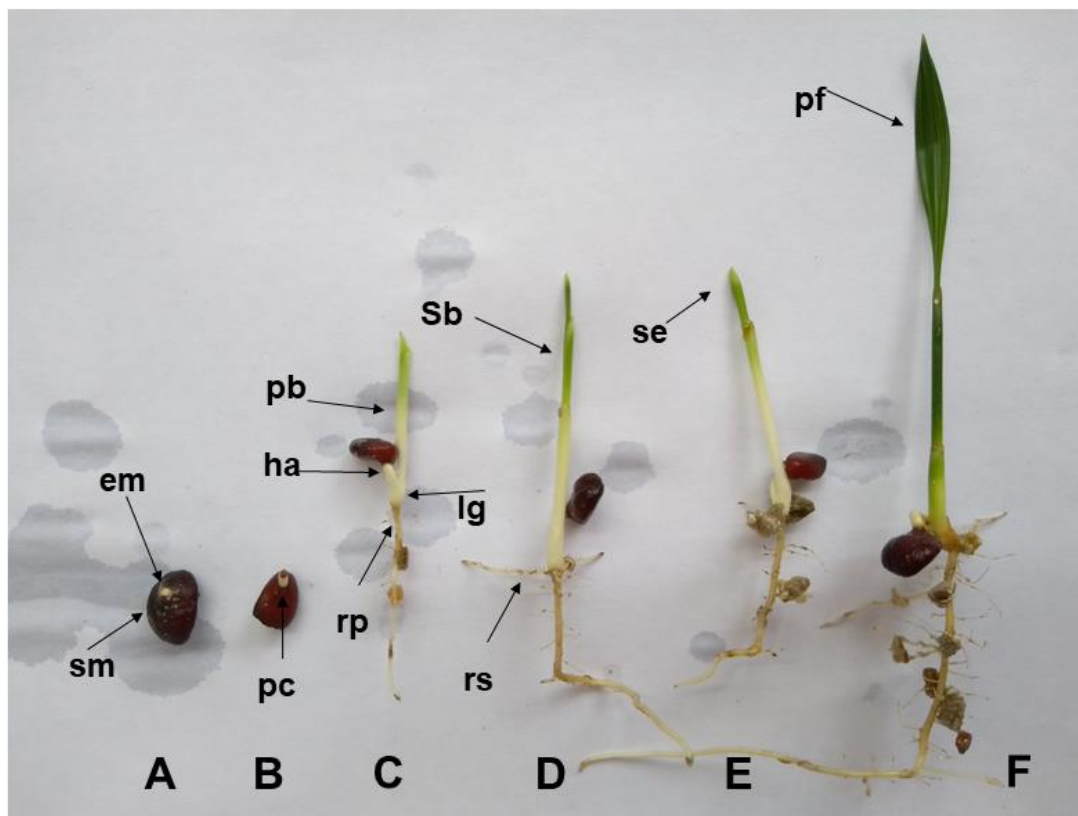


Figura 27: Desenvolvimento da plântula de *Butia* sp. ex vitro. Letras: **(A)** sm - semente; em - embrião; **(B)** pc - pecíolo codiledonar; **(C)** rp - raiz primária; lg - Lígula; pb - primeira bainha; há - hautório; **(D)** rs - raiz secundária; sb - segunda bainha; **(E)** se - surgimento do eofilo; **(F)** primeira folha expandida aos 30 dias de desenvolvimento após a germinação.

Fonte: Marisa Taniguchi.

5.2 Organogênese via TCLs

Para a organogênese, 100% dos explantes foliares das três espécies apresentaram oxidação, sem formação de tecidos ou calos (Figura 28).

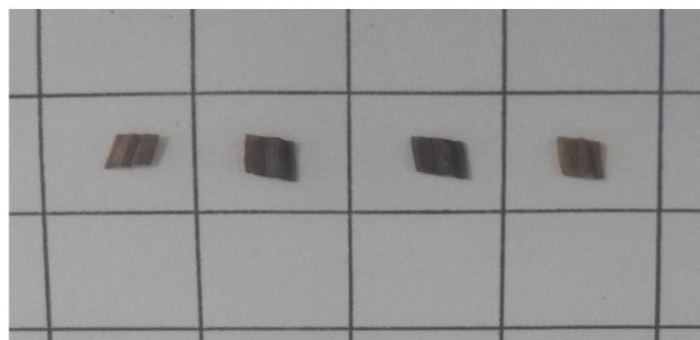


Figura 28: Explantes foliares de *Butia odorata* oxidados

Fonte: Marisa Taniguchi.

Contudo, a formação de parte aérea foi verificada a partir das TCLs de forma direta, ou seja, sem formação de calos, com o resultado 96% para *B. odorata*, 88 % para *B. lallemantii* e 75% para *B. exilata*, (Tabela 11).

Tabela 11: Porcentagem de regeneração, para *Butia odorata*, *Butia lallemantii* e *Butia exilata* inoculados em meio de cultivo com silício. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Silício (μM)	Regeneração (%)	CPA (mm)	Regeneração (%)	CR (mm)	Regeneração (%)	CR (mm)
<i>Butia odorata</i>			<i>Butia lallemantii</i>		<i>Butia exilata</i>	
0,0	70 b	2,75 b	27 b	0 b	38 b	0,75 b
35,60	96 a	5,25 a	88 a	1 a	75 a	6,0 a
71,20	23 c	0,75 b	25 b	0 b	18 b	0,0 b
106,80	27 c	1,25 b	30 b	0 b	5 b	0,0 b
CV (%)	27,52	38,3 0	25,35	0 b	46,46	97,9 0

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para as três espécies o tratamento T2 (35,60 μM) mostrou diferenças significativas e o melhor desenvolvimento de explantes. Aos três dias após inoculação os explantes apresentaram intumescimento e, aos 15 dias, há o início desenvolvimento de parte aérea e/ou raiz (Figura 29).



Figura 29: Explantes TCLs *Butia* sp. aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo.
Fonte: Marisa Taniguchi.

Todas as três espécies apresentaram intumescimento e crescimento do explante aos três dias de cultivo in vitro. As finas camadas de células (TCLs) foram retiradas do conjunto de tecidos que forma a lígula, contendo o início da formação das folhas, que formam posteriormente a bainha primária (Figura 30).

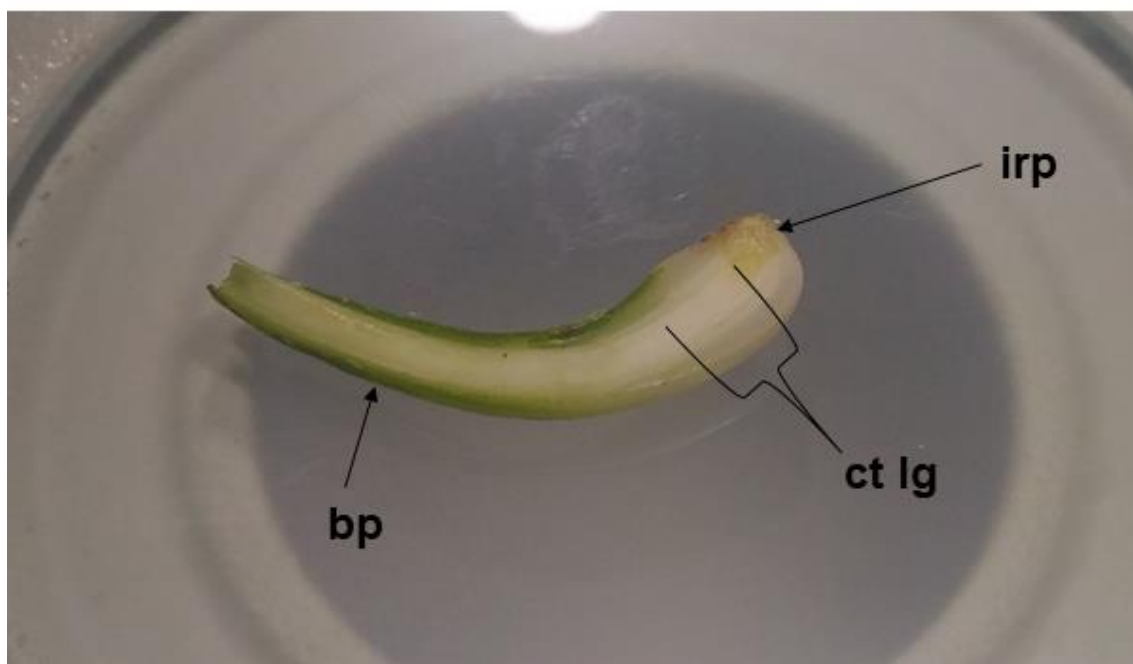


Figura 30: Explante de *Butia* sp, com 30 dias de cultivo in vitro seccionado longitudinalmente. Letras: bp - primeira bainha; ct lg - conjunto de tecidos lígula; irp - início da formação da raiz primária.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Cerca de três a nove dias após a inoculação em meio de cultura suplementado com 2,4-D, os primeiros eventos de divisão celular ocorreram simultaneamente em várias regiões do explante (Figuras 30 A, B, C e 31 B e D) e, verificou-se que os tecidos ao redor de ápices meristemáticos eram estruturas foliares (Figuras 31; 32) mostrando a complexidade do explante formado por diferentes estruturas (Figura 31). Aos 15 dias de cultivo in vitro verificou-se a expansão de parte aérea (Figura 32).

Cabe ressaltar que os explantes em meio de cultivo in vitro não formaram calo, contudo observaram-se intensas divisões celulares nos tecidos do explante que, possivelmente podem ter conduzido à formação de gema (Figura 32). O início da formação de gemas não foi identificado nas amostras seccionadas, sendo necessárias outras análises. Porém, é válido inferir que durante o seccionamento para obtenção das TCLs e, considerando a complexidade do

explante, alguma região apical meristemática com potencial para formação de gemas tenha permanecido no explante e se expandido originando a parte aérea. Porém, as análises anatômicas evidenciaram o potencial meristemático dos explantes TCLs e as diferentes estruturas que compõem o explante.

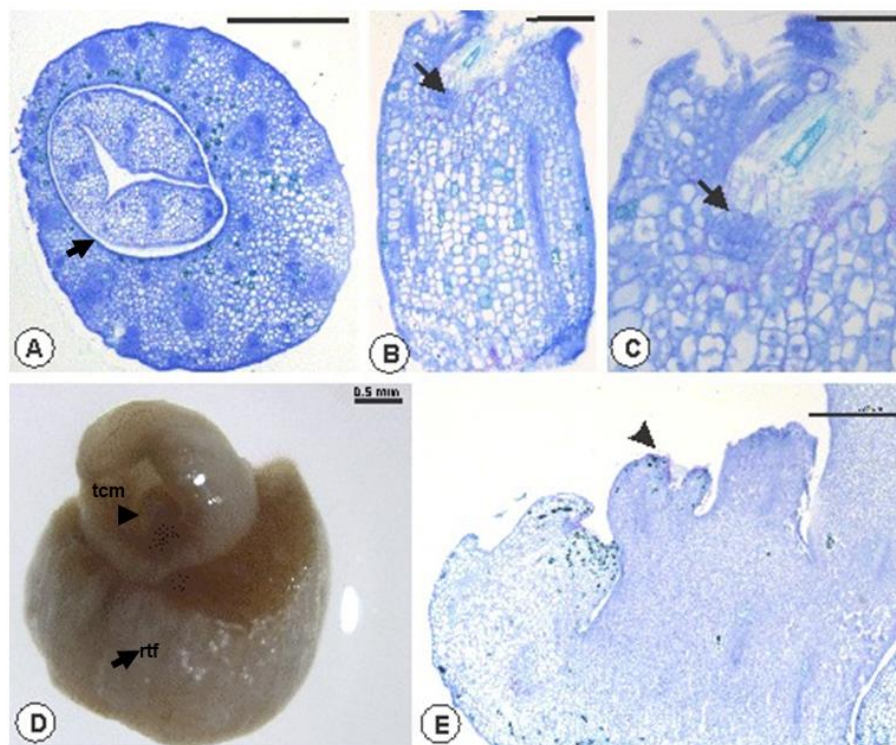


Figura 30: *Butia exilata*. Aspecto morfoanatômico da organogênese direta a partir de explantes ligulares segmentados em Thin Cell Layer (TCL) **A:** Secção transversal de explante intumescido, aos 3 dias de cultivo, seta indica bainha foliar. **B e C:** Secção longitudinal indicando células meristemáticas (setas) **D:** Explante com gema se desenvolvendo (ponta da seta) após 9 dias de cultivo tcm: tecido com células meristemáticas e gemas (seta) rtf: resíduo de tecido foliar. **E:** secção longitudinal do explante indica a gema (ponta da seta). A = 2 mm; B = 200 μm; B = C = 100 μm; D = 0,5 mm; E= 200μm.

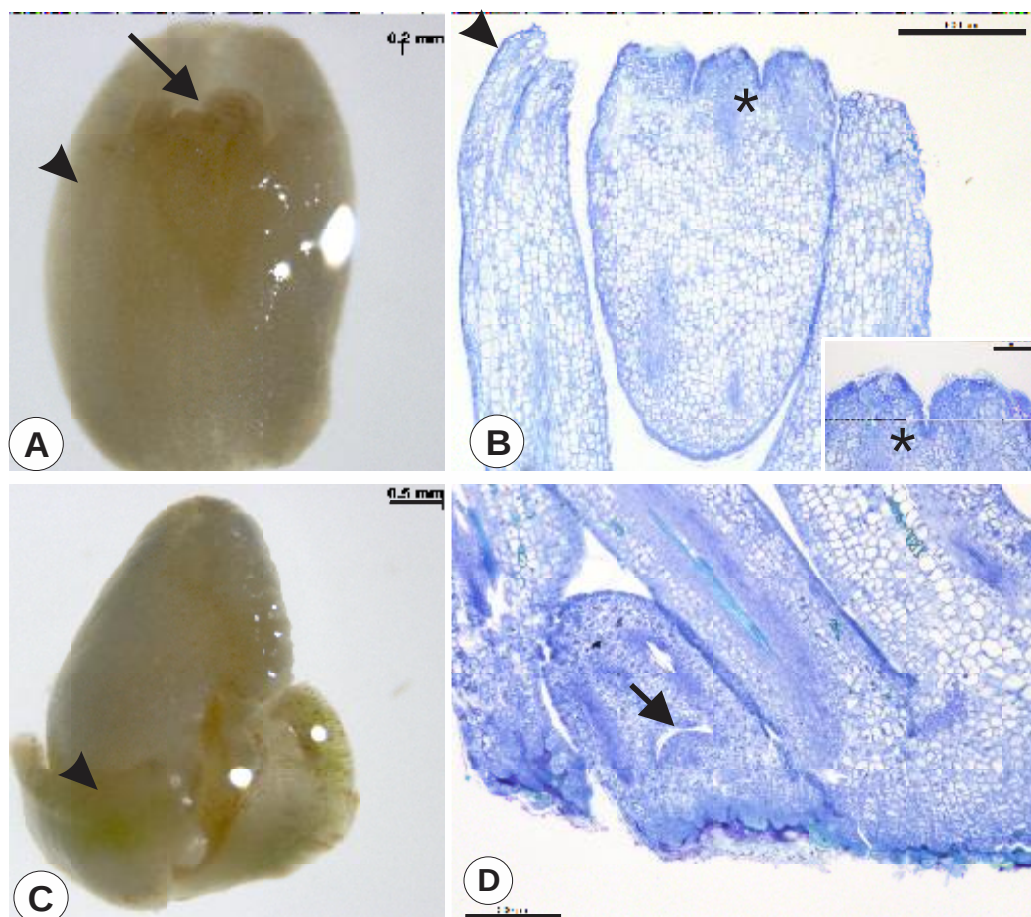


Figura 31: *Butia odorata*. Aspecto morfoanatômico da organogênese a partir de explantes do conjunto de tecidos da lígula, segmentados em Thin Cell Layer (TCL). **A:** Explante intumescido aos 6 dias de cultivo em que a ponta da seta indica parte do conjunto de tecido da lígula, provavelmente resíduo de tecido foliar envolvendo a gema, indicada pela seta inteira. **B:** Secção longitudinal do explante indicado em A evidenciando a detalhe da região apical com células meristemáticas (*) (ponta de seta: tecido foliar); **C:** Explante com tecido sendo separado do intumescimento e formação da gema (seta) após 9 dias de cultivo. **D.** A seta indica ápice meristemático. A = 2 mm; B = 500 µm; detalhe de B = 100 µm; C = 0,5 mm; D = 200 µm.

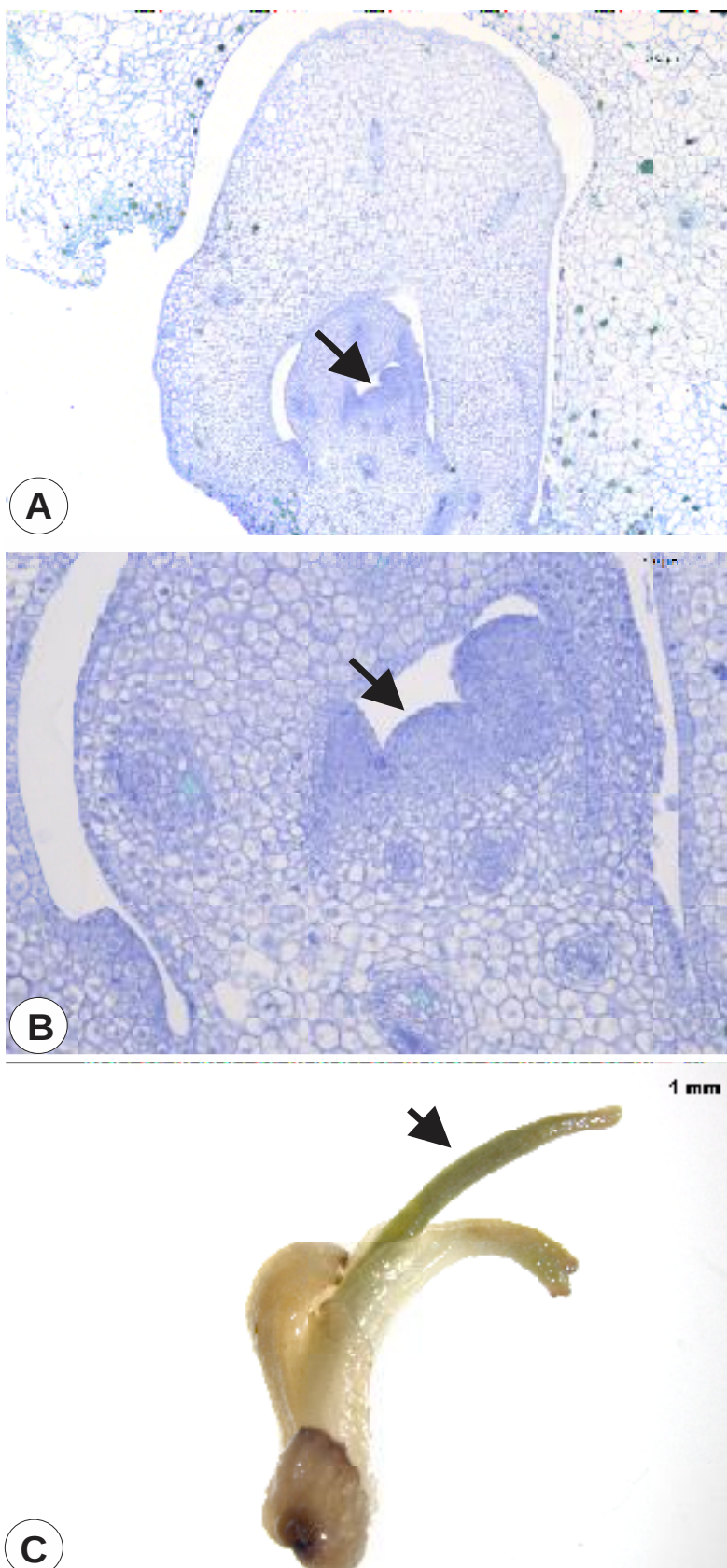


Figura 32: *Butia lallemantii*. **A-B:** TCL aos 12 dias de cultivo, mostrando a presença de gema (setas), envolta por tecidos que fazem parte com conjunto de tecidos da lígula para formação de folhas. **C:** Explante desenvolvido com segmento foliar aos 15 dias de cultivo: Barras: A = 500 μ m; B = 100 μ m; C = 1 mm, Laboratório de Anatomia Vegetal UFPel.

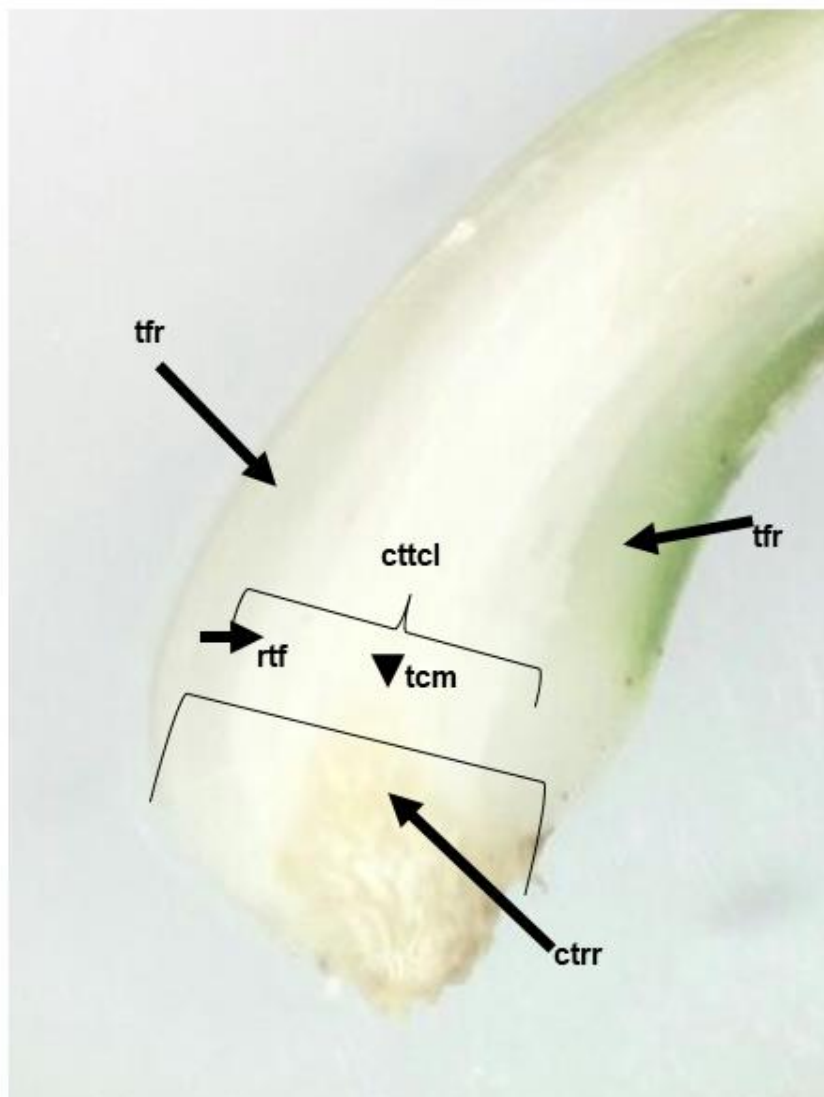


Figura 33: Corte longitudinal do explante de *Butia odorata* com 30 dias de cultivo in vitro. Letras: crr: conjunto de tecidos raiz que foram retirados; rtf: resíduo de tecidos foliares que fazem parte do cttcl: conjunto de tecidos do tcl (finas camadas de células); tcm: tecidos com células meristemáticas; tfr tecido foliar que foi retirado. Laboratório de Anatomia Vegetal - UFPel.

Em 1973, Tran ThanhVan descreve o sistema TCL (técnica da camada de células finas) pela primeira vez, em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), como um modelo de estudo para os mecanismos de controle da morfologia da parte aérea, raiz e flor. Atualmente a tecnologia TCL é amplamente aplicada na micropropagação plantas lenhosas e ervas medicinais. A técnica da camada de células finas (TCL) baseia-se na utilização de explantes muito pequenos, auxiliando a morfogênese in vitro em várias espécies vegetais (STEINMACHER, 2007; GOMES et al., 2015; PARTHIBHAN et al., 2018; MENDOZA-PEÑA et al., 2021; HANH et al., 2022), como *Cocos nucifera* L. (SAMOSIR et al. , 1998),

Bactris gasipaes Kunth (STEINMACHER et al. 2007) e *Stevia rebaudiana* Bertoni (MOSQUEDA; ANDREU, 2016).

As vantagens do uso da técnica de TCLs devem-se a maior capacidade genética e, provavelmente, ao estabelecimento de um domínio simplasto (BOUGET et al., 1998; HAYWOOD et al., 2002), que mantém o desenvolvimento coordenado das células e tecidos (WU et al. , 2002; ROBERTS; OPARKA, 2003). O domínio simplasto é considerado como a continuidade, entre as células de um domínio tecidual específico, permitindo o movimento molecular através dos plasmodesmos, mantendo e coordenando a atividade morfogênética no tecido (ROBERTS; OPARKA, 2003). Isso significa que é um método alternativo para romper os domínios do simplasto, bem como modular a resposta in vitro, usando o espaço interior celular para a difusão de solutos, há maior probabilidade de uma nova síntese de componente de parece celular, como oligossacarídeos.

Portanto, a partir deste estudo conseguiu-se a formação de brotos utilizando TCL, ao inocular finas camadas de tecidos variados presentes na lígula. Usando diferentes tipos de células providos de diferentes tecidos, é possível produzir várias respostas no mesmo explante e possibilitando uma maior área de contato dos tecidos meristemáticos com os reguladores de crescimento no meio de cultura. Por isso, a técnica pode ser classificada conforme o corte realizado, transversalmente (tTCL) ou longitudinalmente (ITCL), com particularidades em relação aos tipos de células presentes em cada corte (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2013).

Também é considerado que para as espécies com pouco material vegetal disponível, a técnica permiti obter maior número de explantes de uma única planta (MOSQUEDA; ANDREU 2016), e pode ser aplicada para obtenção de embriões somáticos, brotações, raízes, entre outros (SILVA; FUKAI, 2003). No entanto, a espessura do corte utilizada neste estudo (0,5 mm) pode ter influenciado na porcentagem de brotações obtidas. A espessura do explante foi abordada por Nhut et al. (2001), obtendo maior taxa de brotações e de explantes vivos com corte de espessura entre 3 e 4 mm.

Na maioria dos trabalhos com uso da técnica TCL, a ocorrência de calos é recorrente (NHUT et al., 2001; SILVA; FUKAI, 2003), o que pode estar relacionado ao próprio estresse ocasionado pela injúria dos tecidos, além da

resposta ao fitorregulador ou ao possível estresse causado pelas condições de cultivo: neste trabalho não houve a formação de calos. Possivelmente, houve o maior estímulo das células do centro do explante, células com potencial para reentrar no ciclo mitótico e maior sinalização devido o estresse e ao metabolismo da célula tentando se expressar. Além do maior contato com a superfície do meio de cultura, o que estimula a iniciação de células estaminais, o estabelecimento de padrões e a regeneração dos órgãos, pois estes processos, também dependem da razão auxina/citocinina no meio de indução, assim brotos e raízes podem ser regenerados com maior facilidade (CHENG et al., 2013).

Existe a relação entre lesão e resposta de auxina (DA COSTA et al., 2013 ; XU, 2018), pois a excisão de explantes das plantas doadoras, promove uma resposta ao estresse de ferimento gerado, que pode incluir o acúmulo de auxinas e, em geral, alterações nos perfis hormonais dos explantes (XU, 2018; HANH et al., 2022). Esses perfis hormonais desencadeados podem ou não ser suficientes para proliferação celular e efeito dos diferentes genótipos, tipos de explante e meios de cultura inicialmente utilizados para a indução de calos, embriões ou organogênese. Diversos trabalhos tentam elucidar os mecanismos envolvidos com a organogênese in vitro, porém pouco é conhecido a respeito da fase de aquisição de competência, fundamental para que a regeneração ocorra. Portanto, a morfogênese in vitro é um processo complexo e ainda não completamente esclarecido. Neste sentido, embora os reguladores de crescimento sejam os fatores mais relevantes no processo, a atividade dos nutrientes minerais e demais substâncias permanece pouco investigada (RAMAGE E WILLIAMS, 2002).

Sabe-se que um número restrito de espécies de palmeiras, produz perfolhos que podem ser facilmente propagados (TOMLINSON, 2006; BROCHAT et al., 2014). Além disso, a grande maioria das espécies é alógama e a heterogeneidade é observada quando se obtém material a partir de sementes (RAJANAIDU; AINUL, 2013). Desse modo, a aplicação da técnica TCL que não documentada no cultivo in vitro de espécies do gênero *Butia*, oferece promessa para a regeneração de plantas in vitro *Butia*. Portanto, esse trabalho traz relevantes resultados que demonstram a importância do balanço hormonal de auxina e citocinina na organogênese e indica que durante o desenvolvimento de um protocolo de regeneração de plântulas, os aspectos morfológicos e

histológicos devem ser avaliados para elucidar a resposta in vitro, como a origem e desenvolvimento da organogênese, bem como a caracterização da via morfogênética.

5.3 Criopreservação

Para os experimentos de criopreservação foram realizados testes preliminares testando-se o tempo de exposição ao PVs2 e utilização de soluções de saturação, com diferentes concentrações de sacarose adaptados de Vargas et al. (2020) e Taniguchi et al. (2020). Por meio desses resultados e das adaptações das técnicas, descritas nesse trabalho, foi possível realizar novos experimentos e suas validações, para as três espécies de *Butia*.

5.3.1 Adaptação da Droplet vitrification

Verificou-se nos resultados da Droplet vitrification, que houve germinação dos embriões apenas nos tratamentos T1 - controle (82, 57 e 90%) e naqueles criopreservados pré-tratados no tratamento T2 - PVsS2 (80, 65 e 75%), para *B. odorata*, *B. lallemantii* e *B. exilata*, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13: Porcentagem de germinação, de embriões *B. odorata* para *B. lallemantii* e *B. exilata* criopreservados via técnica de Droplet vitrification. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Soluções crioprotetoras	Germinação (%)		
	<i>Butia</i>		<i>Butia exilata</i>
	<i>Butia odorata</i>	<i>lallemantii</i>	
Controle	82% a	57% a	90% a
PVS2	80% a	65% a	75% b
PVS2 MODIFICADA	0% b	0% b	0% c
PVS3	0% b	0% b	0% c
PVS3 MODIFICADA	0% b	0% b	0% c
CV (%)	35,71	58,21	42,13

O floroglucinol adicionado à solução modificada de PVS2, possivelmente pode ter apresentado toxicidade para os embriões. Por outro lado, o PVS3, por não conter o crioprotetor intracelular DMSO, não conseguiu realizar a proteção das células, ocasionando a morte dos tratamentos durante as fases de congelamento e descongelamento; os embriões não apresentaram desenvolvimento, nem oxidação (Figura 34 e 35).



Figura 34: Germinação de embriões, na sequência de tratamentos: T1- Não criopreservados: Controle; T2- Criopreservados: PVS2; T3 - Criopreservados: PVS2 modificado; T4 - Criopreservados: PVS3; T5 – Criopreservados: PVS3 modificado. Letras: (A) *B. odorata*; (B) *B. exilata* e (C) *B. lallemantii*
Fonte: Marisa Taniguchi

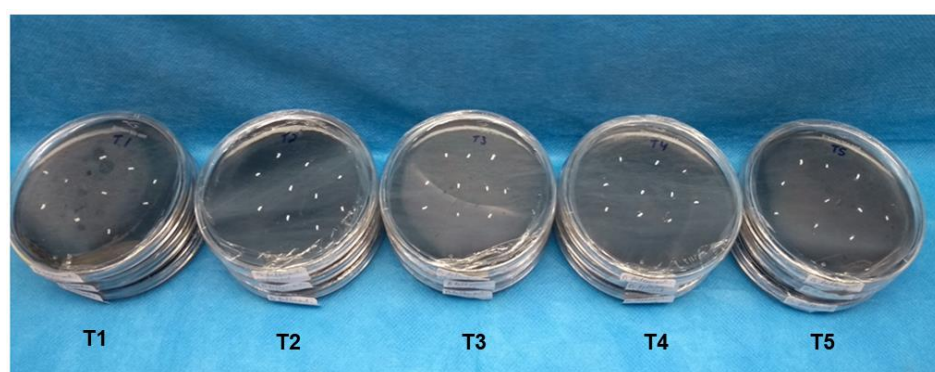


Figura 35: Placas com embriões, na sequência de tratamentos: T1 - Não criopreservados: Controle; T2 - Criopreservados: PVS2; T3 - Criopreservados: PVS2 modificado; T4 - Criopreservados: PVS3; T5 – Criopreservados: PVS3 modificado.
Fonte: Marisa Taniguchi

A percentagem de germinação do *B. lallemantii* apesar de não apresentar diferenças significativas, aumentou do tratamento T1 controle para o T2 tratamento com PVS2, provavelmente devido a maturidade dos embriões ou injúrias causadas durante o processo de resgate dos embriões.

5.3.2 Adaptação do encapsulamento- vitrificação

Observou-se a germinação em todos os tratamentos (Tabela 14). Não tendo diferença significava para *B. odorata*, entre os tratamentos T1 (28%) e T3 (20%) de germinação e entre o T3 e T2 (10 %), em *B. exilata*, não houve diferença significava entre os tratamentos T1 - (25%), T2 - (13%) e T3 (- 20%) e em *B. lallemantii* apresentou a resposta semelhante T1 (22%), T2 - (8%) e T3 (- 10%) sem diferenças significativas, observaram-se os melhores percentuais de germinação de embriões.

Tabela 14: Porcentagem de germinação, para *B. odorata*, *B. lallemantii* e *B. exilata* criopreservados via técnica de encapsulamento e vitrificação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Tratamento Encapsulamento	Germinação		
	<i>B. odorata</i>	<i>B. exilata</i>	<i>B. lallemantii</i>
Controle – Embriões -EN-MC	28% a	25% a	22% a
Embriões -En- FL- NL	10% b	13% ab	8% ab
Encapsulamento -En-SL 15 mn- MC	20% ab	20% ab	10% a
Encapsulamento En-SL 30 mn- MC	5% b	5% b	2,5% b
Encapsulamento - En-SL 60 mn- MC	5% b	2,5% b	2,5% b
CV (%)	47,57	60,28	42,13

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p=0.05), de acordo com o teste de Tukey.

Nos tratamentos T4 (encapsulamento e desidratação em sílica gel por 30 minutos) e T5 (encapsulamento e desidratação em sílica gel por 60 minutos), as espécies apresentaram decréscimo na germinação, provavelmente pela exposição à sílica gel ter desidratado em excesso o material, o que pode ter causado danos irreversíveis aos tecidos do embrião. Vargas et al. (2020) e Taniguchi et al. (2020) encontraram resultados semelhantes utilizando métodos de vitrificação sem o encapsulamento. A composição da cápsula é muito importante para a regeneração do material vegetal e acredita-se que são necessários novos estudos para a adição de maior concentração de reguladores de crescimento no meio nutritivo e melhor formulação de sais (Figuras 36 e 37).

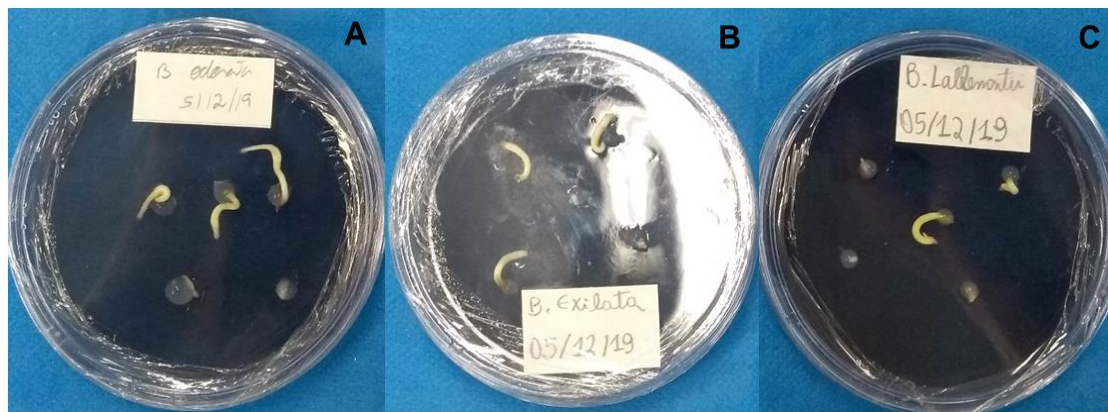


Figura 36: Unidades encapsuláveis de *Butia* sp. germinadas após criopreservação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Fonte: Marisa Taniguchi.

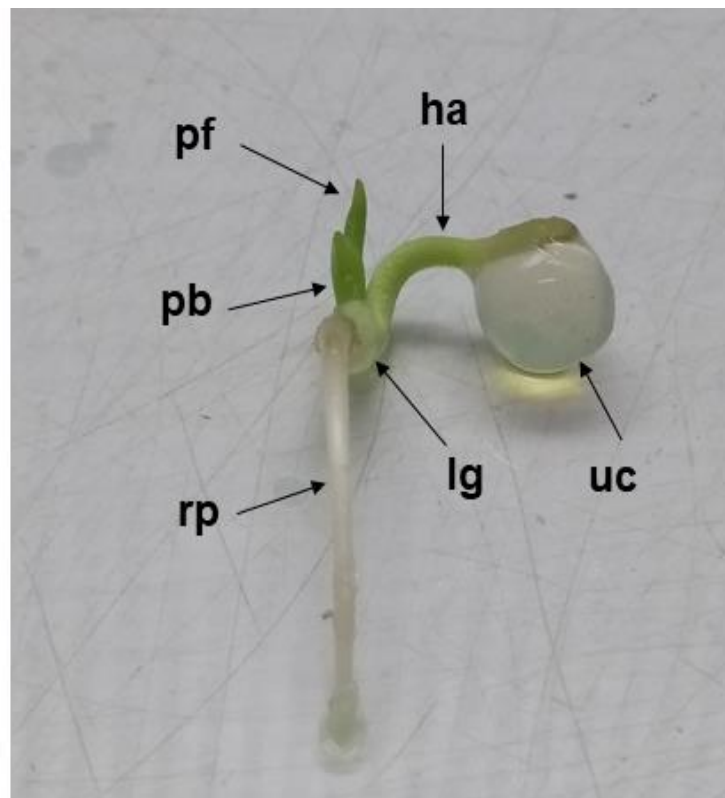


Figura 37: Unidade encapsulável de *Butia odorata*, germinadas após a criopreservação, com 25 dias. Letras rp: raiz primária; pb: primeira bainha; pf: primeira folha; lg: lígula; ha: haustório; uc: unidade encapsulável.
Fonte: Marisa Taniguchi.

O meio MS é rico em macro e micronutrientes, além de vitaminas (DEZAN et al., 2012), mas cada espécie possui exigências nutricionais específicas, independente do potencial de acúmulo de nutrientes. O suprimento inadequado de um elemento essencial (excesso ou deficiência) resulta em prejuízos para o desenvolvimento vegetal, que pode ocorrer tanto no cultivo em campo, como in vitro (SOARES et al., 2010). Acredita-se que a cápsula, agindo como um endosperma para o embrião, pode contribuir para regeneração e proteção.

Para espécies da família Arecaceae as características fisiológicas importantes para conservação são diversas, existindo mecanismos de reparo aos estresses causados tanto pela retirada de água de tecidos e células quanto pelo congelamento e descongelamento do germoplasma (OLIVEIRA et al., 2016). Mas, 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; SALOMÃO et al., 2017).

5.3.3 Adaptação da vitrificação

Maiores percentuais de germinação foram observados tanto utilizando diásporos quanto sementes, os quais não se diferenciaram da testemunha (Tabela 15). A adaptação realizada na metodologia preconizada por Salomão et al. (2017) para *B. eriospatha*, mostrou percentuais satisfatórios tanto pra *B. odorata* quanto *B. lallemantii*.

Tabela 15: Porcentagem de germinação, para *B. odorata* para *B. lallemantii* criopreservados via técnica vitrificação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Tratamento	Germinação (%)	
	<i>Butia odorata</i>	<i>Butia lallemantii</i>
Controle	80% a	70% a
Embriões	0% b	0% b
Semente	70% a	60% a
Diásporos	76% a	66% a
CV (%)	16,11	15,53

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p=0.05), de acordo com o teste de Tukey.

Apesar do que é citado por Salomão et al., 2017, sobre a extração da semente, quando não a danifica totalmente, causa injúrias em seus tecidos, nesse trabalho, foi possível reduzir os danos nas sementes e adaptar as estratégias para retirada do embrião zigótico, como demonstrados nos resultados de cultivo in vitro.



Figura 38: Germinação de *Butia odorata* cultivados in vitro após a criopreservação. A- 15 dias; B – 20 dias; C- 25 dias; D- 30 dias.
Fonte: Marisa Taniguchi.

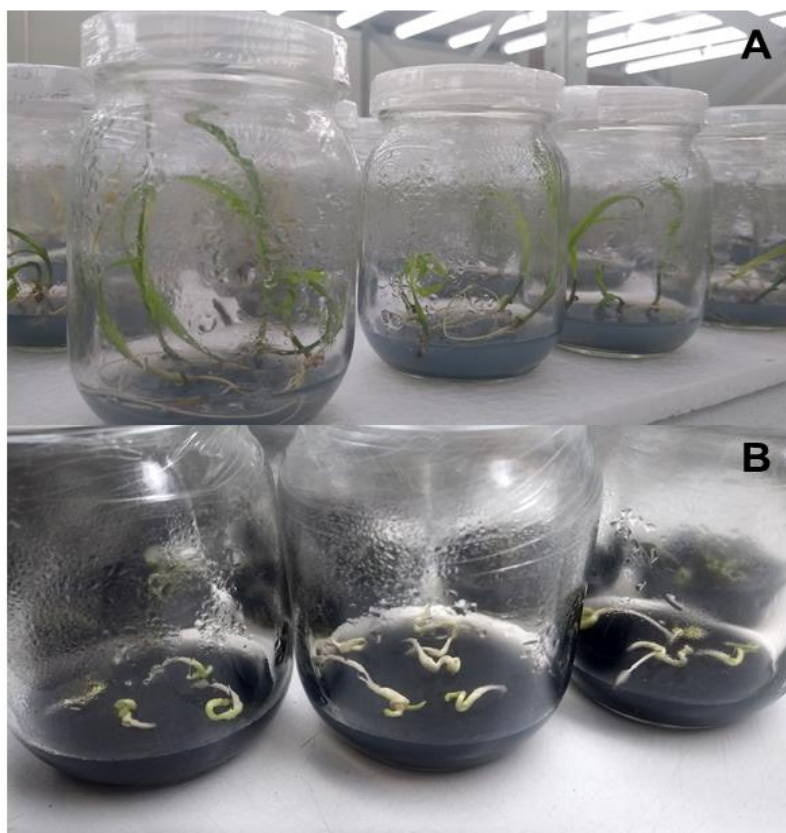


Figura 39: Germinação após a criopreservação: Letra (A) *Butia odorata*; (B) *Butia lallemantii*.
Fonte: Marisa Taniguchi.

As espécies de palmeiras podem apresentar sementes oleaginosas, essa característica pode acarretar mais danos estruturais durante a transição de fase líquida, ou seja, não há passagem para a fase vítrea e sim diretamente para a sólida (CHMIELARZ, 2009; GROUT, 2017). Nos resultados de criopreservação para *B. capitata* (FRUGERI, 2016) e para *B. eriospatha* (SALOMÃO et al., 2015), foram encontradas boas percentagens de germinação após o descongelamento, mesmo sendo espécies com sementes oleagenosas. Nesse trabalho, os resultados para espécies de *Butia* trabalhadas, também apresentaram boa percentagem de germinação.

A conservação de sementes de espécies de palmeira, tem como problema, o armazenamento por maior tempo, sem a perda da viabilidade, uma vez que o teor de umidade inicial das sementes se torna determinante para sua viabilidade (NEGREIROS; PEREZ 2004; FÉLIX et al., 2017). Com diferenças entre espécies, que podem surgir por condições da planta-mãe e do local de produção das sementes, o teor de umidade das sementes é importante para o conhecimento do seu comportamento fisiológico. De acordo com a natureza fisiológica e bioquímica da semente e das condições às quais estas estão submetidas no meio circundante, esse processo pode ser acelerado ou agravado (BEWLEY et al., 2013).

As sementes são classificadas em três grupos: (a) ortodoxas, as quais podem ser desidratadas a baixos teores de água e armazenadas em baixa temperatura, apresentam alta longevidade, podendo ser armazenadas por longos períodos, com reduzida umidade e temperaturas negativas; (b) recalcitrantes, as quais não toleram desidratação e possuem viabilidade reduzida em função do tempo, por não tolerarem a desidratação e temperaturas próximas de zero graus, e (c) intermediárias, as quais suportam níveis intermediários de umidade, mas que também não toleram baixas temperaturas de armazenamento (SEGUNDO HONG et al. 1996, HONG; ELLIS, 1998; VILLELA; PERES, 2004).

Cabe ressaltar que a determinação da umidade das sementes não possibilitou a classificação fisiológica completa, sendo necessário o acompanhamento da desidratação, armazenamento e germinação (Tabela 16).

Tabela 16: Umidades de sementes de *Butia*, obtidos pelos métodos da estufa a 105 °C/24 h (BRASIL, 2009).

Espécie	Umidade (%)
<i>B. odorata</i>	11,0%
<i>B. lallemantii</i>	15%
<i>B. exilata</i>	16%

Na criopreservação, o fator que mais afeta o sucesso das técnicas aplicadas é o teor de água intracelular. Para palmeiras ainda há uma gama de trabalhos que abordam um comportamento recalcitrante ou intermediário, além das barreiras para germinação, como dormência física e química. Assim, uso de cultura in vitro de embrião zigótico se tornou uma alternativa para germinação e para a avaliação da qualidade de sementes de palmeiras (OLIVEIRA et al., 2016), apesar dos protocolos de criopreservação, serem possíveis com sementes ou diásporos completos, o uso do resgate dos embriões facilita observar o resultado após criopreservação em menor tempo. Nesse trabalho sugere-se que as três espécies do gênero *Butia*, apresentam características intermediárias, corroborando com os resultados de Salomão et al., 2015 e Dias et al., (2015), os quais abordam um comportamento intermediário para fins de conservação das espécies *B. eriosphata* e *B. capitata*.

5.3.4 Aclimatização

Decorridos 60 dias em casa de vegetação, elevados percentuais de sobrevivência foram observados nas plantas das três espécies de *Butia*, aclimatizadas, após os experimentos de criopreservação e cultivo in vitro (Tabela 17 e figura 40).

Tabela 17: Porcentagem de sobrevivência, para *B. odorata* para *B. lallemantii* e para *B. exilata* criopreservados aclimatizados. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Espécie	Sobrevivência (%)
<i>B. odorata</i>	87% a
<i>B. lallemantii</i>	70% a
<i>B. exilata</i>	77% a
CV (%)	9,58

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p=0.05$), de acordo com o teste de Tukey.

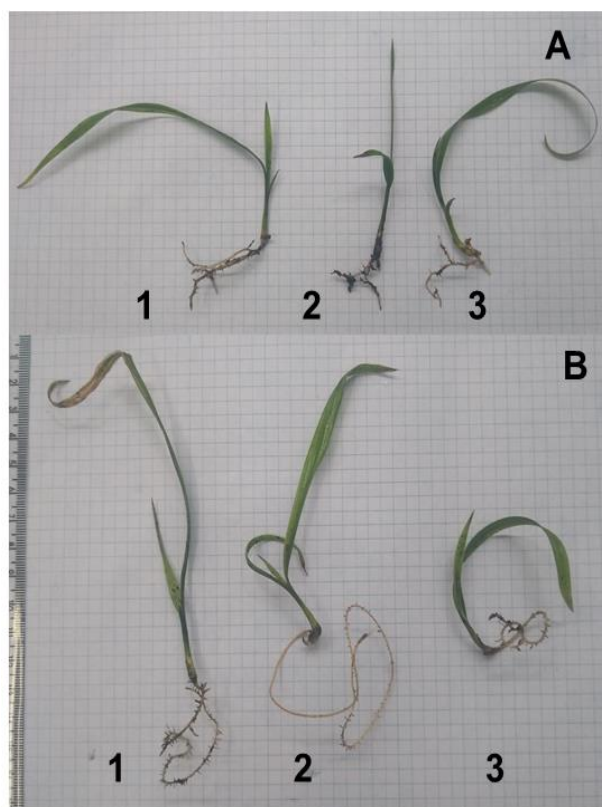


Figura 40: Sobrevivência após criopreservação: Letra A - Aos 40 dias (A1) *B. odorata*; (A2) *B. lallemantii*; (A3) *B. exilata*; (B); Letra B aos 60 dias (B1) *B. odorata*; (B2) *B. lallemantii*; (B3) *B. exilata*.

Fonte: Marisa Taniguchi.

A aclimatização demanda atenção, durante a transferência do ambiente in vitro para o ex vitro, a planta precisa passar do heterotrofismo para o autotrofismo, havendo um número alto de espécies que não sobrevive à exposição aos fatores ambientais (HARARIKA, 2003; CHANDRA et al., 2010). Nesse trabalho, observou-se que houve a sobrevivência das plantas aclimatizadas, para as 3 espécies, sendo 87% de sobrevivência após 60 dias para *B. Odorata*, 70% *B. lallemantii* e 77% para *B. exilata*. Percebe-se que aos 60 dias, após o maior período de aclimação das plantas, houve melhor desenvolvimento do sistema radicular. Isso é devido o sistema radicular adventício, produzido in vitro, pode apresentar poucas ramificações e pelos radiculares, além disso, as raízes são pouco funcionais na absorção de água e nutrientes, sendo mais sensíveis ao manuseio (HOFFMANN et al., 2001).

Considera-se que espécies endêmicas são mais vulneráveis à extinção pelos efeitos da deriva genética e endogamia (VANDEPITTE et al., 2013; SOLÓRZANO et al., 2016). 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; SALOMÃO et al., 2017). Portanto, esse trabalho trouxe resultados que possibilitam a conservação em longo prazo das espécies do gênero *Butia*, iniciando com protocolo de germinação in vitro e terminando com a aclimatização de plantas criopreservadas em nitrogênio líquido.

6. Conclusões

O presente trabalho permitiu estabelecimento in vitro, por meio do resgate de embriões das três espécies do gênero *Butia*, os protocolos de germinação e criopreservação foram adequados, permitindo inserir o material vegetal em bancos de germoplasma in vitro e criobancos.

A técnica tTCL pode ser utilizada para organogênese direta de espécies do gênero *Butia*. Porém, faz-se necessário mais estudos, analisando outros fatores que podem ter contribuído para o desenvolvimento celular, como espessura dos cortes e necessidade de suplementação do meio de cultura com outros reguladores de crescimento até a etapa de aclimatização. As três espécies do gênero previamente selecionadas, devido os critérios de ameaça de extinção, mostraram-se extremamente regenerativas em termos de indução de organogênese direta.

A vitrificação foi a melhor metodologia para conservação a longo prazo, permitindo a recuperação após o resfriamento, sem diferença significativa para o uso de sementes e diásporos.

Esses resultados serão base para os próximos estudos com espécies do gênero, tanto para cultivo in vitro como para conservação a longo prazo. Indica-se novos estudos de tempo armazenamento para outras espécies do gênero *Butia*, a fim aplicar a criopreservação e tornar-lá a alternativa para conservação em longo prazo desse gênero.

7.Referências

BARBIERI, R. L. et al. – **Vida no butiazal**. – Brasília, DF: Embrapa. [200] p.; Il.; 23 cm x 23 cm. 2015.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecology of seed dormancy and germination in greases. In: CHEPLICK, G. P. (Eds.). **Population biology of grasses**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 30-83.1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: viability, dormancy and environmental control**. Berlin: Springer-Verlag, 375 p. 1982.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D. J.; WESLEY, J. ; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. “**Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos**,” in Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, F. Engelmann and H. Takagi, Eds., pp. 140–155, IPGRI, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365p. 2009.

BOJÓRQUEZ, Q.J.E.A.; SÁNCHEZ, C. L. A.; GAMBOA, T. N. F.; QUINTALTUN, F.; MINERO, G.Y.; MARTÍNEZ, E. M.; SANTOS, B.C . Effect of plant growth regulators on in vitro germination of coffee zygotic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 19056- 19065. 2011.

BUENO, S. M.; LOPES, M. R. V.; GRACIANO, R. A. S.; FERNANDES, E. C. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 61, n. 2, p. 121-126, 2002.

BUTTOW, M.V.; CASTRO, C. M.; SCHWARTZ, E.; TONIETTO, A.; BARBIERI, R. L. Caracterização molecular de populações de butia capitata (arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 230-239, 2010.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de culturas de tecidos d plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**. v. 7, n.1, p. 30-60, 2011.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: **EMBRAPA Algodão**, (EMBRAPA Algodão. Documentos, 115) 22 p. 2003.

CASTRO, S.V., et al. Intracellular Cryoprotant Agents: characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 2 p. 957. 2011.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In **Somatic embryogenesis in woody plants** (S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v.5, p.31-43. 1999.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

ELLERT-PEREIRA, P. E.; ESLABÃO, M.P. **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: 17 Fev. 2017.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

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. 2011.

ESLABÃO, M. P.; PEREIRA, P. E. E.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN G. **Mapeamento da distribuição geográfica de butia (Arecaceae)**. XVIII Encontro de Pós-Graduação Universidade Federal de Pelotas. 2016.

FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho azedo (*Butia capitata* (Martius) Beccari) para fins de uso sustentável na região norte de Minas Gerais**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia)–Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Ciencia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZ, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Rev.Ciência Rural**. 2011, v.41, n.7, p. 1150-1153. 2011.

FLORES, R. et al. Sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199. 2013.

GARCIA JL, TRONCOSO J, SARMIENTO R; TRONCOSO A. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.95-100, 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3ª ed. The Background Springer. v. 1, 709 p. 2008.

GEYMONAT, G.; ROCHA, N. **M'botiá. Ecosistema único en el mundo**. Castillos: Casa Ambiental, 405p.,2009.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.92, p. 1-13. 2008.

GRATTAPAGLIA, d.; MACHADO, M A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq. p . 183-260. 1998.

GUERRA, P. P; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Ed.) **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1999.

HARTMANN, H.T; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.JR.;GENEVE, R.L.; **Plant propagation, principles and practices**. Prentice Hall, 2002.

HELLIOT, B.; SWENNEN, R.; POUMAY, Y.; FRISON, E.; LEPOIVRE, P.; PANIS, B.. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems, **Plant Cell Reports**, vol. 21, no. 7, pp. 690–698, 2003.

HENDERSON, F. . **Morphology and anatomy of palm seedlings**. Bot Rev 72:273–329. 2006.

HERINGER A.S.; VALE EM, BARROSO T, SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theor Exp Plant Physiol**, v.25, n. 2, p.116-124. 2013.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G.. Cultura de embriões. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPQ. p.371-393. 1998.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, S.A. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013.

KACZMARCZYK, A.; RUTTEN, T.; MELZER, M.; KELLER, E.R.J. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips, **CryoLetters**,v. 29, n. 2, p. 145–156, 2008.

KACZMARCZYK, A. et al. 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, 2011.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27:137-138. 1965.

KELLER, E. R. J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution, Dordrecht**, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 431 p. 2012.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

LEDO, A.S; LAMEIRA, O.A, BENBADIS, A.K; MENEZES I.C; LEDO C.A.S; OLIVEIRA, M.S.P..Cultura in vitro de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira Fruticultura**. 23:13–22.2001.

LEDO A.S; GOMES K.K.P; BARBOZA S.B.S.C; VIEIRA, G.S.S.; TUPINAMBA E.A; ARAGAO W.M.. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasil** 42:147–154, 2007.

LOPES P.S.N.; AQUINO C.F.; MAGALHÃES H.M.; JÚNIOR D.S.B. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (MARTIUS) BECCARI e-ISSN 1983-4063 **Pesquisa e Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, 2011

LORENZI, H. **Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas**. Nova Odessa: Plantarum, 2004.

MARCATO, A. C. **Revisão taxonômica do gênero *Butia* (Becc.) Becc. e filogenia da subtribo Butiinae Saakov (Palmae)**. 147f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005

MARTINS, E. R. **Projeto conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas nativas do norte mineiro: coleta, ecogeografia e etnobotânica**. Montes Claros: UFMG, (Relatório institucional) 2003.

MERCADANTE-SIMÕES M.O; FONSECA R.S; RIBEIRO L.M; NUNES Y.R.F. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, 8:143-149, 2006.

MEGGUER, C. A. **Fisiologia e preservação da qualidade póscolheita de frutos de butiá [*Butia eriospatha* (Martius) Beccari]**. 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, 2006.

MELETTI, L. M. M. et al. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 6, n. ½, p. 13-20, abr/jun. 2007.

MELO B.; PINTO J.E.B.P.; LUZ J.M.Q.; PEIXOTO J.R.; JULIATTI F.C.,
Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e
desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirobeira
[*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p. 1301-
1306, 2001.

MEGGUER, C. A. **Fisiologia e preservação da qualidade póscolheita de
frutos de butiá [*Butia eriospatha* (Martius) Beccari]**. Dissertação (Mestrado
em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do
Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages. 2006.

MENDONÇA, M.S.; OLIVEIRA, A.B.; ARAÚJO, M.G.P.; ARAÚJO, L.M.
Morfo-anatomia do fruto e semente e *Oenocarpus minor* Mart. (ARECACEAE).
Revista Brasileira de Sementes, v. 30,p. 90-95. 2008.

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. 2011.

MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho-
azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas
Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia)–Instituto de
Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros,
2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays
with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3,
p. 473-497, 1962.

MUSTAFA, Y. T.; VAN LAAKE P.E.; STEIN, S. **Modeling for Improving
Forest Growth Estimates**. IEEE Transactions on Geoscience and Remote
Sensing. Bayesian Network .v. 49, n.2, p. 639-649. 2011.

OLIVEIRA, A.B.; MENDONÇA, M.S.; ARAÚJO M. G. P.. Aspectos anatômicos
do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart.: uma
palmeira da Amazônia. **Acta bot. bras.** 24(1): 20-24. 2010.

PÁDUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas
pró- embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.)**. 2012, 120 p.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Lavras,
Lavras, 2012.

PANIS, B., LAMBARDI, M. **Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees.** Rome: FAO, 2005.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R.. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 45-55. 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura.** 1ª ed. Lavras, UFLA/FAEPE, 74p. 2001.

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. 2011.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142. 2011.

RAHMAH, S. A. M.; PING, K. S.; SUBRAMANIAM S.. Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities of Brassidium Shooting Star Orchid Safrina. **Scientific World Journal**. 10 p. Malaysia. 2015

RAI, M. K. et al. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, 2009.

REITZ, R. 1974. **Palmeiras.** In **Flora ilustrada catarinense** (R. Reitz, ed.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1974.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide.** Berlin: Springer. 513p. 2008.

REYNOLDS, E.S. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.** Journal of Cell Biology, v17, p.208-212, 1963.

RIBEIRO L.M; NEVES S.C; NEVES, 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, 2011.

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

ROCHA, H. S. Biófabricas: estrutura física e organização. In: JUNGHAS, T.G.; SOUZA, A. da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas, BA. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.** p 121-152.2009.

ROSSATO, M. **Recursos genéticos de palmeiras nativas do gênero Butia do Rio Grande do Sul.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 136 f. 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var .*brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p.30-33, 1990.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n.3, p. 151-172, 2007.

SANTANA, B. N.; ROJAS, H. R.; GALAZ, Á. R.M.; KU, C. J.R.; MIJANGOS, C.J.; GUTIÉRREZ, P. L.C.; LOYOLA, V.V.M.. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 43:507-520.2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** Brasília, v. 4, n. 20. 2001.

SEMA. **Decreto nº 42.009, de 31 de dezembro de 2002.** Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul.

Disponível em:

<<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especiesameaçadas.pdf>>. Acesso em: 5 de janeiro 2017.

SEMA. Espécies da flora ameaçada de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul**, 2014. Disponível em:

<http://www.sema.rs.gov.br/conteudo.asp?cod_menu=4&cod_conteudo=8991&busca=flora%20amea%E7ada%20de%20extin%E7%E3o> Acesso em 5 de janeiro de 2017.

SINGH, J.; TIWARI, K.N. High-frequency in vitro multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – A valuable medicinal plant. **Industrial Crops and Products**. v. 32, p. 534-538. 2010.

STEIN, V. C.; PAIVA, R. VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v. 34, n.5, p. 789-796, 2010.

SUBRAMANIAM, S. et al. Fundamental concepts of cryopreservation using *Dendrobium sonia* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 19, p. 3902-3907, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TOMLINSON, P. B. **The structural biology of palms**. Oxford: Clarendon Press, 1990.

TONIETTO, A.; SCHLINDWEIN, G.; TONIETTO, S. M. Usos e potencialidades do butiazeiro. **Circular Técnica**, Porto Alegre: FEPAGRO. n° 26. 28p. 2009.

TZEC-SIMA, M. A, ORELLANA, R; ROBERT, M.L. In vitro rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 42:54-58 2006.

ZAMBRANA, N.Y.P.; BYG, A.; SVENNING, C.C.; MORAES, M.; GRANDEZ, C. & BALSLEY, H. Diversity of palm uses in the western Amazon. **Biodiversity and Conservation**. v.16, p.2771-2787. 2007.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y.. Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh) by 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae** 46:215-223.1991.

ZONTA, J. B. et al. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de café. **Idesia**, v. 27, n. 2, p. 17-23, 2009.

WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J.. "Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation," **Protoplasma**, vol.249,no.2,pp.323–335,2012.

Capítulo 3

ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE BATATA SILVESTRE

1. Introdução

Batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo (DJAMAN et al., 2021), sendo considerada a terceira mais consumida pela humanidade, atrás apenas do arroz e do trigo (SILVA; LOPES, 2016). A área colhida no Brasil está em torno de 803,9 mil ha e a produção ao redor de 4,3 milhões de toneladas. Os estados com maior produção são Mato Grosso, Minas Gerais e Bahia, e no Brasil o consumo é de aproximadamente 4,02 kg/pessoa no ano (SEAPA, 2017; POF, 2018)

Para que sejam lançadas variedades de batata mais adaptadas as diversas regiões produtoras do país, é realizado o melhoramento genético das espécies. Entretanto, o processo de seleção de genótipos mais produtivos estreita a base genética das plantas cultivadas (SIGRIST, 2010). Desse modo, a conservação de germoplasma proveniente de parentes silvestres da batata cultivada são imprescindíveis, para que uma base genética mais ampla esteja disponível aos programas de melhoramento genético (DAL MOLIN, 2015).

As batatas silvestres são distribuídas vastamente na América, no sudoeste dos EUA ao México e América Central, sendo que na América do Sul ocorrem em quase todos os países (HIJMANS et al., 2002; KACZMARCZYK et al., 2011). As espécies de batata silvestre *Solanum commersonii* Poir, *Solanum malmeanun* Bitter e *Solanum chacoense* Bitter são encontradas na Região Sul e *Solanum calvescens* Bitter, na Região Sudeste em Minas Gerais/São Paulo (DAL MOLIN, 2015).

Essas espécies apresentam potencial de uso no melhoramento genético de batata cultivada por meio de genótipos com resistência às doenças e tolerância a estresses abióticos (HAWKES, 1994; HAVERKORT et al., 2009; KIM et al., 2012; TAN et al., 2010; WATANABE et al., 2011; GONZALEZ, 2013; DAL MOLIN, 2015). Estudos relatam a presença de genes de resistência a murcha bacteriana (Wilt Bacteriano) em *S. commersonii* (LAFERRIERE et al., 1999; KIM-LEE et al., 2005) e *S. Chacoense* (CHEN et al., 2013).

Devido à alta demanda da batata como fonte de alimento, principalmente em países em desenvolvimento (CIP 2013), o foco de reprodução mudou para a

adaptação às condições desses países, que apresentam normalmente climas quentes e secos. Isto reforça a necessidade da inclusão de espécies silvestres nos programas de melhoramento da batata.

No entanto existem barreiras como a compatibilidade entre espécies, a falta de estudos e a própria degradação da diversidade genética, que está ameaçada pela mudança de uso da terra causada pela urbanização, erosão genética e mudanças climáticas. Portanto estudos que viabilizem a conservação de espécies selvagens e as tornem disponíveis apresentam grande importância para uso em programas de melhoramento, pois fornecem a base para a melhoria futura das culturas (HIRANO, 2015).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação, tem como principais vantagens o aumento rápido do número de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade (ECHEVERRIGARAY et al., 2001). A criopreservação é um método para conservação longo prazo que, em batata, foi iniciado em 1977 (BAJAJ, 1977), mas atualmente, os estudos para criopreservação, ainda não abrangem todos os acessos de espécies silvestres. A criopreservação é a técnica, mais utilizada para espécies com potencial comercial ou ameaçadas de extinção e se destaca por proporcionar a conservação do material biológico vivo por período indeterminado, a ultra baixas temperaturas (-196 °C), sem que este perca a sua viabilidade (ENGELMANN, 2011). Assim, coleções são mantidas em pequenos espaços, permanecendo protegidas de contaminação e exigindo pequena manutenção (ENGELMANN, 2004).

Os estudos para conservação em longo prazo de espécies de batatas silvestres brasileiras são considerados incipientes, mas de grande importância para a manutenção dos bancos de germoplasma. Por esses recursos genéticos, fornecerem a base para a melhoria futura das culturas, as batatas silvestres são espécies alvo de grande importância para estudos em programas de melhoramento (HIRANO, 2015). Diante do exposto esse trabalho objetivou-se realizar protocolos para conservação em longo prazo, de recursos genéticos de batatas silvestres.

2. Referencial teórico

2.1 Batatas silvestres

O germoplasma de espécies silvestres de batata dispõe de uma gama ilimitada de variabilidade genética, devido a sua ocorrência nos mais diversos ambientes, o que as tornam espécies alvo para os programas de melhoramento genético. Essas espécies possuem características físico-químicas e sensoriais favoráveis para matérias-primas destinadas à industrialização, como baixo teor de açúcares redutor, alto conteúdo de sólidos totais; consideráveis concentrações de polifenóis, flavonóides e antocianinas (CLAUSEN, 1997; ROCHA et al, 2000; CHALÁ et al., 2001; FRIEDMAM, 2006; HAN et al., 2006).

As batatas silvestres são consideradas parentes selvagens das atuais batatas cultivadas e apresentam adaptações em uma vasta gama de habitats, com potencial para tolerar diferentes condições de estresses ambientais, sendo resistentes inclusive a pragas e doenças (ROCHA et al., 2000; HAVERKORT et al., 2009; TAN et al., 2010; WATANABE et al., 2011; KIM et al., 2012; CHEN et al., 2013; HIRANU; 2015).

Atualmente considera-se três espécies silvestres parentes da batata cultivada: *Solanum commersonii* Dunal, *Solanum chacoense* Bitter e *Solanum malmeanum* Bitter, que são encontradas na Região Sul e apresentam variação fenotípica do ponto de vista morfológico (SPOONER et al., 2016; NICOLAO, 2021. Mas, na Região Sudeste, encontra-se a *Solanum calvescens* Bitter, mesmo não sendo uma concepção geral, alguns autores a citam como sinônimo da *S. chacoense* (ROCHA et al., 2000; MENTZ, 2004; DAL MOLIN, 2017).

As espécies de batatas silvestres apresentam limitações para sua utilização em estudos de melhoramento genético, devido à barreira da ploidia e do número de equilíbrio do endosperma (EBN), não sendo diretamente cruzadas com algumas subespécies de *S. tuberosum subsp. tuberosum* L., além do estreitamento da base genética das plantas cultivadas (JOHNSTON et al., 1980; CARPUTO et al., 1997; TOMÉ, 2009; SIGRIST, 2010; KLASSEN et al., 2017). Nesse contexto e, considerando o potencial para tolerar diferentes condições de

estresses ambientais, parentes silvestres de culturas domesticadas, como as batatas, possuem diversidade genética útil para desenvolver cultivares mais produtivas, nutritivas e resilientes apresentando grande interesse para cruzamentos, inclusive visando à defesa contra fitopatógenos (ROCHA et al, 1997; FRIEDMAM, 2006; BARBOSA, 2009; WATANABE et al., 2011; CASTAÑEDA et al., 2016; SILVA, et al., 2017).

Assim para superação dos constantes desafios impostos pela agricultura e devido à necessidade de garantir a conservação e utilização futura dos recursos genéticos, é crucial a busca, por novas estratégias e adaptações de técnicas de conservação *ex situ* para maior inclusão de espécies silvestres nos programas de melhoramento da batata no Brasil e em criobancos de germoplasma.

2.2 A Conservação dos recursos genéticos de Batata Silvestre

Relatórios de avaliação recentes do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) e da Plataforma Intergovernamental de Política Científica sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos (IPBES) destacaram os riscos para a humanidade decorrentes do uso insustentável dos recursos naturais, com consequências negativas para a biodiversidade e o fornecimento de múltiplos serviços ecossistêmicos (IPBES, 2019; ARNETH et al., 2020).

Aproximadamente 70-75% da área livre de gelo é afetada pelo uso humano, quase 50% de forma intensiva, assim, devido ao crescimento contínuo da população humana, o crescente consumo per capita, junto com a expansão agrícola e a ausência de políticas concretas para conservação de recursos genéticos, a extinção de espécies deverá ser ainda mais acelerada nos próximos anos (QUESADA, 2021; SEGAN; MURRAY; WATSON, 2016; SHINET et al., 2019), fatos que demonstram sérias preocupações sobre a aceleração da superexploração, poluição dos ecossistemas e perda de recursos vegetais de importância para alimentação humana.

O aumento do consumo da batata como fonte de alimento, principalmente nos países em desenvolvimento (NASRIN, 2003; FAGUNDES et al.; 2010;

BIRCH, et al., 2012; CIP 2013; EMBRAPA, 2015; FERNANDES et al., 2015; SHIMOYAMA, 2016; SILVA, et al., 2016; FAO, 2018), contribui para o foco da produção voltar-se para adaptações às condições desses países, visto que apresentam, normalmente, climas quentes e secos.

As espécies de batatas silvestres apresentam tolerância à seca e a estresses abióticos, além da presença de genes de resistência a murcha bacteriana (Wilt Bacteriano) em *S. commersonii* (LAFERRIERE et al., 1999; KIM-LEE et al., 2005; CARPUTO et al., 2009) e *S. chacoense* (MONTALDO, 1984; CHEN et al., 2013), *Solanum malmeanum* Bitter é de grande interesse para o melhoramento genético (HAWKES; HJERTING, 1969; CARPUTO et al., 2009; TOMÉ, 2009), *S. calvescens*, que embora seja considerada uma subespécie, é promissora para a investigação de genes de tolerância a estresses abióticos, não há relatos de estudos sobre seu cultivo, desenvolvimento ou tolerância a estresses (DAL MOLIN et al., 2017).

Dessa forma, é importante enfatizar a necessidade da inclusão de espécies-silvestres de batata nos programas de melhoramento no Brasil. Esses recursos silvestres são extremamente valiosos na adaptação de variedades de culturas às mudanças nas pressões de doenças, práticas agrícolas, demandas de mercado e condições climáticas sendo necessário conservá-los (DEMPEWOLF et al., 2017). Inclusive, para reduzir os custos de produção da própria batata-semente é necessário conhecer o potencial de multiplicação in vitro dos diferentes genótipos de batata, para ajustar o protocolo, tornando o processo mais eficiente (SANTIAGO, 2012).

Assim, as técnicas da cultura de tecidos, surgem como alternativas que permitem além da produção, a pré-seleção de material vegetal de interesse, visto que o cultivo in vitro reduz as interações de genótipo x ambiente. Essas ferramentas são eficazes tanto para conservação de recursos genéticos em bancos de germoplasma in vitro, como para estudos de produção e melhoramento genético (ECHEVERRIGARAY et al., 2000; KELLER et al., 2013).

2.3 Espécies de batatas silvestre

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a terceira cultura mais importante em termos de consumo humano (FAO, 2018; DEVAUX et al., 2020; CAMPOS,ORTIZ– 2020), sendo consumida por mais de um bilhão de pessoas e é o quarto alimento mais produzido no mundo, cultivada em mais de 125 países, sua produção é superada apenas pelas culturas do trigo, milho e o arroz, atingindo uma produção anual com cerca de 385 milhões de toneladas.

Apesar das adaptações apresentadas pela cultura, acredita-se que devido às alterações climáticas, a produção de batata deverá cair nas próximas décadas. Isso porque as mudanças climáticas podem alterar, dentre outros, a temperatura máxima do globo. O estresse por altas temperaturas é um dos fatores ambientais que mais interferem no desenvolvimento da cultura, afetando os rendimentos das lavouras de batata. As temperaturas elevadas reduzem a fotossíntese, promovem o aumento da respiração, inibindo o início da tuberização, ou provocando desordens fisiológicas nos tubérculos, e eleva o nível de glicoalcalóides gerando perda na qualidade das batatas e a baixa produtividade (HIJMANS, 2003; LEVY; VEILLEUX, 2007; CIP, 2013; RIBEIRO et al., 2014; DUTT et al., 2017).

Acredita-se que a influência dessas alterações no clima, sobre a biodiversidade brasileira vegetal, exige que novas estratégias sejam criadas e ou iniciadas, para produção e manejos agrícolas, que associem melhor adaptação das culturas, com produção sustentável e menor impacto ambiental. Frente a essas lacunas, é importante garantir a variabilidade genética, para o desenvolvimento de novas híbridas, que possam resistir e tolerar as adversidades futuras. Portanto, as estratégias de conservação *ex situ* são métodos viáveis e eficazes, que avalia o potencial de multiplicação *in vitro* dos diferentes genótipos de batata e ajusta os protocolos de conservação em longo prazo tornando o processo mais eficiente.

2.3.1 Espécies de batatas silvestre: *Solanum chacoense* Bitter

Dentre essas espécies, a *Solanum chacoense* Bitter é a mais utilizada em diversos estudos para o melhoramento genético, por apresentar resistência à sarna comum, sarna pulverulenta, perna negra, vírus do rolo de folha de batata (A, X, Y, F e foliar), e tolerância a estresses abióticos como seca e calor (HAWKES; HJERTING, 1969; MONTALDO, 1984; ROCHA et al., 2000; VINCENT, et al., 2013). Além de ser considerada tolerante a murcha bacteriana e a murcha de verticilo, ter resistência à podridão mole, produz raízes mais longas, com maior área de superfície in vitro, quando comparadas a materiais cultivados (CONCIBIDO, et al., 1994; MILBOURNE; PANDE; BRYAN, 2007; CHEN et al., 2013; CHRISTENSEN et al., 2017). Nativa da América do Sul, pode ser encontrada Argentina, Bolívia; Brasil; Peru; Paraguai e Uruguai (Figura 1) (VINCENT, et al., 2013).

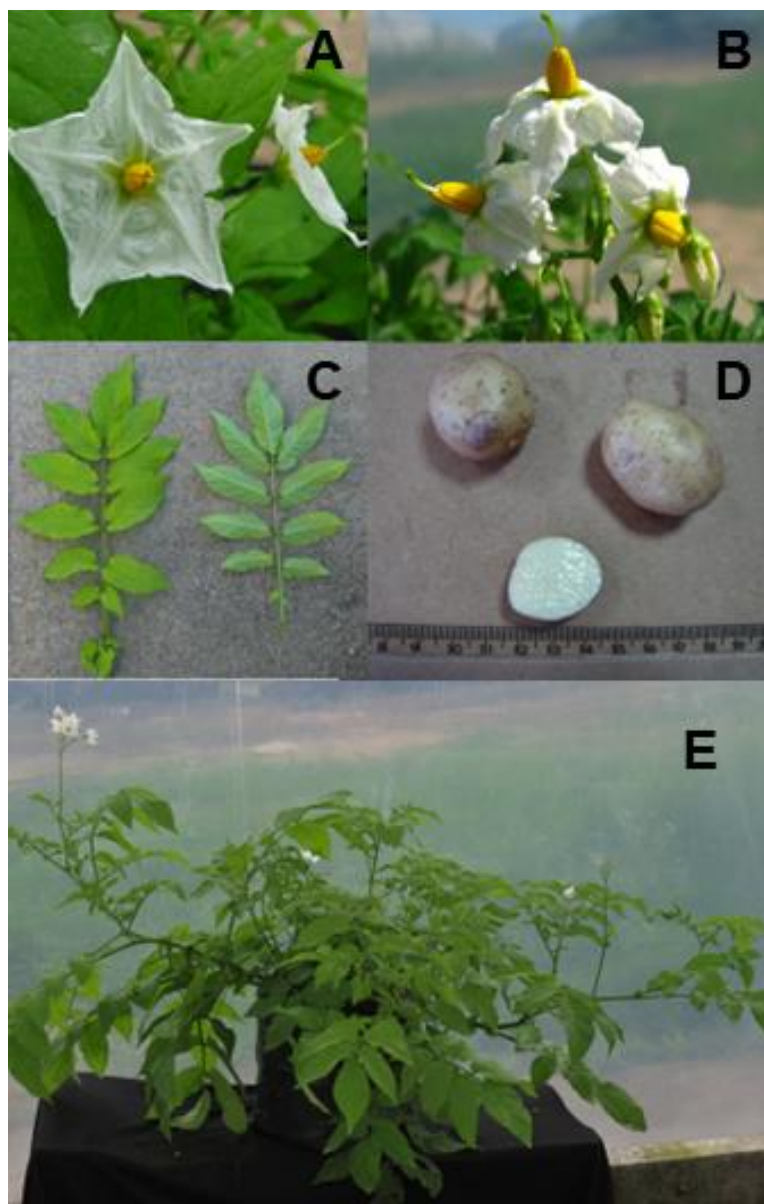


Figura 1: *Solanum chacoens* Bitter: A e B- Flores; C- Folhas; D-Tubérculo; E- Planta.

Fonte: Acervo BAG Batata-CPACT;

2.3.2 Espécies de batatas silvestre: *Solanum commersonii* Dunal

A *Solanum commersonii* Dunal possui uma variedade, *S. commersoni subsp. commersoni* Hawkes & Hjert, com maior representatividade em bancos de dados, sendo apontada em 540 registros (FLORA DO BRASIL, 2018; DAL MOLIN, 2017). Apresenta características como: tolerância à seca, a geada e resistência a doenças (*Streptomyces scabies*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas*

solanacearum) (Figura 2) (HAWKES; HJERTING, 1969; CARPUTO et al., 2009; TOMÉ, 2009).

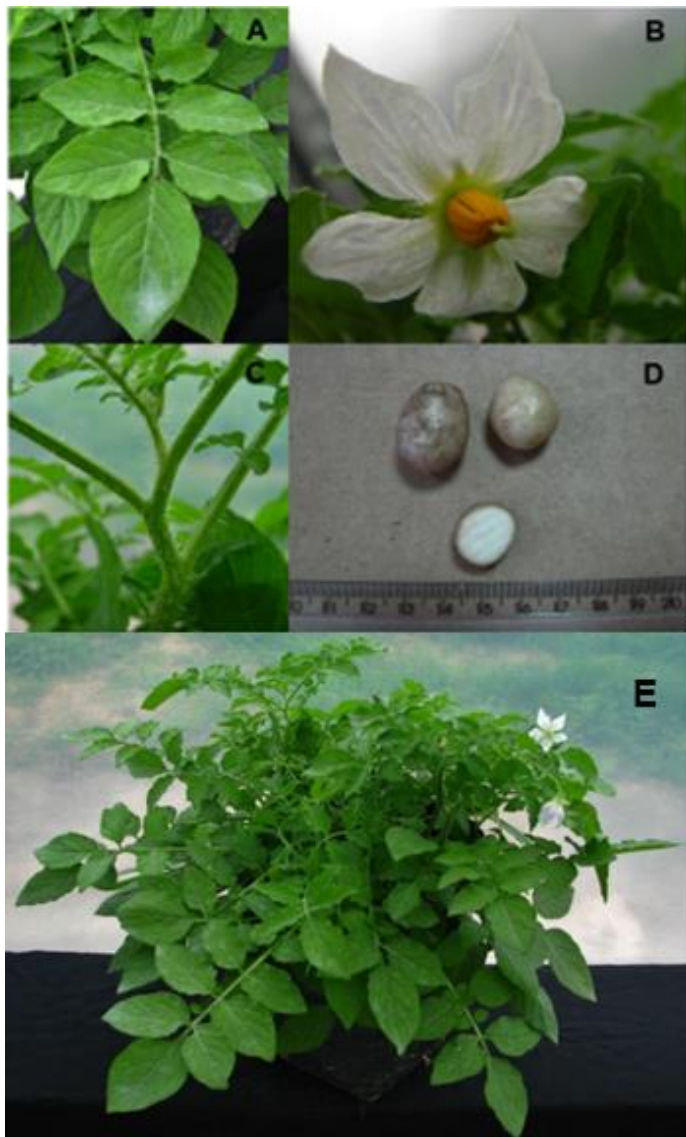


Figura 2: *Solanum commersonii* Dunal: A – folhas; B- flores; C- Caule e D- tubérculo.

Fonte: Acervo BAG Batata-CPACT

2.3.3 Espécies de batatas silvestre: *Solanum malmeanum* Bitter

Estudos recentes alteraram a taxonomia de batatas (*Solanum* sect. *Petota* Dumortier 1828) e consideraram a *S. malmeanum* como um táxon específico,

como a abordagem original de Bitter (1913). Atualmente são encontrados 97 registros da espécie entre o sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, no banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, são encontrados 11 acessos dessa espécie (SPOONER et al., 2016; NICOLAO, 2020). *Solanum malmeanum* Bitter apresenta especial interesse para o melhoramento genético, por possuir alto teor de matéria seca e elevado conteúdo de amido, além de ser resistente a doenças e estresses abióticos (TOMÉ, 2009) (Figura 3).



Figura 3: *Solanum malmeanum* Bitter; A – Pedúnculo das flores; B- flores; C- Caule e D- tubérculo.

Fonte: Acervo BAG Batata-CPACT

2.3.4 Espécies de batatas silvestres: *Solanum calvescens* Bitter

Solanum calvescens Bitter, por ser encontrada em Minas Gerais e São Paulo, regiões que predominam o clima tropical de altitude, indicando o potencial para tolerância a estresses bióticos e abióticos. Contudo, essa espécie possui má formação das anteras, as quais são estéreis e não produzem pólen, dificultando o autocruzamento e seu uso como genitora masculina (DAL MOLIN, 2017; KLASSEN; CASTRO; HEIDEN, 2017). Os estudos com essa espécie ainda são incipientes, não havendo relatos sobre seu desenvolvimento e suas respostas aos estresses abióticos e bióticos, muitos autores a consideram como um sinônimo de *S. cacheense* Bitter (DAL MOLIN, 2017) (Figura 4).

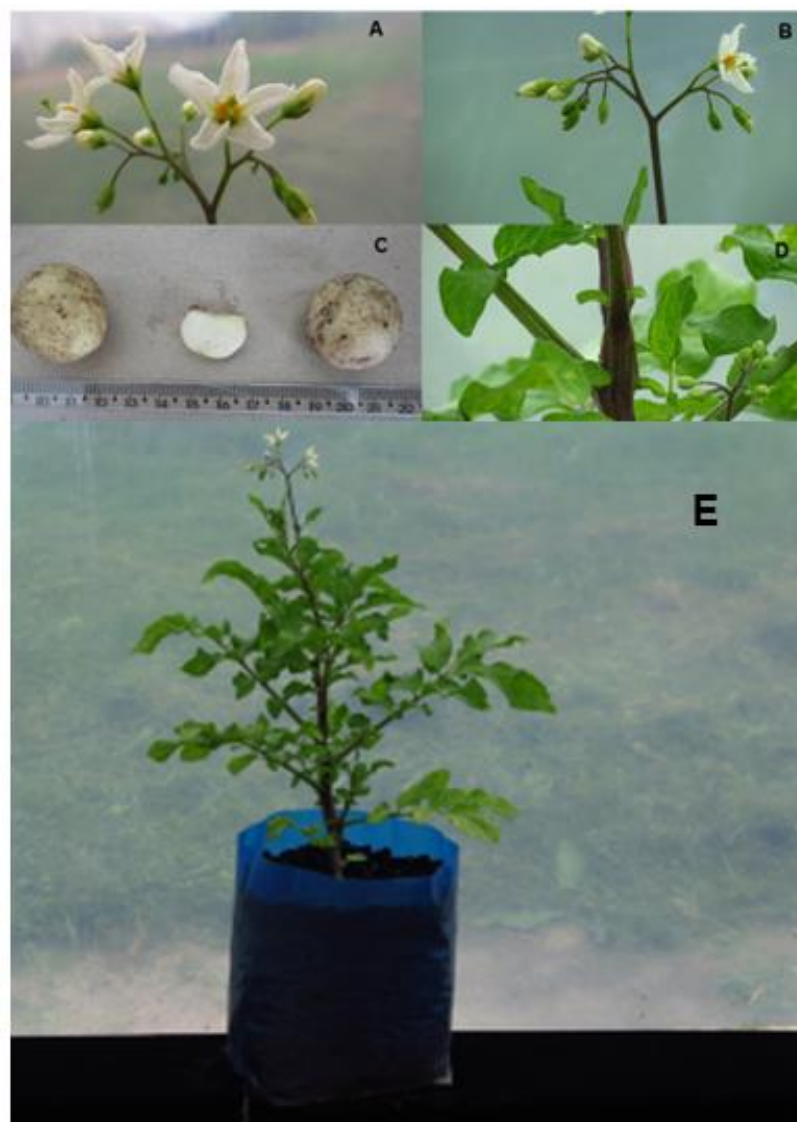


Figura 4: *Solanum calvescens* Bitter, A – flores; B- flores; C- Tubérculo e D- caule. **Fonte:** Acervo BAG Batata-CPACT

2.4 Sementes botânicas de batatas silvestres

O centro de diversidade da batata está localizado na região dos Andes, sul do Peru e norte da Bolívia, acredita-se que a batata foi domesticada há mais de 2.000, anos às margens do lago Titicaca (FILGUEIRA, 2008; MACHIDA-HIRANO, 2015). As espécies selvagens relacionadas a culturas agrícolas (parentes silvestres de culturas, ou CWR), podem aumentar a capacidade adaptativa dos sistemas agrícolas em todo o mundo (DEMPEWOLF et al., 2017). Mas as análises de taxonomia mais recentes reduziu o número de espécies em cerca de metade (SPOONER et al., 2014). Por isso, é tão grande a preocupação com a conservação de parentes silvestres, para garantir o futuro das culturas alimentares, diante das alterações climáticas.

A batata pode ser propagada sexuadamente (por semente botânica) e assexuadamente por meio de tubérculos, e os tubérculos de batata semente são utilizados para multiplicação e produção (MIHAELA, 2012). A reprodução sexuada é importante para o melhoramento genético da batata, porém, poucos esforços de pesquisa têm se concentrado na otimização da produção de sementes de batata (LINDHOUT et al., 2011; JANSKY et al., 2016).

Os anos de utilização da cultura pode conduzir à redução do rendimento ou qualidade da batata-semente. O acúmulo de patógenos e pragas no material de plantio devido a sucessivos ciclos de propagação vegetativa é um dos fatores que onera a cultura (SHARMA et al., 2016). Portanto, as práticas de melhoramento que promovem a produção de sementes bem sucedida, removendo as restrições genéticas e ambientais à fertilidade, permitem a eficiência da implementação do melhoramento molecular de batata (BETHKE; JANSKY, 2021).

Vários são os trabalhos que utilizam as espécies silvestres como base, sendo reconhecido entre 287 acessos, representando 40 espécies silvestres de *Solanum* (ROGOZINA et al., 2019). Estudos relatam que 83 espécies CWR devem perder mais de 50% de sua distribuição atual até 2070, e 39 CWRs possivelmente terão uma redução de mais de 50% de sua diversidade genética (VICENTE et al., 2019). Para garantir a diversidade genética, é importante manter parentes silvestres em bancos de germoplasma, como populações de sementes botânicas, e essa possibilidade pode apresentar vantagens práticas,

sobre a propagação clonal *in vitro* ou de tubérculos (BAMBERG; DEL RIO, 2020).

A manutenção de batatas selvagens e os mecanismos naturais e culturais do fluxo gênico são cruciais para a conservação *in situ* e geração de variação da batata (RONDINEL et al., 2021). Além disso, os métodos para produção e distribuição de sementes de batata verdadeiras diplóides (TPS) são essenciais para a criação de batata híbrida endogâmica (NASHIKI; JANSKY; BETHKE, 2021). Dessa forma, a criopreservação, além de permitir o armazenamento em longo prazo de sementes botânicas, pode auxiliar na eliminação de vírus de clones, o uso da biotecnologia pode ainda agregar com bioensaios em massa e seleção de sementes, pólen ou somaclones com características de interesse para produção (BAMBERG, 2016). Diante desse contexto, as ações e pesquisas que visem à conservação de recursos genéticos vegetais, devem se voltar para estratégias eficientes que permitam a disponibilidade desses recursos no futuro, como as estratégias de conservação *ex situ* (Figura 5 e 6).



Figura 5: *Solanum sp.* a e b frutos
Fonte: Fonte: Acervo BAG Batata-CPACT

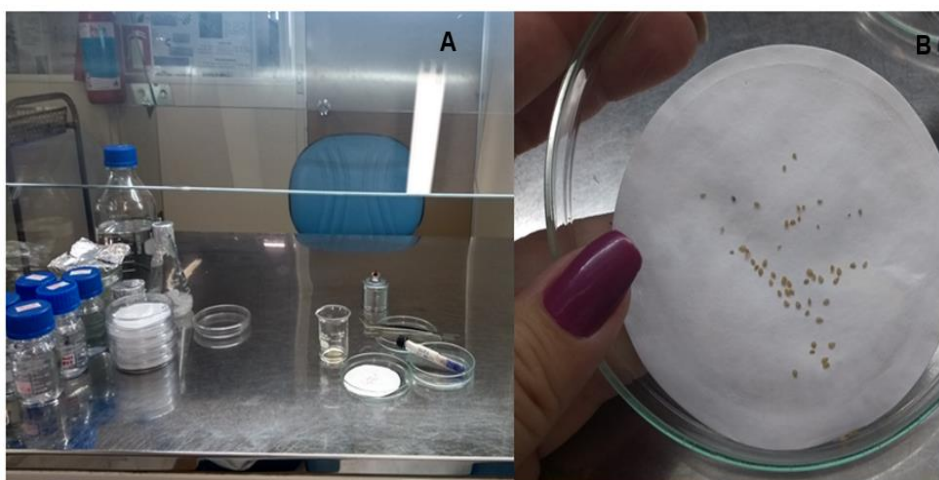


Figura 6: *Solanum commersonni* Dunal. a câmara de fluxo e b sementes botânicas de acessos de batata da EMBRAPA Clima Temperado
Fonte: Marisa Taniguchi

3. Materiais e métodos

3.1 Material vegetal

Plantas cultivadas in vitro, plantas cultivadas ex vitro e sementes de espécies oriundas do banco ativo de germoplasma de batata da Embrapa Clima Temperado foram utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos do banco ativo de germoplasma de batata da Embrapa Clima Temperado e respectivos experimentos realizados.

Material genético	Experimentos
Plantas cultivadas in vitro e ex vitro e sementes botânicas armazenadas em sílica gel:	
<i>Solanum chacoense</i> Bitter; <i>Solanum malmeanum</i> Bitter; <i>Solanum commersonii</i> Dunal; <i>Solanum calvescens</i> Bitter; <i>Solanum tuberosum</i> L.;	Micropropagação, unidades encapsuláveis Criopreservação Germinação

3.2 Micropropagação

3.2.1 Estabelecimento in vitro (Segmentos nodais)

Material vegetal foi coletado em casa de vegetação e realizada a assepsia, com lavagem em água corrente por 5 minutos na câmara de fluxo laminar, imerso em álcool etílico a 70% durante um minuto, em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo), acrescidos de 2 gotas de Tween® 20, durante 3 minutos e enxaguadas três vezes, em água destilada estéril.

Segmentos nodais contendo uma gema e aproximadamente 1 cm de comprimento, foram excisados e inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de

sais (0, 25, 50, 75 e 100% dos sais minerais); $0,1\text{mgL}^{-1}$ de inositol; 30 g L^{-1} de sacarose e $2,5\text{ gL}^{-1}$ de Phytigel. O pH do meio foi ajustado para $5,8\pm 1$ antes da autoclavagem a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos.

Os explantes estabelecidos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com irradiância de fótons de $36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Aos 35 dias foram avaliados a regeneração dos segmentos nodais, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, o número de folhas. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, constituídas por um frasco contendo 5 explantes cada um.

3.2.2 Indução de brotações

Segmentos nodais contendo uma gema e aproximadamente 1 cm de comprimento foram excisados, de plantas mantidas in vitro e inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 6,6 e $8,8\text{ }\mu\text{M}$) de 6-benzilaminopurina (BAP), acrescidos de $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de inositol; 30 g L^{-1} de sacarose e 3 gL^{-1} de Phytigel. O pH do meio foi ajustado para $5,8\pm 1$ antes da autoclavagem a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com irradiância de fótons de $36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Aos 35 dias foram avaliados a regeneração e o número de brotos.

Após 35 dias de estabelecimento in vitro, realizaram-se os ciclos de subcultivo, sendo excisados segmentos nodais e multiplicados em meio MS. Este procedimento foi repetido a cada 30 dias, por um período de 6 meses para obtenção de material para os demais procedimentos. As plântulas estabelecidas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com irradiância de fótons de $36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, constituídas por um frasco contendo 5 explantes cada um (Figura 7).

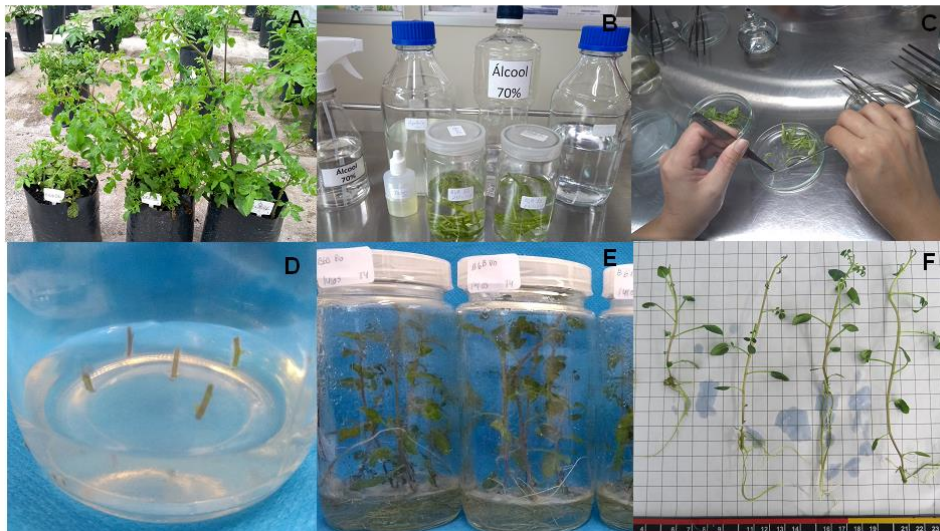


Figura 7. Plantas de batata silvestre estabelecidas no cultivo in vitro micropropagação: A- Plantas cultivadas em casa de vegetação; B- material coletado para assepsia; C- material sendo excisado em câmara de fluxo laminar; D segmentos nodais inoculados em meio de cultivo; E- plantas cultivadas in vitro; F- plantas com 30 dias de cultivo in vitro.

Fonte: Marisa Taniguchi.

3.2.3 Unidades encapsuláveis

Gemas axilares com aproximadamente 2 mm foram isoladas de plântulas de batata silvestre cultivadas in vitro e adicionadas à matriz de alginato de sódio 4% (w/v). A composição da matriz de encapsulamento foi constituída por alginato de sódio, dissolvida meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em diferentes concentrações de sais MS (T1- MS 0%; T2- MS 25%; T3- MS 50%; T4- MS 75%; T5- MS 100% dos sais minerais), suplementados com sacarose (20,0 g L⁻¹), inositol (0,1 g L⁻¹) e PVP - polivinilpirrolidona (1,0 g L⁻¹).

Em seguida, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM) por 20 minutos para complexação, posteriormente, imersas em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio e descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos. As unidades encapsuláveis foram então inoculadas em meio de cultivo MS, mantidas na ausência de luz por uma semana e sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 23 dias, quando analisou-se a porcentagem de germinação

de unidades encapsuláveis. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, compostas por um frasco, contendo cinco unidades encapsuláveis cada um (Figura 8).

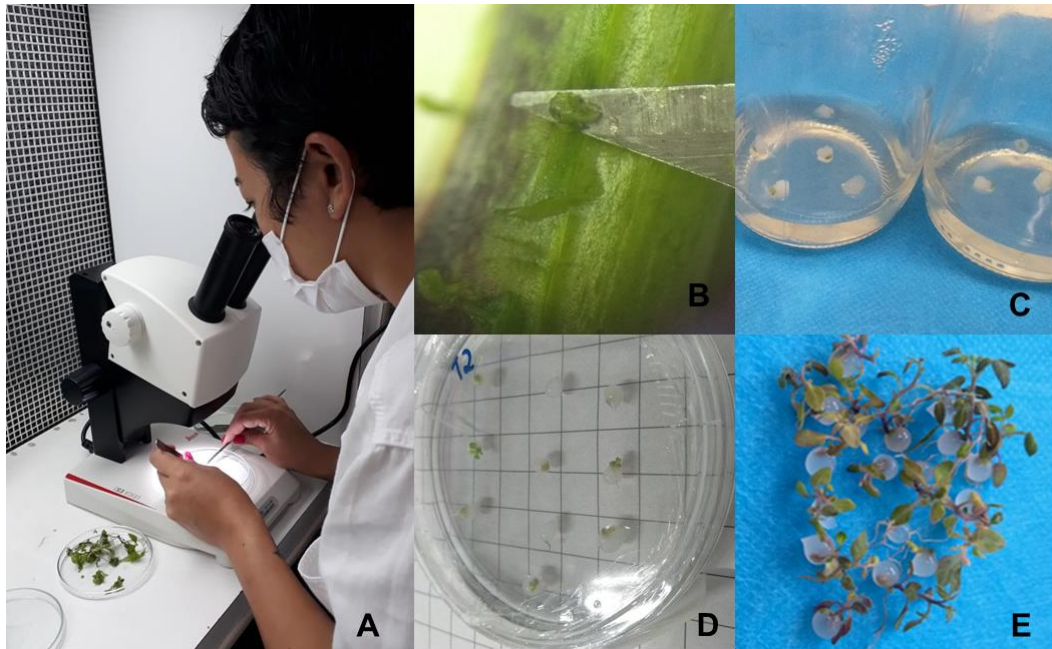


Figura 8. Plantas de batata silvestre excisadas para encapsulamento: A- Material vegetal para retirada dos explantes e gemas; B- Gema com primórdios foliares; C- Unidades encapsuláveis inoculadas em meio de cultivo; D- Unidades encapsuláveis inoculadas em placa com meio de cultivo; E- unidades encapsuláveis desenvolvidas com 30 dias (*S.Chacoensi*).

Fonte: Marisa Taniguchi.

3.2.4 Aclimatização

Ao final da etapa de multiplicação, com 4 meses de subcultivo, 30 plantas de cada espécie, sendo 10 parcelas com 3 repetições, foram transferidas para bandejas, preenchidas com substrato comercial Plantmax®. Aos 30 dias avaliou-se a taxa de sobrevivência, número de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz (Figura 9).



Figura 9. Plantas de batata silvestre cultivadas in vitro. A- Material vegetal após subcultivos; B- Plantas separadas para aclimatização; C- Plantas após plantio em bandejas com substrato; D- Plantas após 30 dias de aclimatização.

Foto: Marisa Taniguchi.

3.3 Criopreservação

3.3.1 Droplet vitrification

Gemas laterais com aproximadamente 1mm foram excisadas e adicionadas em meio de pré-cultivo MS, contendo 3 M de sacarose, por 20 horas. Posteriormente, foram tratadas com solução de carregamento (LS: 4, 4g MS + vitaminas MS; 137 g sacarose e 146 ml de glicerol) por 20 minutos, antes da imersão em solução crioprotetora (PVS2) a 0 °C, por diferentes tempos de imersão (0; 15; 30; 60 e 90 minutos). As soluções foram dissolvidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o pH ajustado para $5,8 \pm 1$, antes da microfiltração.

Após o tratamento em soluções crioprotetoras, as gemas foram dispostas em tiras de papel de alumínio (0,7 x 4,5 cm), contendo uma gota de solução crioprotetora PVS2, imersas em nitrogênio líquido por 2 horas e reaquecidas por 15 minutos em solução de descarregamento (RS: 4,4 g MS + Vitaminas MS, 410, 6 g sacarose) à temperatura ambiente (SAKAI et al.,1990). Posteriormente, as gemas foram inoculadas em meio de pós-cultivo (MS +0,3 M de sacarose) e mantidas por 20 horas no escuro, transferidas para meio MS e transferidas para

fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Delineamento foi inteiramente casualizado, foram usadas 3 repetições, compostas por 3 placas de Petri, contendo 10 gemas encapsuladas cada uma. Após 30 dias foram avaliados a porcentagem de regeneração das gemas encapsuladas.

3.3.2 Adaptação da constituição da matriz de encapsulamento para criopreservação

Gemas axilares de aproximadamente 1 mm foram excisadas de plantas cultivadas in vitro e adicionadas a matriz de alginato de sódio 4% (w/v), constituída por alginato de sódio dissolvidas em meio MS (50%), acrescidos de sacarose ($20,0 \text{ g L}^{-1}$), inositol ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e PVP ($1,0 \text{ g L}^{-1}$). Em seguida, com o auxílio de pipeta automática, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM), permanecendo por 20 minutos para complexação.

Posteriormente, as cápsulas foram imersas em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio, descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos, as cápsulas foram imersas em meio MS líquido acrescido com sacarose (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 M) e suplementado com 1 M de glicerol por 20 horas, sob constante agitação (150 rpm), para pré-cultivo.

3.3.3 Encapsulamento-Vitrificação

Após o período de pré-cultivo, as unidades encapsuladas foram desidratadas em sílica gel por uma hora e tratadas com solução de carregamento por 20 minutos antes da imersão em solução de vitrificação 2 (PVS2), constituída de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose; 30% de glicerol; 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,8, a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos.

Após o tratamento com PVS2, as cápsulas foram inseridas em tubos de criopreservação de 10 mL com PVS2 e imersas em nitrogênio líquido por 5 dias, sofreram reaquecimento em banho-maria a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por três minutos e foram

imersas em solução de descarregamento a 25 °C por 15 minutos. Após a criopreservação, as cápsulas foram inoculadas em meio de estabelecimento e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Delineamento foi inteiramente casualizado, com 3 repetições, compostas por 3 placas de Petri contendo 10 gemas encapsuladas cada uma. Após 30 dias foram avaliados a porcentagem de regeneração das gemas encapsuladas.

3.3.4 Otimização das técnicas de criopreservação: Encapsulamento; crio placa e droplet vitrificação

Gemas apicais de batata, com aproximadamente 1mm, foram excisadas de plantas cultivadas in vitro e divididas em 4 tratamentos: T1- Encapsuladas criopreservadas; T2- Encapsuladas, saturadas e criopreservadas; T3- Crio-placa e T4- droplet vitrificação.

Para os tratamentos de encapsulamento: T1 e T2 as gemas foram adicionadas a matriz de alginato de sódio 3,5% (w/v), constituída por alginato de sódio dissolvidas em meio MS (50%), acrescidos de sacarose (20,0 g L⁻¹), inositol (0,2 g L⁻¹) e PVP (1,0 g L⁻¹). Em seguida, com o auxílio de pipeta automática, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM), permanecendo por 20 minutos para complexação. Posteriormente, as cápsulas foram imersas em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio, descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos, as cápsulas foram adicionadas em meio de pré-cultivo MS com 3 M de sacarose, 1 g L⁻¹ de PVP e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, por 20 horas no escuro. Após o período de pré-cultivo em 3 M de sacarose, as cápsulas do tratamento T, foram desidratadas em sílica gel por uma hora, enquanto o tratamento T2 passou por 30 minutos de imersão em solução de saturação (composta por sacarose 3M) e posterior desidratação em sílica gel por uma hora. Ambos os tratamentos foram então imersos em solução de carregamento por 20 minutos, depois tratados com solução de vitrificação 2 (PVS2), constituída de 0,4 mol L⁻¹ de sacarose; 30% de glicerol; 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,8, a 0 °C

por 50 minutos. Após o tratamento com PVS2, as cápsulas foram inseridas em tubos de criopreservação de 10 mL com PVS2 e imersas em nitrogênio líquido por 5 dias; foram então descongeladas em banho-maria a 40 °C por três minutos e imersas em solução de descarregamento (RS) a 25 °C por 15 minutos. Posteriormente, as gemas foram inoculadas em meio de pós-cultivo (MS +0,3 M de sacarose) e mantidas por 20 horas no escuro, transferidas para meio MS, e transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 27 ± 2 °C.

Para o tratamento com crio placa - T3 - as gemas excisadas foram adicionadas em meio de pré-cultivo MS com 0,3M sacarose, 1 g L⁻¹ de PVP e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, por 20 horas no escuro. Após o período de pré-cultivo, foram resgatadas e adicionadas em uma gota de matriz de alginato de sódio 3,5% (w/v), constituída por alginato de sódio dissolvidas em meio MS (50%), acrescidos de sacarose (20,0 g L⁻¹), inositol (0,2 g L⁻¹) e PVP (1,0 g L⁻¹), acomodada em uma crio placa (adaptada). Foram desidratadas em sílica gel por uma hora e tratadas com solução de carregamento por 20 minutos antes da imersão em solução de vitrificação 2 (PVS2), constituída de 0,4 mol L⁻¹ de sacarose; 30% de glicerol; 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,8), a 0 °C por 50 minutos. Após o tratamento com PVS2, as crio placas foram inseridas em nitrogênio líquido por 2 horas, sofreram reaquecimento em banho-maria a 40 °C por três minutos e foram imersas em solução de descarregamento a 25 °C por 15 minutos. Posteriormente, as gemas foram inoculadas em meio de pós-cultivo (MS +0,3 M de sacarose) e mantidas por 20 horas no escuro, transferidas para meio MS e transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 27 ± 2 °C.

Para o tratamento de droplet vitrificação - T4 - as gemas excisadas foram adicionadas em meio de pré-cultivo MS com 0,3M sacarose, 1 g L⁻¹ de PVP e 2,5 g L⁻¹ de phytigel, por 20 horas no escuro. Após o período de pré-cultivo, foram resgatadas e tratadas com solução de carregamento por 20 minutos antes da imersão em solução de vitrificação 2 (PVS2), constituída de 0,4 mol L⁻¹ de sacarose; 30% de glicerol; 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,8), a 0 °C por 50 minutos. As gemas foram dispostas em tiras de papel de alumínio (0,7 x 4,5 cm), contendo uma gota

de solução crioprotetora PVS2, imersas em nitrogênio líquido por 2 horas e reaquecidas por 15 minutos em solução de descarregamento (RS: 4,4 g MS + Vitaminas MS, 410, 6 g sacarose) à temperatura ambiente (SAKAI et al.,1990). Posteriormente, as gemas foram inoculadas em meio de pós-cultivo (MS +0,3 M de sacarose) e mantidas por 20 horas no escuro, transferidas para meio MS, de estabelecimento (2.2.1) e transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 10 e 11).

Delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições, compostas por 5 frascos, com 5 explantes cada um. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de regeneração.

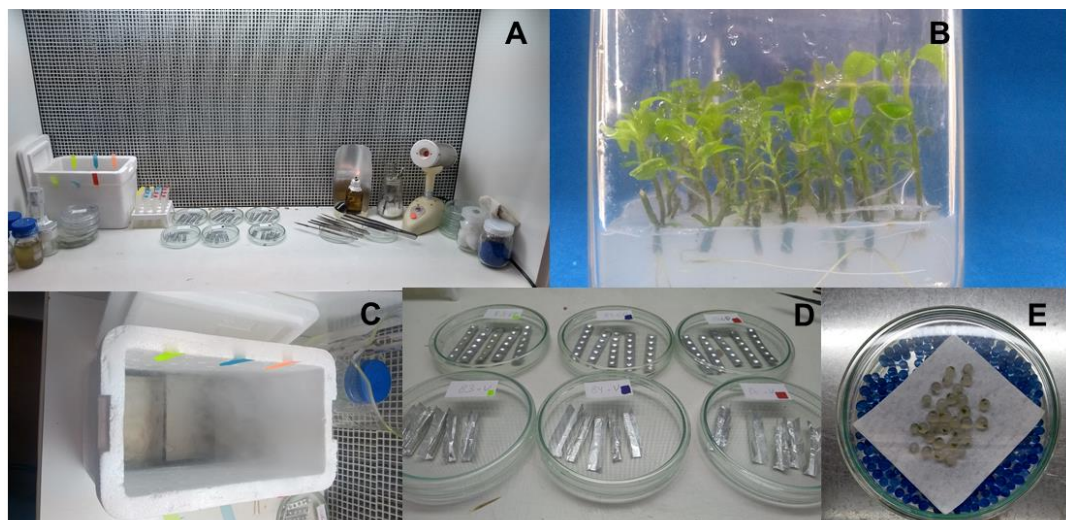


Figura 10. Procedimento para criopreservação: A- Câmara de fluxo laminar com material; B- Material vegetal para retirada dos explantes; C- Caixa de isopor com separação dos tratamentos em recipientes; D- Placas de petri com crioplaquetas e tiras de alumínio; E- Placa com sílica gel e unidades- encapsuláveis de *S. Chacoensi*.

Fonte: Marisa Taniguchi.

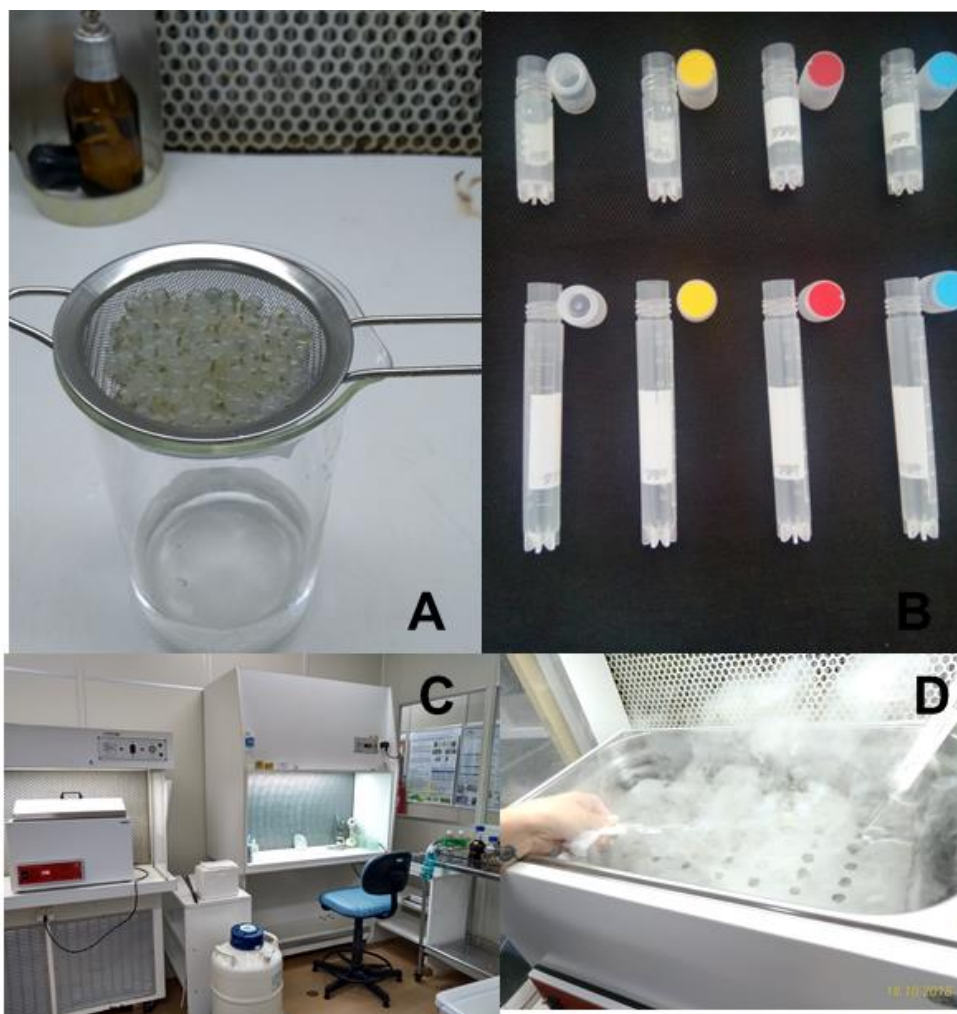


Figura 11. Procedimento para criopreservação: A- Unidades encapsuláveis após lavagem; B- Crio tubos; C- Câmara de fluxo laminar, galão de nitrogênio e banho-maria para o descongelamento; D- descongelamento do material crio preservado em banho-maria

Fonte: Marisa Taniguchi.

3.4 Cultivo in vitro de sementes botânicas de batata silvestre

Foram utilizadas sementes botânicas (armazenadas em sílica gel), foram imersas em álcool etílico a 70% durante um minuto, em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo), acrescidos de 2 gotas de Tween® 20, durante 3 minutos e enxaguadas três vezes, em água destilada estéril.

Após desinfestadas, as sementes foram colocadas em papel Germitest® autoclavado, umedecido, 2,5 vezes o seu peso (BRASIL, 2009) com soluções microfiltradas de giberelina (GA_3) a 250, 500, 750 e 1000 μM . O tratamento testemunha constou de umedecimento com água. Após o período de imersão, de 20 horas, as sementes passaram por nova assepsia em álcool etílico a 70%

durante um minuto e solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo + 2 gotas de Tween© 20), durante 3 minutos. Posteriormente, as sementes foram secas em papel Germitest© e inoculadas em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de inositol e 3 g L⁻¹ de Phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C, durante 20 minutos.

Após inoculadas, as sementes foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas com irradiância de fótons de 36 µmol m⁻²s⁻¹. Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de germinação. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições, compostas por cinco tubos, cada tubo com uma semente, no tal de 25 sementes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as frequências pelo teste de Tukey com probabilidade de 5% de erro. O software estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2014).

3.4.1 Criopreservação de sementes botânicas

Foram utilizadas sementes botânicas (armazenadas em sílica gel), desinfestadas com álcool etílico a 70% durante um minuto e hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo + 2 gotas de Tween© 20), durante 3 minutos e enxaguadas três vezes, em água destilada estéril.

As sementes foram secas em papel Germitest© e posteriormente, foram tratadas com solução de carregamento (LS: 4,4g MS + vitaminas MS, 137 g sacarose e 146 ml de glicerol) por 20 minutos e imersas em solução crioprotetora (PVS2) a 0 °C, por diferentes tempos de imersão (0, 15, 30, 60 minutos). As soluções foram dissolvidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com pH ajustado para 5,8±1 antes da microfiltração.

Após o tratamento em soluções crioprotetoras, as sementes foram imersas em nitrogênio líquido por 44 horas, descongeladas em banho-maria a 37±2 °C) por dois minutos, mantidas por 15 minutos em solução de

descarregamento (RS: 4,4 g MS + vitaminas MS; 410,6 g sacarose), à temperatura ambiente (SAKAI et al.,1990), foram colocadas em papel Germitest® autoclavado, umedecido, 2,5 vezes o seu peso com solução microfiltrada de giberelina (GA₃) 250 µM, por 20 horas no escuro e posteriormente foram inoculadas em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 gL⁻¹ de inositol e 3 gL⁻¹ de Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C, durante 20 minutos.

Após, inoculadas as sementes foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, 80% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas com irradiância de fótons de 36 µmol m⁻²s⁻¹. Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de germinação. Sendo o delineamento experimental realizado inteiramente casualizado, com 5 repetições, constando cada repetição de um frasco, com 5 sementes cada um.

4 Análise estatística

O delineamento experimental realizado inteiramente casualizado. Os dados não paramétricos serão submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® comparando as frequências pelo teste exato de Tukey com probabilidade de 5%. Já os dados paramétricos, serão submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011), comparando as frequências pelo teste de Skott-knott com probabilidade de 5%.

5. Resultados e discussões

5.1 Micropropagação

No estabelecimento in vitro, não houve diferença significativa para regeneração das gemas *S. chachoense* e *S. malmeanum* cultivadas in vitro, para *S. calvencens* 25% e 50% do sais do Meio MS, apresentaram maior número de gemas regeneradas, para o número de brotos não houve diferença significativas para nenhum acesso de batata silvestre (Tabela 2; Figura 12).

Tabela 2. Número de plantas regeneradas (NR) e número de brotos (NB), de batatas silvestres inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de sais minerais. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamento MS (%)	<i>S. chachoense</i>		<i>S. malmeanum</i>		<i>S. calvencens</i>	
	NR	NB	NR	NB	NR	NB
0,0	5.0 *ns	5.0 *ns	5.2 *ns	5.0 *ns	2.8 b	3.0*ns
25	5.0	7.2	3.6	5.0	3.0 b a	3.4
50	5.0	5.0	5.2	4.4	4.4 a	3.2
75	5.0	6.0	4.6	4.0	2.6 b	3.6
100	5.0	6.2	6.0	4.4	2.4 b	2.2
c.v. (%):	0.0	21.38	30.82	18.61	27.41	27.16

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.*ns (não significativo).



Figura 12. Plantas de batata silvestre estabelecidas in vitro: A- *S. chachoense* B- *S. malmeanum*; C- *S. calvencens* com 30 dias.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Para as variáveis analisadas na multiplicação de segmentos nodais, também não houve diferença significativa, entre as concentrações de BAP (Tabela 3; Figura 13).

Tabela 3. Número de plantas regeneradas (NR) e número de brotos (NB), de batatas silvestres inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamento	<i>S. chachoense</i>		<i>S. malmeanum</i>		<i>S. calvencens</i>	
BAP (μ M)	NR	NB	NR	NB	NR	NB
0,0	5.0 *ns	5.6 *ns	5.0 *ns	6.2 *ns	2.8 *ns	3.0 *ns
2,2	4.4	7.0	5.0	6.4	2.4	3.4
4,4	4.8	6.2	4.4	7.0	2.2	2.2
6,6	4.8	4.8	4.0	7.6	2.0	2.8
8,8	4.2	8.0	4.4	9.6	1.8	2.2
c.v. (%):	16.41	36,30	18.61	42.14	44.19	50.41

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. *ns (não significativo).

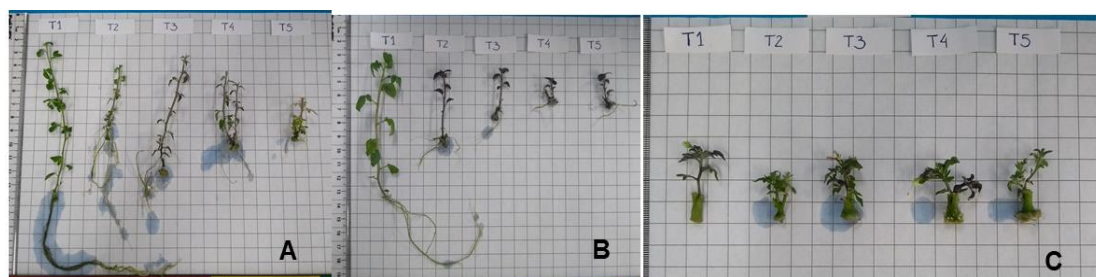


Figura 13. Plantas de batata silvestre estabelecidas in vitro cultivadas com BAP: A- *S. chachoense* B- *S. malmeanum*; C- *S. calvencens* com 30 dias.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Na aclimatização foi possível obter 90% de sobrevivência para *S. calvencens*, 100% *S. malmeanum* e 90% para *S. chachoense*, utilizadas plantas depois de 4 subcultivos. Foi observada diferença significativa sobre o tamanho da parte área, entre as espécies, sendo que *S. calvencens* teve menor número de folhas e menor comprimento da parte área (Tabela 4; Figura 14).

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência de plantas aclimatizadas de *S. malmeanum*, *S. chachoense* e *S. calvencens*, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Espécie	Sobrevivência%	Número de folhas	Parte aérea (cm)	Raíz (cm)
<i>S. calvencens</i>	90 *ns	8.22 b	8.22 b	5.6 *ns
<i>S. malmeanum</i>	100	16.65 a	16.65 a	6.5
<i>S. chachoense</i>	90	15.20 a	15.20 a	7.03
c.v. (%):	11.63	32.49	32.49	45.15

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro. *ns (não significativo).

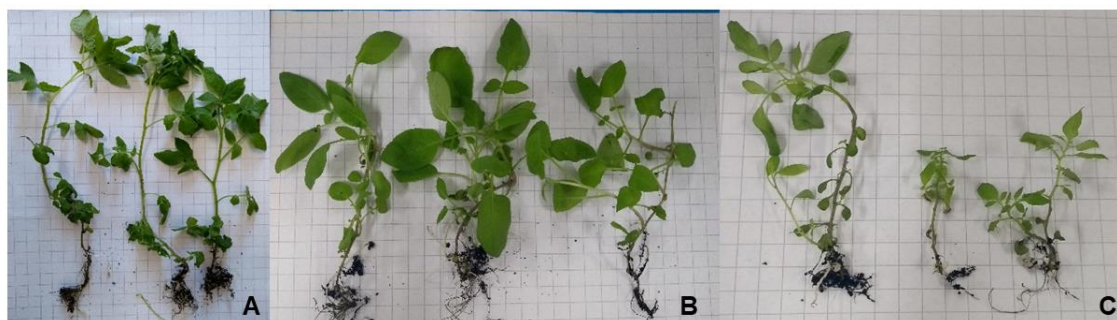


Figura 14. Plantas de batata silvestre com 30 dias após aclimatizadas: A- *S. chachoense* B- *S. malmeanum*; C- *S. calvencens* com 30 dias.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Não houve diferença significativa para o número de raízes, as plantas de batata silvestre derivadas da micropropagação (no quarto subcultivo). As plantas foram acompanhadas até o final do ciclo, após aclimatizadas, foi observada a formação de tubérculos normais (Figura 15).

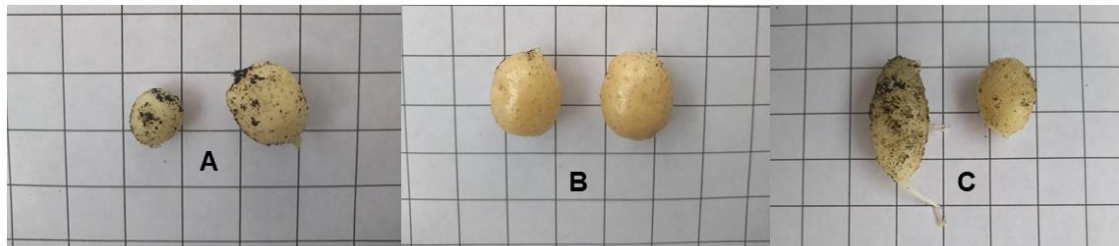


Figura 15: Tubérculos de batata silvestre: A- *S. chachoense*; B- *S. malmeanum*; C- *S. calvencens*.

Fonte: Marisa Taniguchi

O início do estabelecimento in vitro até a etapa de aclimatização, passam por etapas importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Para as espécies de batatas silvestre, observa-se que elas apresentam rápido desenvolvimento in vitro, assim como a parente cultivada *Solanum tuberosum* L.. Porém, elas têm grande resistência, em meios de cultivo com menor quantidade de sais, foi observado o início do seu processo de tuberização, realocando as energias, para formação de tubérculos aos 40 dias (Figura 18).



Figura 16: Tubérculos de *S. calvencens*.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Durante o cultivo in vitro, as plantas desenvolveram-se em condições de baixa luminosidade, alta umidade e com fonte de carbono no meio de cultura. É preciso observar esses pontos, que podem contribuir para o desenvolvimento de um fenótipo que não sobrevive às condições ambientais se transferidos diretamente para o campo (HAZARIKA, 2003). Assim, as características fisiológicas e anatômicas de plantas micropropagadas exigem que elas sejam gradualmente aclimatizadas ao ambiente (estufa ou campo). Mas, foi verificado nesse trabalho, que não há necessidade de usos de reguladores de crescimento, para realizar o enraizamento, de espécies de batata silvestre. Após o estabelecimento in vitro, é possível realizar a aclimatização de plantas bem desenvolvidas e com raízes bem formadas, com 30 dias de cultivo in vitro.

Resultados positivos no processo de aclimatização irão depender da plasticidade morfoanatômica e fisiológica de cada espécie. Mesmo diante dessas limitações, a micropropagação é uma técnica indicada para espécies que apresentam dificuldade de conservação de sementes ou germinação e facilita o intercâmbio de germoplasma, com a possibilidade de obtenção de plantas saudáveis e em larga escala, idênticas a matriz. Para o sucesso deste modo de propagação e cultivo é preciso utilizar de forma equilibrada os reguladores de crescimento, bem como os nutrientes no meio de cultura e fornecer fotoperíodo e temperatura adequados, proporcionando a regeneração in vitro dos explantes.

5.2 Unidades Encapsuláveis

Para formação de unidades encapsuláveis de *S. chacoense*, foi observado diferença entre os tratamentos e a redução da germinação no tratamento com 100% dos sais minerais (T5), não havendo diferença significativa na germinação das cápsulas entre os tratamentos T1, T2 e T3 (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de germinação de unidades encapsuláveis, com a matriz de encapsulamento com diferentes concentrações de sais MS. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamento % MS	Germinação
0	85a
25	40 b
50	96 a
75	68ab
100	20c
c.v. (%):	18,35

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.*ns (não significativo).

Foi observado que no tratamento T3 com 50% dos sais minerais, houve melhor desenvolvimento das plantas (Figura 16 e 17).

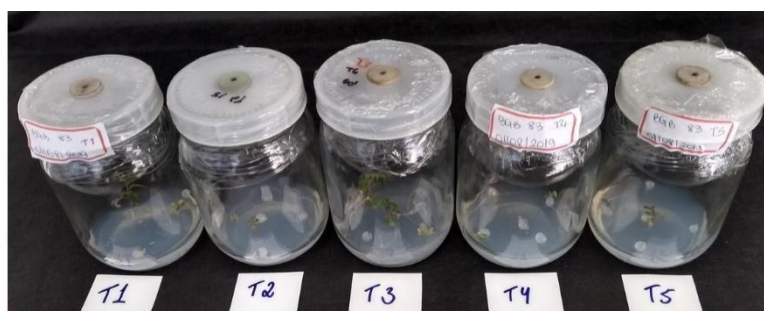


Figura 17. Unidades encapsuláveis de *S.Chacoensi*. (T1- MS 0%, T2- MS 25%; T3- MS 50%; T4- MS 75%; T5- MS 100% dos sais minerais)

Fonte: Marisa Taniguchi.



Figura 18. Unidades encapsuláveis desenvolvidas com 30 dias de *S. Chacoensi*. (T1- MS 0%, T2- MS 25%; T3- MS 50%; T4- MS 75%; T5- MS 100% dos sais minerais)

Fonte: Marisa Taniguchi.

Para formação de unidades encapsuláveis, apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos T1 (0%), T3 (50%) e T4 (75%), observou um desenvolvimento melhor da parte área e raiz no tratamento T3. Para reduzir danos no material resgatado do campo, assim como para atender a demanda de acessos silvestres auto incompatíveis e não-passíveis de conservação sob a forma de semente botânica, é possível indicar as unidades encapsuláveis conhecidas como “sementes sintéticas”, para conservação e inclusive para semeadura. Uma vez que, o encapsulamento é uma alternativa simples, barata e que permite a conservação de germoplasma. Além disso, o encapsulamento de tecido meristemático em hidrogel apresenta vantagens como a proteção dos propágulos, facilidade de armazenamento, transporte e regeneração de plantas completas, além de conservação genética e intercâmbio de germoplasma de forma segura e eficiente sem perda de viabilidade.

5.3 Criopreservação

5.3.1 Droplet vitrification

Para a técnica de *Droplet vitrification* observou-se a morte dos tratamentos criopreservados (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de germinação após a criopreservação ***Droplet vitrification***. embrapa clima temperado, Pelotas, RS, 2019.

PVS2 (minutos)	<i>Solanum chacoense</i>	<i>Solanum malmeanum</i>	<i>Solanum calvescens</i>
	(%) de Germinação após a criopreservação		
T1- Controle	20 a	65 a	65 a
T2- 0	32 a	0 b	72 b
T3-15	0 b	0 b	12 b
T4- 30	0 b	0 b	0 b
T5 -60	0 b	0 b	0 b
c.v. (%):	58,90	98,06	91,11

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Acredita que se o crioprotetor PVS2 foi tóxico, e prejudicou a regeneração dos explantes criopreservados, ao observar que o tratamento controle apresentou desenvolvimento normal (Figura 19)

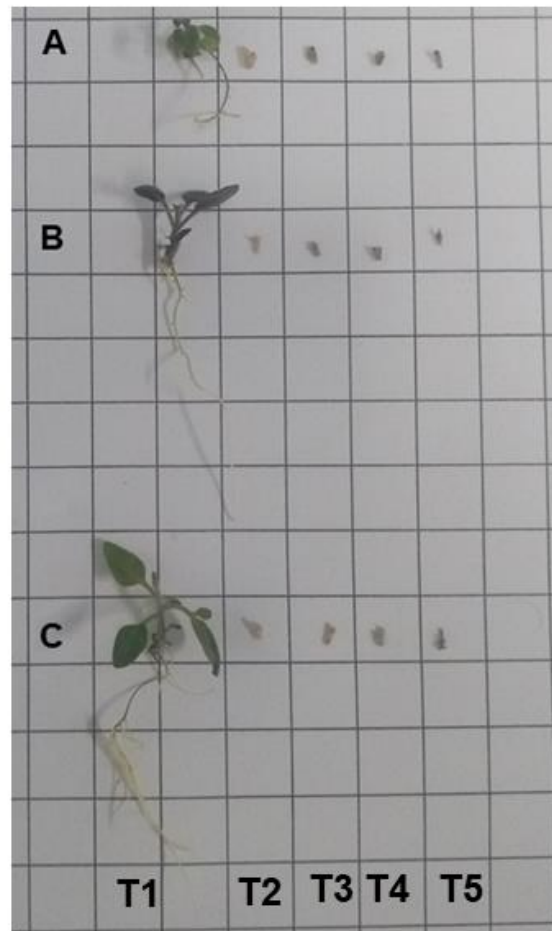


Figura 19: Plantas de batata silvestre germinadas : A- *Solanum chacoense*; B- *Solanum malmeanum* C- *Solanum calvescens*. Tratamento T1- 0; T2-15; T3- 30; T4- 60 e T5- 90 minutos de imersão em PVS2.

Fonte: Marisa Taniguchi.

5.3.2 Encapsulamento e vitrificação

Para o encapsulamento e vitrificação todos os tratamentos apresentaram germinação das cápsulas criopreservadas (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de germinação após a criopreservação em nitrogênio líquido. embrapa clima temperado, pelotas, rs, 2019.

Solução de sacarose Molar	<i>Solanum chacoense</i>	<i>Solanum malmeanum</i>	<i>Solanum calvescens</i>
	(%) de Germinação após a criopreservação		
T1- Controle	74 a	90a	64 a
T2- 0,25	64a	70ab	64 a
T3-0,5	54a	57bc	60 a
T4- 0,75	64a	47c	70 a
T5 – 1,0	64a	54bc	60 a
c.v. (%):	23,06	12,23	23,03

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Aos 30 dias observou-se o desenvolvimento inicial de raízes e folhas, para *S. chacoense* e *S. calvencens* não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas para *S. malmeanum* no tratamento T2 (0,25 M de sacarose) houve maior germinação das cápsulas, após criopreservação 70% (Figura 20)

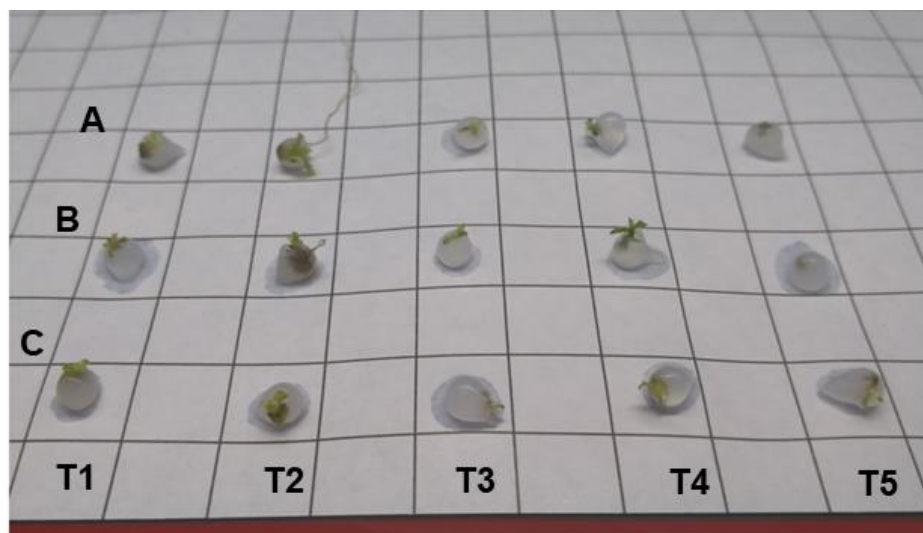


Figura 20. Unidades encapsuláveis criopreservadas: A- *Solanum chacoense*; B- *Solanum malmeanum* C- *Solanum calvescens*. Tratamento (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 M).

Fonte: Marisa Taniguchi.

5.3.3 Otimização das técnicas de criopreservação: Encapsulamento; droplet vitrificação e crio placa

Após os experimentos pilotos realizados, foi montando a otimização das técnicas consideradas mais promissoras para conservação a longo prazo, a metodologia de congelamento rápido, proporciona menos danos durante os processos, apesar da crioplaca e a droplet vitrificação serem consideradas técnicas eficientes, inclusive para espécies de *Solanum*. Nesse trabalho a criopreservação utilizando o encapsulamento de explantes e desidratação, apresentou melhores resultados para regeneração de explantes criopreservados, sendo T1- ENV (Encapsulamento e vitrificação) e T2- ENSV (Encapsulamento, saturação e vitrificação) os indicados para a criopreservação, apresentando para *Solanum chacoense*, 72% , para *Solanum malmeanum*, 82% e para *Solanum calvescens*, 88% de regeneração das capsulas (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de germinação após a criopreservação em nitrogênio líquido. T1- ENV - Encapsulamento e vitrificação; T2- ENSV- Encapsulamento, saturação e vitrificação; T3-CP- Crioplaca; T4- DP- Dropleti verificação. embrapa clima temperado, pelotas, rs, 2019.

TÉCNICA	<i>Solanum chacoense</i>	<i>Solanum malmeanum</i>	<i>Solanum calvescens</i>
	(%) de regeneração		
T1- ENV	76 a	44 ab	96 a
T2- ENSV	82 a	72 a	88 a
T3-CP	0 b	0 b	0 b
T4- DP	0 b	0 b	0 b
c.v. (%):	33,43	100,53	15,37

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Não houve diferença significativa para demais variáveis avaliadas número de raízes, número de folhas, número de broto entre os tratamentos T1 e T2 (Figura 21).

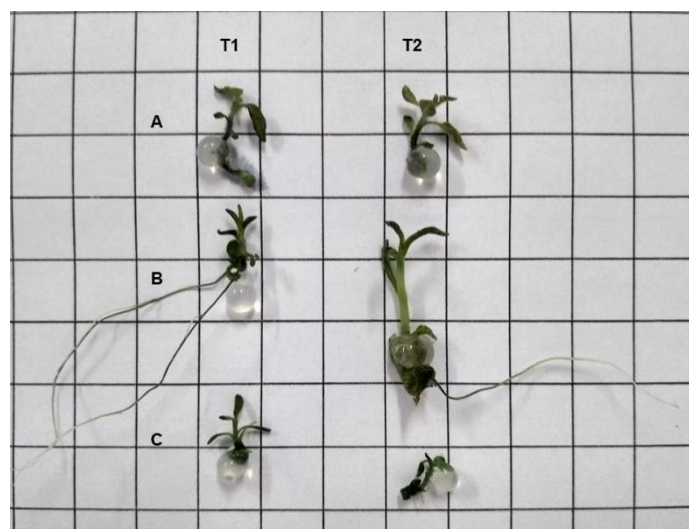


Figura 21: Plantas de batata silvestre excisadas para encapsulamento : A- *Solanum chacoense* Bitter; B- *Solanum malmeanum* Bitter; C- *Solanum calvescens* Bitter

Fonte: Marisa Taniguchi.

Nos tratamentos T3 (crioplaca) e T4 (droplet vitrificação), o material vegetal apresentou contaminação e não se desenvolveu, acredita-se que o manuseio devido as adaptações no processo de criopreservação podem ter contaminado o material, além disso, o próprio processo de excisão dos explantes causam danos, o que pode ter prejudicado também na regeneração (Figura 22).

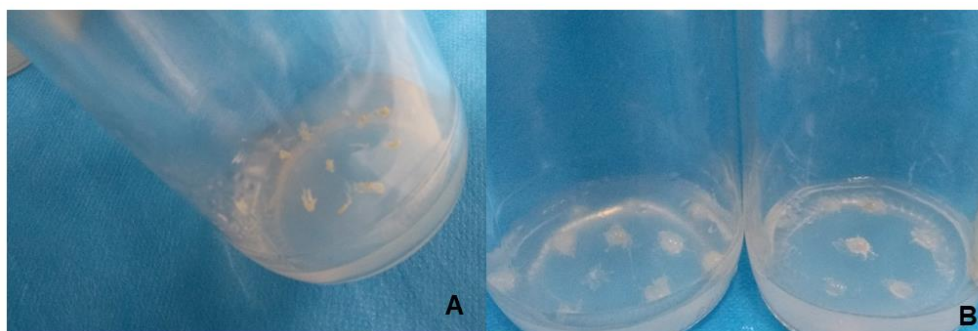


Figura 22. Resultado das técnicas de criopreservação aplicadas: A- material vegetal da droplet vitrificação contaminados e B- material vegetal derivado da criopreservação via crio placa contaminados.

Fonte: Marisa Taniguchi.

No material vegetal regenerado, após a criopreservação, as plantas se desenvolveram bem, assim como apresentaram formação de raízes bem desenvolvidas. Ao analisar os as imagens dos estômatos das plantas cultivadas in vitro, foi observada a formação dos estômatos, bem como sua abertura para trocas gasosas, assim como a formação de cloroplastos no seu interior (Figura 23).

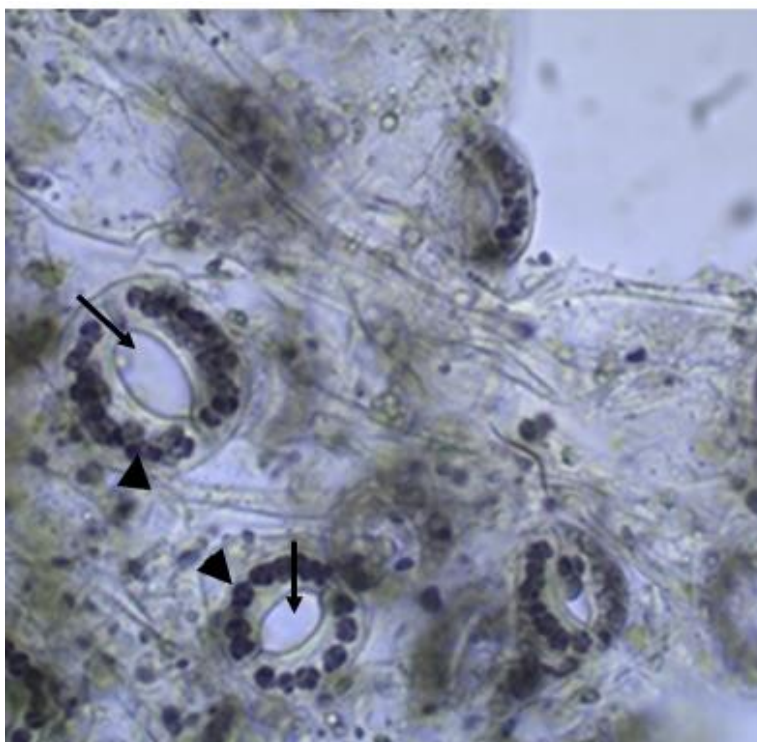


Figura 23. Estômatos da face adaxial foliar de plântulas após regeneração das gemas criopreservadas em nitrogênio líquido. Setas indicam abertura estomática e ponta das setas formação de cloroplastos.

Fonte: Marisa Taniguchi.

Estômatos são estruturas importantes para a produção vegetal, ao representarem a porta de entrada e de escoamento dos gases para a fotossíntese, também são os principais responsáveis pela transpiração e por isso, estão intimamente ligados ao ambiente, controlando a perda de água (CUTTER, 1986; FANH, 1990; SILVA et al., 2004). Assim, apresentar estômatos bem desenvolvidos e funcionais, é um critério importante para plantas cultivadas in vitro que serão posteriormente aclimatadas. Desse modo, é necessário o acompanhamento do material vegetal após a etapa de criopreservação, a sobrevivência dos explantes, não valida o fim do processo de criopreservação. Observou-se nesse trabalho que as plantas criopreservadas e posteriormente cultivadas in vitro, apresentaram desenvolvimento normal, formação de folhas expandidas e raízes contendo pelos radiculares (Figura 24).



Figura 24. Plantas cultivadas in vitro por 55 dias, após regeneração das gemas criopreservadas em nitrogênio líquido e 3 subcultivos: A – *S. chacoense*; B- *S. malmeanum* e C- *S. calvencens*. Letras: fe- folhas expandidas; fs folhas em senescência; rep- raízes e pelos radiculares e ft- formação de tubérculos.

Fonte: Marisa Taniguchi.

5.4 Cultivo in vitro de sementes botânicas de batata silvestre

Na germinação de sementes botânicas, houve diferenças significativas entre os tratamentos de GA₃ e tratamento controle (sem o uso de GA₃), sendo a maior porcentagem de germinação para *S. malmeanum* 92%, nos tratamentos T2- 250 µM e T3- 500 µM de GA₃ (Tabela 9), para *S. commersonii* nos tratamentos T2- 250 µM (36%) e T3- 500 µM (40%) de GA₃ (Tabela 10), para *S. tuberosum* nos tratamentos T2- 250 µM (72%); T3- 500 (50%) e T4-750 µM (60%) de GA₃ (Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9. Porcentagem de germinação acesso 17 (*Solanum malmeanum* Bitter), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (NF) e número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

GA ₃ μM	Germinação (%)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)
T1- 0	52 b	5.8 b	1.18 b	4.46 b	10.18 c
T2 - 250	92 a	24.0 a	5.30 a	15.2 a	26.74 ab
T3 -500	92 a	27.8 a	5.48 a	12.4 a	28.84 ab
T4 -750	88 ab	27.8 a	5.48a	13.2 a	35,90 a
T5 -1000	84 ab	21 0. a	4.24 a	12.2 a	20.02 bc
c.v. (%):	25.47	26,30	36,56	35.32	32.71

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Tabela 10. Porcentagem de germinação acesso 68 (*Solanum commersonii* Dunal), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (NF) e número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

GA ₃ μM	Germinação (%)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)
T1- 0	28 b	2.0 n*	0.38 n*	2.2 n*	2.2 n*
T2 - 250	36 a	8.0	1.30	3.4	3.3
T3 -500	40 a	8.2	1.88 a	3.6	3.6
T4 -750	20 ab	0.7	0.70	1.8	1.8
T5 -1000	8 ab	2.4	0.16	1.2	1.2
c.v. (%):	88,35	89.97	135.67	87,32	111,34

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Tabela 11. Porcentagem (%) de germinação do acesso 445 (*Solanum tuberosum* L), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (NF) e número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

GA ₃ μM	Germinação (%)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)
T1- 0	16 b	0.60 b	0.14 b	0,6 b	2.6 b
T2 - 250	72 a	16.2 a	4.15 a	6.71a	22.97 ab
T3 -500	50 a	14.2a	2.44 a	5.2 a	19.68 ab
T4 -750	60 a	13.5 a	2.78	5.83 a	23.33a
T5 -1000	4 b	1.2 b	0.16 a	0.8 b	1.60 b
c.v. (%):	53,84	61,01	85,05	57,23	75,44

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

A germinação de sementes botânicas é de interesse para estudos de armazenamento e viabilidade de uso ex vitro desse material, para uso principalmente do melhoramento genético, as espécies de batatas silvestres

consideradas herdeiras de características robustas para a cultivo da batata, são cruciais. Assim observar o desenvolvimento desses recursos genéticos elucidar o armazenamento mais indicado para cada tipo de material vegetal. A germinação das sementes apresentou desenvolvimento normal das plantas, com formação de parte aérea e raízes (Figura 25).

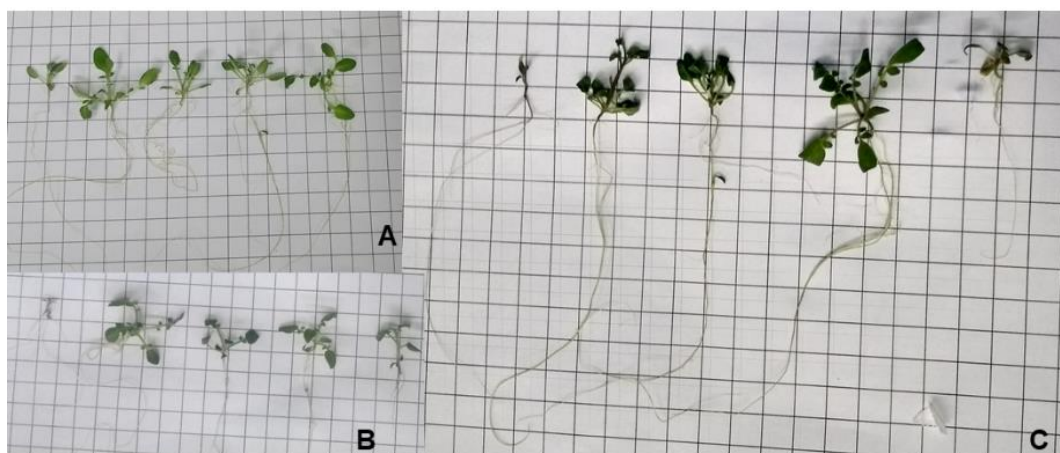


Figura 25. Plantas de batata silvestre germinadas: A- *S. malmeanum*; B- *S. commersonii*; C- *S. tuberosum*.

Fonte: Marisa Taniguchi.

5.4.1 Criopreservação de sementes botânicas

Na criopreservação das sementes botânicas, a vitrificação foi a técnica utilizada e observou-se que sem com 15 minutos (T2) de exposição ao crioprotetor não houve germinação das sementes criopreservadas, mas no maior tempo de exposição ao PVS2 60 minutos (T4) houve menor porcentagem de germinação das sementes botânicas apesar de ser verificada diferença significativas apenas para *S. malmeanum*. A maior porcentagem de germinação das sementes botânicas, após a criopreservação foram observadas no tratamento T3 (com 30 minutos de imersão em PVS2), , A *S. commersonii*; B- *S. malmeanum* C- *S. tuberosum* (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagem de germinação após a criopreservação em nitrogênio líquido. embrapa clima temperado, pelotas, rs, 2019.

PVS2 (minutos)	<i>S. malmeanum</i> (%) de Germinação após a criopreservação	<i>S. commersonii</i>	<i>S. tuberosum</i>
T1- Controle	78 a	38 a	72 a
T2- 15	0 c	0 b	0 b
T3- 30	68 a	28 a	65 a
T4- 60	28 b	20 a	55 a
c.v. (%):	58,90	38,73	35,35

C.V. (%) Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Acredita que se ao expor as sementes por 60 minutos ao PVS2 houve toxicidade que pode ser causada pelo DMSO -dimetilsulfóxido, mas para a *S. tuberosum*, tanto o tratamento T3 (30 minutos) como o T4 (60 minutos) foram eficientes para a criopreservação das sementes (Figura 26 e 27).



Figura 26. Plantas de batata silvestre excisadas criopreservaas:
A *S.commersonii*; B- *S. malmeanum* C- *S. tuberosum*.
Fonte: Marisa Taniguchi.

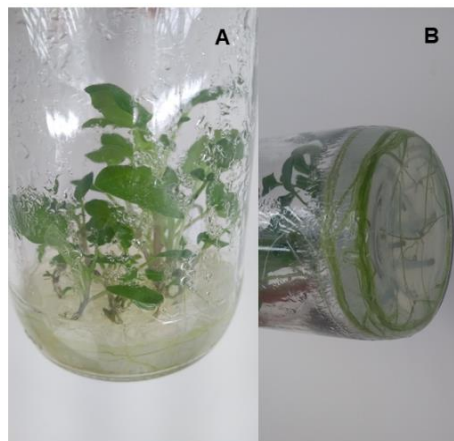


Figura 27. Plantas de batata silvestre criopreservadas
com 40 dias: A- Plantas bem desenvolvidas B-raízes
desenvolvidas.
Fonte: Marisa Taniguchi.

Sementes, embriões, gemas, meristemas, calos ou suspensões de células geralmente apresentam quantidades elevadas de água intracelular e são extremamente sensíveis a lesões de congelamento, ocasionadas pela formação de cristais de gelo. Portanto, qualquer material a ser criopreservado deve ter as células desidratadas artificialmente, evitando eventuais danos causados pela cristalização. Desse modo, alguns cuidados nas etapas iniciais da criopreservação são essenciais para o sucesso da técnica e devem ser testados para cada espécie e tipo de explante, como o uso de crioprotetores e tratamentos durante os protocolos

O método de criopreservação mais barato, rápido e fácil de executar e que tem sido usado com relativo sucesso para conservação de acessos de batata é a vitrificação. Algumas metodologias utilizam a desidratação prévia física ou osmótica dos explantes para reduzir os danos ao material vegetal durante esse processo. Essas desidratações foram obtidas, nesse trabalho, pela exposição do material à sílica-gel e soluções altamente concentradas com sacarose. Após as etapas de desidratação e/ou osmoproteção, o material é submetido ao congelamento ultrarrápido em nitrogênio, isso faz com que menos danos sejam causados aos explantes durante o processo de congelamento e descongelamento.

Portanto, podemos indicar que o sucesso da criopreservação depende da prevenção de danos às membranas e organelas celulares durante o congelamento, sendo a preparação dos explantes (material vegetal) para o armazenamento em nitrogênio a etapa crucial de todas as metodologias aplicadas. A criopreservação pode garantir a conservação de recursos genéticos vegetais de grande importância para a segurança alimentar, permitindo também outras aplicações como o resgate de variedades ou cultivares negligenciadas ou abandonadas e a reintrodução de espécies extintas no ambiente.

As batatas silvestres são de inestimável valia para a pesquisa de melhoramento genético e para a biotecnologia de hortaliças devido a sua grande variabilidade genética e suas características genótípicas como resistência a oscilação de temperatura, umidade no solo, pragas e doenças. Sendo a ampla variabilidade genética é condição essencial para a obtenção sistemática de cultivares com melhor produtividade, adaptadas as diversas condições ecológicas do país e com maior resistência a doenças e pragas. Sendo de

conhecimento que a fonte básica da variabilidade genética disponível ao melhoramento de plantas cultivadas relaciona-se, em princípio, a cultivares primitivas ou avançadas e aos ancestrais selvagens das espécies comerciais (FORETTO, PATRICIA et. al., 2009). Portanto, esse trabalho atende além de seus objetivos, a premissa de conservação de recursos genéticos de espécies importante para o futuro da alimentação humana, contemplando inclusive os objetivos da Agenda 2030.

6. Conclusões

A micropropagação foi realizada, não havendo necessidade das etapas de multiplicação e enraizamento, sendo possível concluir o retorno desse material aclimatizado, para vaso em estado ex vitro, com resultados satisfatórios.

É possível realizar os procedimentos para criopreservação com resultados positivos para os acessos usados, a técnica mais indica é o encapsulamento e vitrificação, utilizando soluções de saturação com sacarose.

Para sementes botânicas foi possível alcançar a criopreservação das sementes utilizando a técnica de vitrificação, as plantas formadas apresentaram desenvolvimento completo.

Conclui-se que os resultados de conservação para material genético de batatas silvestres atendem as premissas conservação em longo prazo, para estudos de melhoramento genético e podem servir de base para estudos com os demais acessos de parentes silvestres da batata cultivada no Brasil.

Indica-se a continuidade de estudos, sugerindo a embriogênese somática para estudos do melhoramento genético com a produção de material haplóide e estudos anatômicos e ultra estruturais, para maior compreensão dos mecanismos de regeneração e metabolismo das plantas, perante os estresses durante o processo de criopreservação.

7. Considerações finais

Esse trabalho visa a importância das espécies de batatas silvestres no Brasil, como fonte de variabilidade genética, que apresentam características promissoras importantes para nossa base alimentar. A conservação desses recursos genéticos é de grande interesse, para estudos do melhoramento genético, o que permitirá o futuro da cultura da batata, mesmo diante das variações climáticas previstas.

Com base nos objetivos desta pesquisa, alcançamos a validação de protocolos para conservação em longo prazo de diferentes acessos de batatas silvestres, seja por meio de material cultivado *in vitro*, ou sementes botânicas.

Os parentes silvestres da batata resguardam diversidade genética com potencial para tolerar diferentes estresses ambientais e são utilizados para ampliar a base genética da batata e desenvolver cultivares mais resilientes frente novas demandas e desafios. A conservação desses recursos genéticos *ex situ* é essencial para a sustentabilidade da cultura da batata em um mundo em constante transformação. Considerando a pressão antrópica, a que tem sido submetidas estas espécies e o risco de perda deste patrimônio genético, o cultivo *in vitro* é um método eficaz para conservação a curto e médio prazo *ex situ*, proporcionando a inclusão e a conservação destas em bancos de germoplasma *in vitro*.

Sendo necessário dar continuidade, em estratégias que possam fomentar a otimização desses protocolos para os demais acessos não estudados de batata silvestre. Cabe ressaltar que, os resultados de criopreservação atendem as demandas para armazenamento em criobancos e são pioneiras para os acessos de batata no banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado.

8. Referência bibliográfica

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, (Embrapa-CNPA. Documento, 64). 39 p, 1999.

CID, L.P.B. Editor Técnico. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa, 2014, 325p.

GONZÁLEZ, M.; GALVÁN, G.; SIRI, M.I.; BORGES, A.; VILARÓ, F. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii*. **Agrociencia** v. 17, p. 45–54, 2013.

HAWKES, J.G., HJERTING, J.P. **The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay**. 1969. 525p.

KELLER, E.R.J. et al. Comparing costs for diferente conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.60, n.3, p. 913-926. Mar. 2013.

MOLIN, L.H.D.; CASTRO, C.M.; HEIDEN, G. Distribuição geográfica de batatas silvestres (*Solanum*, *Solanaceae*) nativas do brasil. In: **ENPOS**. Universidade Federal de Pelotas-UFPeL. 2015.

NASCIMENTO, F.C. do. **A expressão de citocinas oxidases em raízes de arroz altera a morfologia radicular e aumenta a eficiência de aquisição de nutrientes**. 2014. 56 pg. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ. Rio de Janeiro/RJ. 56 pg .2014..

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.213–234. 2013.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Batata**. Belo Horizonte, MG. Julho/2017. Acessado em 25 de agosto. 2018. Online. Disponível em: http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Agricultura/2017/Jul/Perfil_batata_jul_2017.pdf.

SIGRIST, M. S. **Utilização de germoplasma exótico e parentes silvestres no melhoramento vegetal**. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Piracicaba, 07 mai. 2010. ESALQ. Acessado em 14/08/2018.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag. p. 179-197, 1991.

POF. (2018). Pesquisa de orçamento familiares 2017:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf>

LIMA, J. D. S. et al. **DIVERSIDADE GENÉTICA E RNAdf DE ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.* ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira)**. Dissertação (Dissertação em Genética) – UFPR. Curitiba, p. 102. 2008.

MAGNANI, G. D. S. **DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**. Dissertação (Dissertação em Bioquímica) – UFPR. Curitiba, p. 102. 2005.

SILVA, G.O.; LOPES, C.A. **Sistema de produção da Batata** . Embrapa. Brasília. v. 2. 2016.

Apêndices

A.1 FERREIRA, LETÍCIA VANNI; VARGAS, DAIANE PEIXOTO; FORMOSO, RAFAELA SILVA; TANIGUCHI, MARISA; FERREIRA, LIANA VIVIAM; CORADIN, JULIANA HEY; DUTRA, LEONARDO FERREIRA. **Composição da matriz de encapsulamento de gemas axilares de morangueiro 'San andreas': *in vitro* e sobrevivência *ex vitro***. Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 101851-101859, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/22123/17668>>.

Brazilian Journal of Development

101851

Composição da matriz de encapsulamento de gemas axilares de morangueiro
'San Andreas': *in vitro* e sobrevivência *ex vitro*

Composition of the 'San Andreas' axillary gemstone encapsulation matrix: *in vitro* and *ex vitro* survival

DOI:10.34117/bjdv6n12-614

Recebimento dos originais: 17/11/2020
Aceitação para publicação: 17/12/2020

Letícia Vanni Ferreira

Doutora em Agronomia, área de concentra Fruticultura de Clima Temperado, pela UFPEL
Endereço pessoal: Rua Giovanni Signor, 272. Fenavinho. Bento Gonçalves, RS
E-mail: letivfi@hotmail.com

Daiane Peixoto Vargas

Doutora em ciencias/fisiologia vegetal
universidade federal de lavras
Endereço pessoal: Praça domingos Rodrigues número 10 CEP 96010-440. Pelotas/Rs.
E-mail: dvbio@hotmail.com

Rafaela Silva Formoso

mestre em fisiologia vegetal, universidade federal de pelotas, praça capitao nestor corbiniano de
andrade 52 apto401, Pelotas, RS.
E-mail: rafaelasformoso@gmail.com

Marisa Taniguchi

Mestra em Fisiologia Vegetal.
Endereço: Rua Bento Martins, 1405. Pelotas/RS
E-mail: marisataniguchi@yahoo.com.br

Liana Vivian Ferreira

Doutora em Fisiologia Vegetal pela UFPEL. Doutora em Fisiologia Vegetal pela UFPEL.
Endereço: Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal do Centro Universitário da Região da
campanha - INTEC/URCAMP. Rua Flores da Cunha, nº 310, Centro, Bagé-RS

Juliana Hey Coradin

Mestre em Engenharia Química
Instituição: Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392, km 78 - Distrito de Monte Bonito - Pelotas - RS
E-mail: juliana.coradin@embrapa.br

Leonardo Ferreira Dutra

Formação acadêmica mais alta: Doutor
Instituição: Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Rodovia BR-392, Km 78, 9º Distrito, Monte Bonito, Caixa Postal 403, CEP: 96010-971 -
Pelotas, RS
E-mail: leonardo.dutra@embrapa.br

Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n.12, p.101851-101859 dec. 2020.

ISSN 2525-8761

A.2 VARGAS, D. P.; FERREIRA, L. V.; TANIGUCHI, M.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F. **Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção.** *Rodriguesia*, v. 71, p. 0370-6583, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2175-7860202071093>>.

Rodriguesia 71: e00972018. 2020
<http://rodriguesia.fbrj.gov.br>
 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202071093>



Nota Científica / Short Communication
Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção
Cryopreservation of a threatened pindo palm species

Daiane Peixoto Vargas¹, Leticia Vanni Ferreira², Marisa Taniguchi³, Juliana Hey Coradin²
 & Leonardo Ferreira Dutra^{2,4,5}

Resumo

Butia yatay é uma palmeira nativa do Rio Grande do Sul que encontra-se em risco de extinção. Sua propagação é realizada por via sexuada, porém a germinação por sementes é baixa, lenta e desuniforme. Objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação visando a conservação da espécie. Foram testadas concentrações de sacarose em pré-tratamento de embriões antes do congelamento. Embriões de *Butia yatay* podem ser criopreservados, com subsequente retomada do crescimento, quando submetidos ao prévio tratamento com sacarose a 0,4 M. Neste estudo, os embriões foram congelados por 10 dias, indicando que o pré-tratamento possibilita a conservação de *Butia yatay* por longo tempo.

Palavras-chave: *Butia* sp., congelamento, conservação, sacarose.

Abstract

Butia yatay is a palm tree native of Rio Grande do Sul that is in danger of extinction. Its propagation is carried out sexually, however, the seed germination is low, slow and uneven. Thus, a cryopreservation protocol was established aiming at the conservation of the species. Concentrations of sucrose were tested on embryo pre-treatment before freezing. *Butia yatay* embryos can be cryopreserved, with subsequent growth recovery, when they are submitted to previous treatment with 0.4 M sucrose. In this study, the embryos were frozen for 10 days, indicating that pretreatment allows the conservation of *Butia yatay* for a long time.

Key words: *Butia* sp., freezing, conservation, sucrose.

O gênero *Butia* ocorre naturalmente em países como Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil e possui 20 espécies, das quais 19 são encontradas no Brasil. Destas, oito ocorrem no Rio Grande do Sul, como o *Butia yatay* (Mart.) Becc. (Hoffmann *et al.* 2014), encontrado de forma restrita nos municípios de Giruá e Quaraí, e em estado de perigo (FZB 2016; Eslabão *et al.* 2016).

Alternativa para a conservação de espécies de *Butia*, a criopreservação propicia diminuição ou até mesmo paralisação do metabolismo celular (Meletti *et al.* 2007; Kaczmarczyk *et al.* 2011), redução ou eliminação de danos causados no

DNA, diminuição na necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade, além do armazenamento em pequenos volumes e por período ilimitado (Engelmann 2011).

No entanto, a maioria dos explantes utilizados na criopreservação contém quantidades elevadas de água intracelular e são extremamente sensíveis a lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo quando expostos a baixas temperaturas (Reed 2008). Em função disso, para evitar os danos causados pela cristalização da água, as células devem ser desidratadas artificialmente, o que é uma etapa importante para elaboração de

¹ Sagres Agenciamentos Marítimos Ltda., R. Santa Cruz 500, 96015-710, Pelotas, RS, Brasil.

² Embrapa Clima Temperado, Rod. BR-392, km 78, C.P. 403, 96001-971, Pelotas, RS, Brasil.

³ Universidade Federal de Pelotas, Inst. Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário s/n, C.P. 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

⁴ ORCID: <<https://orcid.org/0000-0002-8438-8326>>

⁵ Autor para correspondência: leonardo.dutra@embrapa.br

A.3 FERREIRA, LETICIA VANNI; TANIGUCHI, MARISA; BARRETO, CAROLINE FARIAS; SILVA, TALIS BASÍLIO; ANTUNES, LUIS EDUARDO CORREA; DUTRA, LEONARDO FERREIRA. **Indução de brotos in vitro em maracujazeiro doce BRS mel do cerrado.** *Brazilian Journal of Development*, v. 6, p. 9644-9652, 2020. Disponível em: <<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/7272/6321>>.

Indução de brotos in vitro em maracujazeiro doce brs mel do cerrado

Induction of brotes in sweet brass passion fruit 'mel do cerrado' cultivated in vitro

DOI:10.34117/bjdv6n3-006

Recebimento dos originais: 30/12/2019

Aceitação para publicação: 28/02/2020

Leticia Vanni Ferreira

Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus Ibirubá
letivf@hotmail.com

Marisa Taniguchi

Universidade Federal de Pelotas
marisataniguchi@yahoo.com.br

Caroline Farias Barreto

Universidade Federal de Pelotas
carol_fariasb@hotmail.com

Talis Basílio da Silva

Universidade Federal de Pelotas
talesbs28@gmail.com

Luis Eduardo Correa Antunes

Embrapa Clima Temperado
luis.antunes@embrapa.br

Leonardo Ferreira Dutra

Embrapa Clima Temperado
leonardo.dutra@embrapa.br

RESUMO

A micropropagação é alternativa à produção de mudas de maracujazeiro, a qual é correntemente realizada por meio de sementes. Por meio do cultivo in vitro podem ser produzidos, em grande escala, clones selecionados de variedades com interesse comercial, como a 'BRS Mel do Cerrado'. Sendo assim, objetivou-se estabelecer a concentração adequada de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução da brotação de maracujazeiro 'BRS Mel do Cerrado' visando à sua micropropagação. Gemas de aproximadamente 2 mm, provenientes de plantas pré-estabelecidas in vitro, foram excisadas e inoculadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio MS, suplementado com 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar e BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹). O BAP adicionado ao meio de cultura promoveu a brotação dos explantes, não havendo diferença significativa entre as concentrações do fitorregulador para número e comprimento de brotos. A adição de BAP ao meio de cultura aumenta a produção de massa fresca e seca de plantas de maracujazeiro 'BRS Mel do Cerrado'.

Palavras-chave: Passiflora alata Curtis; maracujá; brotação; cultura de tecidos

A.4 DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; SILVA, T. B.; SARTO, M. T.; BORTOLIN, G. S.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S.; REISSER JUNIOR, C.; AMARANTE, L.; HAERTER, J.; DUTRA, L. F. **Responses of *Solanum tuberosum* L. to water deficit by matrix or osmotic induction.** Potato Research, v. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11540-020-09489-3>>.



Responses of *Solanum tuberosum* L. to Water Deficit by Matric or Osmotic Induction



Athos Odin Severo Dorneles^{1,3} · Aline Soares Pereira² ·
Talis Basilio da Silva^{1,3} · Marisa Taniguchi^{1,3} · Gabriel Streck Bortolin² ·
Caroline Marques Castro³ · Arione da Silva Pereira³ · Carlos Reisser Júnior³ ·
Luciano do Amarante¹ · Janni Andre Haerter³ · Leonardo Ferreira Dutra^{1,3}

Received: 16 June 2020 / Accepted: 4 December 2020 / Published online: 25 January 2021
© European Association for Potato Research 2021

Abstract

To select potato genotypes tolerant to water deficit, systems to simulate this stress have been used. Polyethylene glycol (PEG) is the main osmotic agent used for this purpose, but it causes an excessively severe stress. However, it is difficult to carry out an experiment that aims to compare plant responses under water deficit by osmotic or matric induction, and, thus, few studies compare these stress-inducing mechanisms. Therefore, the objective of this study was to compare the responses of Agata, BRS Clara, C2406-03 and Cota genotypes to water deficit in both induction methods (matric or osmotic). The tests were carried out in a greenhouse, one using hydroponics (osmotic induction) and the other in pots with soil (matric induction). In both tests, the application of stressful conditions occurred at the beginning of tuberization. Assessments of gas exchange and shoot temperature were made throughout the exposure to stress. Also, samples were collected from leaves for analysis of osmotic potential and leaves and tubers for analysis of metabolite content. At the end of the potato plant cycle, the number and weight of tubers were evaluated. In both stress conditions, there were significant reductions in photosynthesis and transpiration rate compared to the respective normal hydration conditions. In addition, indicators such as metabolite levels (proline and soluble sugars) were significantly altered in plants exposed to different stress inductions. These data, together with the significant limitations in the growth of stressed plants, indicate that the experimental models induce similar responses. However, the water deficit by osmotic induction was more severe for the potato plants when compared to stress due to matric induction, mainly affecting tuber production. Therefore, the water deficit osmotic induction model can be recommended for phenotyping tolerance to this stress, due to the hydroponic system inducing greater tuber production per plant under optimal cultivation conditions.

Apêndices B - Textos em jornais de notícias/revistas.

B.1 JAROSEZNISKI, A. P.; MACHADO, I. E. F.; FERREIRA, M. Z.; DORNELES, A. O. S.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Cultivo *in vitro* e unidades encapsuláveis: estratégias eficazes para conservação ex situ de recursos genéticos de batatas-silvestres.** Revista Batata Show, v. 58, p. 24 - 26, 2021. Disponível em: <
<https://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista/edicao-58/>>.

MELHORAMENTO

Cultivo In Vitro e Unidades Encapsuláveis: Estratégias Eficazes para Conservação Ex Situ de Recursos Genéticos de Batatas-Silvestres

Marisa Taniguchi (Bióloga, Mestra em Ciências - Fisiologia Vegetal, Doutoranda no Programa de Pós-graduação Fisiologia vegetal, UFPel, Pelotas, RS). marisataniguchi@yahoo.com.br

Ana Paula Jarosezniski (Técnica em Agropecuária, IFSul Campus Pelotas-Visconde da Graça (CaVG), Pelotas, RS). anapjarosezniski@gmail.com

Jaqueline da Silva dos Santos (Graduanda em Agronomia, UFPel, Pelotas, RS). silvasantos.jake@gmail.com

Inessa Emanuelle da Fonseca Machado (Graduanda em Agronomia, UFPel, Pelotas, RS). inessamachado@hotmail.com

Mônica Zanetti Ferreira (Graduanda em Agronomia, UFPel, Pelotas, RS). monicazanetti95@gmail.com

Athos Odin Severo Dorneles (Biólogo, Dr. em Fisiologia vegetal, UFPel, Pelotas, RS). athos_odin@hotmail.com

Juliana Hey Coradin (Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologista, Mestre em Engenharia Química, analista, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS). juliana.coradin@embrapa.br

Leonardo Ferreira Dutra (Engenheiro Agrônomo, Dr. em Agronomia, pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS). leonardo.dutra@embrapa.br

Gustavo Heiden (Biólogo, Dr. em Botânica, pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS). gustavo.heiden@embrapa.br

A conservação ex situ abrange a manutenção de germoplasma na forma de sementes, pólen, tubérculos, cultivo in vitro ou em campos experimentais e casas-de-vegetação, tanto em jardins botânicos quanto em coleções ou bancos de germoplasma. Dentre as possibilidades de conservação ex situ, a conservação in vitro de batata se destaca por apresentar diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma em campo (ex vitro): manutenção livre de patógenos, disponibilidade para ser imediatamente propagado e redução do crescimento de células e tecidos, diminuindo o metabolismo da planta, sem afetar a viabilidade. Assim, a conservação in vitro aumenta ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo a demanda de mão-de-obra e espaço

físico para conservação.

Na cultura de tecidos, a micropropagação é uma técnica indicada para espécies que apresentam dificuldade de conservação de sementes ou germinação e facilita o intercâmbio de germoplasma, com a possibilidade de obtenção de plantas sadias e em larga escala, idênticas a matriz. As etapas do cultivo in vitro vão desde o estabelecimento da cultura in vitro até o enraizamento, terminando na aclimatização. Para o sucesso deste modo de propagação e cultivo, é preciso utilizar de forma equilibrada os reguladores de crescimento, bem como os nutrientes no meio de cultura e fornecer fotoperíodo e temperatura adequados, proporcionando 100% de regeneração in vitro dos explantes de batata-silvestres (Figuras 1 e 2).

B.2 SILVA, T. B.; COPATTI, A. S.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Criopreservação de recursos genéticos de batata**. Revista Batata Show, p. 64-66, 2021. Disponível em: <<https://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista/edicao-60/>>.

MELHORAMENTO

Criopreservação de Recursos Genéticos de Batata

Marisa Taniguchi (Bióloga, Mestra em Ciências, Doutoranda em Fisiologia Vegetal, UFPel, Pelotas, RS). marisataniguchi@yahoo.com.br

Talis Basilio da Silva (Graduando em Ciências Biológicas, UFPel, Pelotas, RS). talesbs28@gmail.com

Andrio Spiller Copatti (Engenheiro agrônomo, Mestre em ciências, Doutorando em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado, UFPel, RS). andriocopatti@gmail.com

Rodrigo Nicolao (Engenheiro agrônomo, Mestrando em Agronomia – Fitomelhoramento, UFPel, RS). rodrnicolao@gmail.com

Juliana Aparecida Fernando (Bióloga, Dra. em Biologia Vegetal, docente da UFPel, Pelotas, RS). juli_fernando@yahoo.com.br

Leonardo Ferreira Dutra (Engenheiro Agrônomo, Dr. em Agronomia, pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS). leonardo.dutra@embrapa.br

Gustavo Heiden (Biólogo, Dr. em Botânica, pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS). gustavo.heiden@embrapa.br

Os recursos genéticos são o material genético de valor real ou potencial, dos quais direta ou indiretamente depende a humanidade. Dessa forma, a conservação das variedades tradicionais e dos parentes silvestres das culturas agrícolas tem sido uma preocupação no contexto internacional desde o início do século XX. A batata (*Solanum tuberosum*) é a quarta cultura alimentar mais importante, depois do milho, do trigo e do arroz. Atualmente a cultura in vitro de espécies vegetais é uma possibilidade segura de conservar germoplasma de batata em curto e médio prazo. Para conservação em longo prazo, ou seja, por um período ilimitado, a criopreservação é a ferramenta indicada. Esta técnica é aplicada na conservação ex situ de recursos genéticos e de espécies raras ou ameaçadas de extinção. O armazenamento do germoplasma ocorre por meio de metodologias que mantêm o material biológico vivo, mas com metabolismo suspenso, sob temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio gasoso (-150 °C) ou líquido (-196 °C).

Sementes, embriões, gemas, meristemas, calos ou suspensões de células geralmente apresentam quantidades elevadas de água intracelular e são extremamente sensíveis a lesões de congelamento, ocasionadas pela

formação de cristais de gelo. Portanto, qualquer material a ser criopreservado deve ter as células desidratadas artificialmente, evitando eventuais danos causados pela cristalização. Desse modo, alguns cuidados nas etapas iniciais da criopreservação são essenciais para o sucesso da técnica e devem ser testados para cada espécie e tipo de explante, como o uso de crioprotetores e tratamentos durante os protocolos

Um dos métodos de criopreservação mais barato, rápido e fácil de executar e que tem sido usado com relativo sucesso para conservação de acessos de batata é a vitrificação. Nesse processo a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e metaestável, o que contribui para evitar a formação de cristais de gelo intracelular. Algumas metodologias utilizam a desidratação prévia física ou osmótica dos explantes para reduzir os danos ao material vegetal durante esse processo. Essas desidratações podem ser obtidas, por exemplo, pela exposição do material à sílica-gel ou soluções altamente concentradas com sacarose. Após as etapas de desidratação e/ou osmoproteção, o material é submetido ao congelamento ultrarrápido em nitrogênio (Figura 1).

Apêndices C - Resumos expandidos apresentados em anais de congressos

C.1 ARDILES, R. E. G.; TANIGUCHI, M.; DUTRA, D. B.; CARVALHO, J. O.; FERREIRA, L. V.; DUTRA, L. F. **Tempo de desidratação na viabilidade de unidades encapsuláveis de batata doce (*Ipomoea batatas*)**. In: XIX Encontro de Pós-Graduação, 2017, Pelotas. III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2017.



CERTIFICADO

Certificamos que

RUTH ELENA GUZMÁN ARDILES

Apresentou o trabalho "**TEMPO DE DESIDRATAÇÃO NA VIABILIDADE DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*)**" no XIX Encontro de Pós-Graduação, da III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, realizado na UFPEL, no período de 20 a 24 de novembro de 2017. O referido trabalho possui o(s) seguinte(s) autor(es): **GUZMAN ARDILES, Ruth Elena; SARTO, Marisa Taniguchi; DUTRA, Debora Barwaldt; CARVALHO, Juliana Oliveira de; FERREIRA, Leticia Vanni; DUTRA, Leonardo Ferreira**, sob orientação do(a) Prof.(a) **Leonardo Ferreira Dutra**.

Prof. Dr. Flavio Fernando Demarco
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Rafael Vetromille de Castro
Coordenador de Pós-Graduação

A autenticidade deste certificado pode ser verificada acessando o original online em <http://cti.ufpel.edu.br/siepe/certificados/valida/2017T05134>



UFPEL

C.2 ALVES, M. V.; TANIGUCHI, M.; ARDILES, R. E. G.; TESSARO, D.; CORADIN, J. H.; DUTRA, L. F. **Desidratação de unidades encapsuláveis de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).** In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2017, Pelotas. III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2017.



3ª SIIPE
SEMANA INTEGRADA
UFPEL 2017

CIC 2017

XXVI CONGRESSO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CERTIFICADO

Certificamos que

MATEUS VICENTE ALVES

Apresentou o trabalho "**DESIDRATAÇÃO DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**" no **XXVI Congresso de Iniciação Científica**, da III Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, realizado na UFPEL, no período de 20 a 24 de novembro de 2017. O referido trabalho possui o(s) seguinte(s) autor(es): **MATEUS VICENTE ALVES; MARISA TANIGUCHI SARTO; RUTH ELENA GUZMÁN ARDILES; DANIELA TESSARO; JULIANA HEY CORADIN; LEONARDO FERREIRA DUTRA.**, sob orientação do(a) Prof.(a) **Leonardo Ferreira Dutra**.

Prof. Dr. Flavio Fernando Demarco
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira Krüger
Coordenador de Pesquisa

A autenticidade deste certificado pode ser verificada acessando o original online em <http://cti.ufpel.edu.br/siepe/certificados/valida/2017T04571>



UFPEL

C3 TANIGUCHI, M.; PAIVA, P. D. O.; REIS, V. M.; SILVA, D. P.; NERY, F. C.; PAIVA, R. **Criopreservação de sementes de *Alibertia sessilis* Shum por desidratação em sílica gel.** In: IV Simpósio Brasileiro de Biologia da Conservação, 2017, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.



C.4 FERREIRA, M. Z.; SARTO, M. T.; KLASSEN, G. L.; VASCONCELLOS, M. L.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Multiplicação *in vitro* de *Solanum comersonii* (Solanaceae).** In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.



MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Solanum comersonii* (SOLANACEAE)

MÔNICA ZANETTI FERREIRA¹; MARISA TANIGUCHI SARTO²; GUILHERME LONGARAY KLASSEN³; MATHEUS LEITE VASCONCELLOS⁴; GUSTAVO HEIDEN⁵; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nika-zanetti@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – guilherme.klassen96@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – matheusvasconcellos703@gmail.com

⁵Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas mais importantes para a alimentação humana. A área colhida no Brasil está em torno de 803,9 mil ha e a produção ao redor de 4,3 milhões de toneladas. Os estados com maior produção são Mato Grosso, Minas Gerais e Bahia (SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MG, 2017).

Para que sejam lançadas variedades de batata mais adaptadas às diversas regiões produtoras do país, é realizado o melhoramento genético das espécies. Entretanto, o processo de seleção de genótipos mais produtivos estreita a base genética das plantas cultivadas (SIGRIST, 2010). Desse modo, a coleta e conservação de germoplasma proveniente de parentes silvestres da batata cultivada, são imprescindíveis para que uma base genética mais ampla esteja disponível aos programas de melhoramento genético, e assim, para uso na agricultura (MOLIN, 2015).

A espécie de batata silvestre *S.commersonii* tem potencial de uso no melhoramento genético de batata cultivada por meio de genótipos com resistência às doenças como a murcha bacteriana e tolerância a estresses abióticos (HAWKES; HJERTING, 1969; GONZALEZ, 2013; MOLIN, 2015).

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante no suporte ao melhoramento genético, por ser um método eficaz de conservação *ex situ* de recursos genéticos, proporcionando a inclusão e a manutenção de espécies, como a batata, em bancos de germoplasma *in vitro* (KELLER et al., 2013).

A partir do exposto o trabalho tem como objetivo a multiplicação de *Solanum commersonii* com uso de BAP no meio de cultura.

2. METODOLOGIA

A partir de plantas de *Solanum comersonii*, mantidas *in vitro* no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, segmentos uninodais de aproximadamente 1 cm foram excisados. Posteriormente, foram inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,1 de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de phytigel e BAP nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹), com pH ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. No tratamento testemunha não houve adição de BAP ao meio de cultura.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo

C.5 KUNDE, R. J.; SILVA, B. E. P.; SARTO, M. T.; CASTRO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; MORAES, D. M. **Potencial de uso do extrato de *Tagetes erecta* no cultivo *in vitro* de batata-doce.** In: XXVII Congresso de Iniciação Científica., 2018, Pelotas. 4ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão., 2018.



COCIC XXVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

POTENCIAL DE USO DO EXTRATO DE *TAGETES ERECTA* NO CULTIVO IN VITRO DE BATATA-DOCE

ROBERTA JESKE KUNDE¹; BRUNA EVELYN PASCHOAL SILVA²; MARISA TANIGUCHI SARTO³; LUIS ANTONIO SUÍTA DE CASTRO⁴; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁵; DARIO MUNT DE MORAES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – roberta_kunde@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brunabiologia89@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

⁴Embrapa Clima Temperado – luis.suita@embrapa.br

⁵Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – moraesdm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) é uma Convolvulaceae originária da América do Sul e que possui ampla adaptação às condições climáticas do Brasil. Atualmente, é a quarta olerícola mais cultivada no Brasil, com 550 mil toneladas produzidas em 2016. O Rio Grande do Sul é considerado o maior produtor nacional, sendo responsável por cerca de 30% da produção (IBGE, 2016). Sua importância econômica e social é resultante da rusticidade, ampla adaptação climática e elevada capacidade de produção de energia em curto espaço de tempo (SILVA et al., 2015).

Dentre suas qualidades, a batata-doce apresenta alta produtividade, requer baixo investimento e é rica em nutrientes, principalmente em carboidratos, tornando-a um dos pilares alimentícios para milhões de pessoas no mundo, em particular nos países em desenvolvimento (CASTRO et al., 2012). Embora a produtividade nacional seja considerada relativamente baixa (OLIVEIRA et al., 2017), no Brasil, existem 29 cultivares de batata-doce registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017). O cultivo de variedades locais e não melhoradas é predominante, sendo um dos principais motivos pela baixa produtividade. Um dos fatores também relacionado à queda de produtividade da batata-doce é a propagação vegetativa por meio de ramas, devido ao uso contínuo de um mesmo material para cultivo e propagação, podendo levar ao acúmulo sistêmico de doenças e degeneração do material, especialmente pelas viroses (FERNANDES, 2013).

O cultivo *in vitro* permite a propagação, transporte, conservação e armazenamento de recursos genéticos vegetais, sendo indicado para a obtenção de mudas com alto padrão fitossanitário, resultando em melhor desenvolvimento. No entanto, a manutenção *in vitro* demanda intensa mão de obra, implicando em aumento de custos. Neste sentido, a redução do crescimento das plantas, por vezes, é desejável. Substâncias provenientes de plantas podem ter efeito na redução do crescimento. Segundo Brass (2009), extratos de plantas podem ter efeito alelopático e podem causar efeito direto ou indireto nas plantas.

Os compostos aleloquímicos liberados pela espécie doadora podem interferir em vários processos fisiológicos da espécie receptora, desde a divisão e alongamento celular (ZHANG et al., 2010; SILVA et al., 2014), fotossíntese, estrutura e permeabilidade da membrana celular que afetam a absorção de nutrientes, a síntese proteica e lipídica de ácidos graxos (FAGERIA; STONE, 2006).

C.6 TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Unidades encapsuláveis de gemas de *Solanum calvescens* (Solanaceae)**. In: XX Encontro de Pós-Graduação ENPÓS, 2018, Pelotas. 4ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.



ENPÓS

XX ENCONTRO DE
PÓS-GRADUAÇÃO

UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE GEMAS DE *Solanum calvescens* (SOLANACEAE)

MARISA TANIGUCHI SARTO¹; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES²; TALES
BASÍLIO DA SILVA³; JULIANA APARECIDA FERNANDO⁴; GUSTAVO HEIDEN⁵;
LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – athos_odin@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – juli_fernando@yahoo.com.br;

⁴Universidade Federal de Pelotas – talesbs28@gmail.com

⁵Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o aumento do consumo da batata, principalmente em países em desenvolvimento (CIP, 2013), ampliou a busca por espécies que apresentem potencial para adaptação às diferentes condições climáticas, especificamente calor e seca. Considerando a vasta gama de habitats e potencial para tolerar diferentes condições de estresses ambientais (WATANABE et al., 2011), há necessidade de maior inclusão de espécies silvestres nos programas de melhoramento da batata. No Brasil, *Solanum calvescens* Bitter destaca-se por apresentar características de tolerância a estresses bióticos e abióticos. No entanto, essa espécie possui má formação das anteras, as quais são estéreis e não produzem pólen, dificultando o autocruzamento e seu uso como genitora masculina (KLASEN; CASTRO; HEIDEN, 2017). Além disso, não há estudos relacionados ao armazenamento, conservação em curto prazo ou para o melhoramento genético dessa espécie (MOLIN et al., 2016).

Dessa forma, a conservação de germoplasma de espécies nativas tem sido usada para preservar a variabilidade genética e permitir o estudo de suas propriedades em ambiente controlado, como a cultura in vitro (BERTONI et al., 2010). Nesse contexto, a produção de unidades encapsuláveis se destaca como importante técnica para conservação in vitro de várias espécies. Essa tecnologia permite a manutenção da identidade genética do material vegetal e a rápida multiplicação dos propágulos, facilitando a troca de germoplasma entre instituições de pesquisa e a conservação de genótipos desejáveis a baixos custos (NASSAR, 2003; PEREIRA et al., 2008).

Ressalta-se que a técnica para encapsular gemas visa proteger espécies silvestres de processos de extinção que ocorrem, principalmente, devido à destruição dos seus habitats e comunidades naturais, pela ocupação desordenada de grandes áreas e por práticas agrícolas (GOEDERT, 2007). Estes fatores comprometem a potencialidade e a preservação de várias espécies relevantes, como *Solanum calvescens*. Frente a isso, o objetivo desse trabalho é estabelecer um protocolo de síntese de unidades encapsuláveis de *Solanum calvescens*.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado. Gemas axilares com aproximadamente 2 mm, foram isoladas de plântulas de batata silvestre cultivadas in vitro e adicionadas à matriz

C.7 SILVA, T. B.; FERREIRA, L. V.; SARTO, M. T.; BARRETO, C. F.; CORREA, L. E.; DUTRA, L. F. **Indução de brotos em maracujazeiro doce BRS mel do cerrado cultivado *in vitro***. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica CIC, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.



CIC XXVI CONGRESSO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

INDUÇÃO DE BROTOS EM MARACUJAZEIRO DOCE BRS MEL DO CERRADO CULTIVADO IN VITRO

TALIS BASILIO DA SILVA¹; LETICIA VANNI FERREIRA²; MARISA TANIGUCHI SARTO³; CAROLINE FARIAS BARRETO⁴; LUIS EDUARDO CORRÊA ANTUNES⁵; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – talesbs28@gmail.com

²Embrapa Clima Temperado – letivf@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – carol_fariasb@hotmail.com

⁵Embrapa Clima Temperado- luis.antunes@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado- leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Os maracujazeiros pertencem à família Passifloraceae, gênero *Passiflora* constituído por 530 espécies (SILVA, et. al; 2005). Estas espécies são cultivadas e utilizadas na alimentação humana, entretanto possuem outras funcionalidades importantes, como a medicinal e a ornamental (OLIVEIRA; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2017). O maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims.) e o maracujazeiro doce (*Passiflora alata* Curtis.) são as espécies mais cultivadas no Brasil, sendo estimado que essas cultivares ocupem mais de 90% da área cultivada no mundo (FALEIRO et al., 2005; FERREIRA, 2016).

A espécie *P. alata* apresenta grande potencial para o comércio in natura, tanto no mercado interno quanto para exportação. Embora haja grande interesse comercial, a cultivar BRS Mel do Cerrado, foi registrada somente em 2017 (OLIVEIRA; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2017).

Esta é destinada ao mercado de frutas especiais de alto valor agregado, tendo como características principais a alta produtividade, qualidade física e química de frutos e maior nível de resistência a doenças foliares. A cultivar também possui potencial ornamental (EMBRAPA, 2017).

A produção de mudas é correntemente feita por meio de sementes, causando uma série de inconvenientes produtivos. O cultivo in vitro de *P. alata* representa grande importância pela potencialidade de multiplicação, possibilidade de produção de mudas livres de doenças e por permitir a conservação de recursos genéticos. Todavia existem poucos relatos sobre o cultivo in vitro esta espécie quando comparado com *P. edulis f. flavicarpa* (PACHECO et al., 2012).

C.8 ESLABAO, M. P.; SARTO, M. T.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Germinação in vitro de *Butia odorata* (Arecaceae) sob influência de 2,4-D**. In: XX ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO - ENPOS, 2018, Pelotas. IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018.



ENPOS

XX ENCONTRO DE
PÓS-GRADUAÇÃO

GERMINAÇÃO IN VITRO DE *Butia odorata* (ARECACEAE) SOB INFLUÊNCIA DE 2,4-D

MARCELO PISKE ESLABÃO¹; MARISA TANIGUCHI SARTO²; LEONARDO FERREIRA DUTRA³; GUSTAVO HEIDEN⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – marceloesl7@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com

³Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

⁴Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Butia (Arecaceae) é um gênero de palmeiras que ocorre na América do Sul, especificamente no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (ESLABÃO et al., 2016). Popularmente, as espécies desse gênero são denominadas de butiazeiros e os frutos são conhecidos como butiás (LORENZI et al., 2010). O gênero apresenta espécies endêmicas do Brasil, com interesse agroindustrial, potencial ornamental, medicinal e alimentício. Os frutos têm sabor ácido e adocicado e são amplamente utilizados na fabricação de sucos, sorvetes, picolés e licores, demonstrando importância cultural e econômica para populações regionais (MARTINS 2003; MOURA 2008; ROSSATO, 2007; BUTTOW et al., 2010). *Butia* está sofrendo uma série de interferências antrópicas, sendo considerado em risco de extinção em áreas naturais (RIVAS; BARILANI, 2004).

Assim como para a maioria das palmeiras, a propagação de *Butia* é sexuada, o que implica em germinação lenta e desuniforme, devido à dormência tegumentar (MEEROW; BROCHAT, 2017; WALDOW et al., 2013). De acordo com a literatura, 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). Neste sentido, visando diminuir o tempo de obtenção de plântulas, o uso de cultura in vitro de embrião zigótico tem sido indicado para a germinação de sementes de palmeiras (OLIVEIRA et al., 2016).

Apesar de serem bastante conhecidas e exploradas para o consumo de frutos e no paisagismo, há grande carência de informações científicas sobre estas espécies. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi testar o efeito de diferentes concentrações do fitorregulador 2,4-D na germinação in vitro de *Butia odorata* (Arecaceae).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados embriões de *Butia odorata* coletados em março de 2017 de populações naturais localizadas na Fazenda São Miguel, município de Tapes, Rio Grande do Sul. Frutos frescos com consistência firme e superfície lisa foram selecionados e despulpados, mantendo-se a integridade dos endocarpos, que foram secos em estufa à 30°C por uma semana. A exsiccata da planta foi depositada no Herbário da Embrapa Clima Temperado (ECT0002614).

As sementes tiveram o epicarpo extraído e foram desinfestadas por imersão em álcool 70% (v/v) por 60 segundos, hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1,5 % de cloro ativo e ácido dodecilbenzenosulfônico (0,5 mL) por 20 minutos. Adicionalmente, 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 triplice lavagem com água destilada autoclavada.

As sementes tiveram os opérculos removidos e foram embebidas em água destilada autoclavada por uma hora. Embriões zigóticos foram excisados e

C.9 FERREIRA, M. Z.; TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Silício no cultivo *in vitro* de batata silvestre (*Solanum*, *Solanaceae*)**. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.



C.10 SILVA, T. B.; DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; TANIGUCHI, M.; CASTRO, C. M.; DUTRA, L. F. **Acúmulo de biomassa e produção de tubérculos em plantas de batata submetidos a estresse osmótico**. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.



ACÚMULO DE BIOMASSA E PRODUÇÃO DE TUBÉRCULOS EM PLANTAS DE BATATA SUBMETIDOS A ESTRESSE OSMÓTICO

TALIS BASILIO DA SILVA¹; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES²; ALINE SOARES PEREIRA³; MARISA TANIGUCHI⁴; CAROLINE MARQUES CASTRO⁵; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - talesbs28@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - athos_odin@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - lyne_asp@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - marisataniguchi@yahoo.com.br

⁵Embrapa Clima Temperado - caroline.castro@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado - leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é considerada a sexta mercadoria agrícola mais importante do mundo, depois da cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo e leite, tornando o tubérculo um produto indispensável na mesa de muitas pessoas, pelo seu alto valor energético e nutricional (VÉLEZ, 2019). No Brasil em 2018, foram utilizados 118.297 hectares rendendo uma produção de 3.688.029 toneladas (IBGE, 2018).

As condições de clima tropical e subtropical, em combinações com diferentes altitudes, possibilitam o plantio de batata durante todos os meses do ano nas diferentes regiões de cultivo (BISOGNIN; STRECK, 2009).

A batata é uma das plantas que apresenta um dos maiores potenciais para atender às demandas de alimentos. Contudo, apesar de sua grande importância econômica e de segurança alimentar, é uma planta sensível à seca, enfrentando perdas de produção causadas por estresse hídrico. Este fator é importante para a cultura devido à extensão do cultivo de batata em áreas propensas à seca (MONNEVEUX et al. 2013). Por essa razão há um grande interesse em distinguir genótipos em tolerantes ou suscetíveis às condições de estresse (BÜNDIG et al. 2017).

Dessa maneira, realizam-se estudos utilizando o polietilenoglicol (PEG) que é caracterizado por ser uma substância química osmoticamente ativa como forma de induzir a restrição hídrica (MONNEVEUX et al. 2013). E, assim, proporcionando o estresse na planta semelhante à seca (REISSER et al. 2011). Com isso, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de diferentes genótipos de batata sob estresse hídrico utilizando o PEG.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Embrapa Clima Temperado no período de abril a junho de 2018, para tanto foram avaliados seis genótipos de batata: Agata e C2397-03 (Precoces), BRS Clara e C2406-03 (Intermediários), Cota e C2364-05-02 (Tardios). O experimento foi conduzido em sistema hidropônico de calhas conforme metodologia descrita por MEDEIROS et al. (2002).

Para submeter os genótipos ao estresse osmótico foi adicionado à solução nutritiva Polietileno Glicol 6000 (PEG), induzindo uma condição de -0,129 megapascal (MPa), seguindo metodologia descrita por Reisser et al. (2011). Este estresse foi aplicado no período de início da tuberização de cada perfil fenológico.

C.11 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Organogênese in vitro em *Butia lallemantii* (Arecaceae)**. In: XXI Encontro de PósGraduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, realizado na UFPel, 2019.



Certificamos que

MARISA TANIGUCHI

Apresentou o trabalho "**ORGANOGENESE IN VITRO EM *Butia lallemantii* (ARECACEAE)**" no XXI Encontro de Pós-Graduação, da 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, realizado na UFPel, no período de 21 a 25 de outubro de 2019. O referido trabalho possui o(s) seguinte(s) autor(es): **TANIGUCHI, Marisa; COPATTI, Andrio Spiller, NICOLAO, Rodrigo; FERNANDO, Juliana Aparecida; HEIDEN, Gustavo; DUTRA, Leonardo Ferreira**, sob orientação do(a) Prof.(a) **Leonardo Ferreira Dutra**.

Prof. Dr. Flavio Fernando Demarco
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Rafael Vetromille de Castro
Coordenador de Pós-Graduação

A autenticidade deste certificado pode ser verificada acessando o original online em <https://cti.ufpel.edu.br/siepe/certificados/valida/2019T04421>



C.12 ESLABAO, M. P.; TANIGUCHI, M.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Influência de fitorreguladores em explantes de botões florais de *Butia lallemantii* (Arecaceae)**. In: XXI Encontro de Pós-Graduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.



ENPOS XXI ENCONTRO DE
PÓS-GRADUAÇÃO

INFLUÊNCIA DE FITORREGULADORES EM EXPLANTES DE BOTÕES FLORAIS DE *Butia lallemantii* (ARECACEAE)

MARCELO PISKE ESLABÃO¹; MARISA TANIGUCHI SARTO²; GUSTAVO HEIDEN³; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas - marceloesl7@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - marisataniguchi@yahoo.com.br

³ Embrapa Clima Temperado - gustavo.heiden@embrapa.br

⁴ Embrapa Clima Temperado - leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Butia Becc. (Arecaceae) é um gênero de palmeiras que ocorre no sul da América do Sul (Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai). Devido ao manejo, as práticas agrícolas e a expansão urbana em áreas de ocorrência natural (RIVAS & BARBIERI, 2014), *Butia lallemantii* Deble & Marchiori, espécie nativa do sudoeste do Rio Grande do Sul no Brasil e do departamento de Rivera no Noroeste do Uruguai (ESLABÃO et al., 2016), encontra-se ameaçada de extinção na categoria "em perigo" (FZB, 2016; ESLABÃO, 2017).

A cultura de tecidos de plantas tem desempenhado um papel importantíssimo na agricultura, com múltiplas finalidades, tais como: propagação de plantas, melhoramento genético, intercâmbio e conservação de germoplasma, entre outras. Dentre as técnicas presentes na cultura de tecidos, a embriogênese somática vem sendo aplicada com êxito para diferentes palmeiras (DE CAMPOS, 2018). Porém, há uma escassez de informações sobre embriogênese somática em *Butia*. A indução à embriogênese somática in vitro pode ser uma estratégia para a micropropagação de *B. lallemantii*.

O presente estudo teve como objetivo observar as respostas de explantes de botões florais de *B. lallemantii* (Arecaceae), frente ao uso de fitorreguladores.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul. Na ocasião foram utilizados botões florais de *Butia lallemantii* Deble & Marchiori, oriundas de espadas coletadas em abril de 2018, a partir de populações naturais localizadas no município de Manoel Viana, Rio Grande do Sul, Brasil.

Em câmara de fluxo, espadas foram desinfetadas em etanol (70%) durante 10 min, seguidas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 20 min e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, foram retiradas as ráquias das espadas que haviam sido submetidas à desinfestação por imersão em álcool etílico 70% durante cinco minutos. Logo em seguida, os botões florais femininos foram separados das ráquias, sofreram secção transversal em segmentos de aproximadamente 5 mm de comprimento e foram imersos em água destilada, esterilizada com ácido ascórbico. Posteriormente, foram inoculados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG 1962); 40% de sacarose; 3 g.L⁻¹ de carvão ativado; 2,5 g.L⁻¹ phytoigel; 1 % inositol; 1 g.L⁻¹ PVP. Os tratamentos utilizados foram: A - controle (sem adição de fitorregulador de crescimento), B - com adição de 250 mg.L⁻¹ de 2,4D e C - com adição de 250 mg.L⁻¹ de picloram. O pH do meio foi ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos. O material inoculado foi mantido em sala de crescimento, no escuro, por 30 dias, com temperatura de 25±2°C. Após esse

C.13 COPATTI, A. S.; TANIGUCHI, M.; DORNELES, A. O. S.; DALLMANN, C. M.; SILVA, T. B.; DUTRA, L. F. **Propagação *in vitro* de lúpulo cascade, utilizando benzilaminopurina como indutor de brotação.** In: XXI Encontro de Pós-Graduação, 2019, Pelotas. 5ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019.



PROPAGAÇÃO IN VITRO DE LÚPULO CASCADE, UTILIZANDO 6-BENZILAMINOPURINA COMO INDUTOR DE BROTAÇÃO

ANDRIO SPILLER COPATTI¹; MARISA TANIGUCHI²; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES²; CAMILA MÜLLER DALLMANN²; TALES BASILIO DA SILVA²; LEONARDO FERREIRA DUTRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – andriocopatti@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br; athos_odin@hotmail.com; camilacmdbiotec@gmail.com; talesbs28@gmail.com;

³Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Humulus* pertence à família Cannabaceae, *Humulus* é representado por três espécies principais: *H. lupulus* L., *H. scandens* (Lourr.) Merr. (syn. *H. japonicus* Siebold e Zucc.) e *H. yunnanensis* Hu, *Humulus lupulus* L., é distribuída entre as regiões temperadas da Europa, Ásia Ocidental e América do Norte (BOCQUET et al., 2018).

Os compostos químicos encontrados em *H. lupulus* são os principais componentes de aromatizantes e amargor cerveja. O lúpulo tem sido utilizado para fins cervejeiros por 1200 anos ou mais. Sendo também utilizado como fármaco apresentando significativos efeitos na saúde humana. Possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e contém prenilflavonóides, um dos fito-estrógenos mais ativos conhecidos. Os óleos e resinas do lúpulo são conhecidos pelas suas propriedades sedativas, além de apresentarem efeitos antibacterianos e antifúngicos. O alfa-ácido amárico presente nas inflorescências tem efeito positivo no controle de várias doenças complexas (síndrome metabólica) (KARABÍN, et al., 2016; BOCQUET et al., 2018).

No Brasil o cultivo dessa planta é recente, não havendo até o momento dados técnicos de cultivo, tratamentos culturais e produção para esta cultura. O *H. lupulus* L. é altamente heterozigoto, por ser uma planta dioica, as populações obtidas por reprodução sexuada são altamente variáveis. Portanto, para fins comerciais, o *H. lupulus* L. é propagado de forma vegetativa, tanto a partir de rizomas como por estacas herbáceas (MENDES FAGHERAZZI; RUFATO, 2017). No entanto, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, como a propagação de patógenos (SILVA et al., 2016). Nesse contexto, a cultura de tecidos de plantas vem sendo utilizada atualmente como um complemento aos métodos tradicionais de propagação.

A propagação *in vitro* possibilita a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz, auxiliando na uniformidade e reduzindo o tempo de propagação, pois, não depende das condições climáticas (KELLER, et al., 2013). Possibilitando a obtenção de elevado número de plantas em um curto período e espaço reduzido, com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo as exigências e padrões necessários (CARVALHO et al., 2011; DIAS et al., 2014).

O sucesso da cultura de tecidos depende de vários fatores. A escolha do regulador de crescimento a ser adicionado ao meio de cultura é determinante na

C.14 MIRANDA, T. M.; TANIGUCHI, M.; ARAUJO FILHO, J. C. P. J.; SILVA, TALIS BASÍLIO; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Silício no desenvolvimento in vitro de batatas silvestres sob estresse de calor.** In: XXIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2020, Pelotas. 6º SIIPE Semana Integrada UFPEL 2020, 2020.



SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE BATATAS-SILVESTRES SOB ESTRESSE DE CALOR

THAIS MONTEIRO MIRANDA¹; MARISA TANIGUCHI²; JULIO CESAR PAES JACOME DE ARAUJO FILHO³; TALES BASILIO SILVA⁴; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁵; GUSTAVO HEIDEN⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – thaismird@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – fhjulioceasar@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – talesbs28@gmail.com

⁵ Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

⁶ Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae) é uma das culturas mais importantes, tanto pelo valor econômico, quanto pelo nutricional (SANTOS et al., 2010). Os parentes silvestres da batata podem ser fonte de características de interesse no melhoramento genético, visando desenvolver variedades que aumentem a resiliência da cultura e a produtividades dos agricultores (CIP, 2020).

No Brasil, *Solanum malmeanum* Bitter e *S. chacoense* Bitter são espécies nativas de batatas-silvestres promissoras no melhoramento genético. A *S. malmeanum*, é encontrada também no Paraguai e Argentina (HAAN; RODRIGUEZ 2016), quando submetida a autocruzamento demonstrou autocompatibilidade, ocorrendo formação de frutos com produção de sementes (KLASEN; CASTRO; HEIDEN, 2017), além disso estudos com essa espécie apresentam características de interesse, como diferentes níveis de resistência à murcha bacteriana (SIRI, et al., 2008). Já, *S. chacoense* é tolerante a murcha bacteriana e a murcha de verticílio, produz raízes mais longas e com maior área de superfície, in vitro, quando comparada a batata cultivada (CONCIBIDO, et al., 1994; CHEN et al., 2013; CHRISTENSEN et al., 2017).

A cultura da batata requer cuidados de solo, disponibilidade de água e nutrientes para a formação dos tubérculos (SORATTO et al., 2011). A temperatura tem papel fundamental no ciclo de crescimento, e quando elevada pode afetar a tuberização, absorção de nutrientes e aumentar a ocorrência de pragas e doenças (MUTHONI et al., 2012; BOSCHI et al., 2017). O silício (Si) proporciona melhor absorção de nutrientes, proteção contra pragas e doenças, e melhora na disponibilidade de fósforo (P) (JOB, 2019).

Nesse contexto, o objetivo do estudo foi observar a influência do silício na regeneração de gemas de *Solanum malmeanum* e *S. chacoense* cultivadas in vitro sob estresse de calor.

2. METODOLOGIA

Segmentos uninodais de aproximadamente 1,5 cm foram excisados de acessos cultivados in vitro de *Solanum malmeanum* (BGB 084) e *S. chacoense* (BGB 083) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Batata da Embrapa Clima Temperado. Os segmentos foram inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,1 mg/L⁻¹ de inositol, 30 g/L⁻¹ de sacarose, 3 g/L⁻¹ de phytagel e 0,5; 1,0 ou 1,5 mg/L⁻¹ de silício (Si). O tratamento

C.15 SILVA, T. B.; TANIGUCHI, M.; NICOLAO, R.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Desenvolvimento *in vitro* de *Solanum calvences* sob deficiência de nitrogênio.** In: XXIX Congresso de Iniciação Científica, Pelotas. 6º SIIPE Semana Integrada UFPE, 2020.



COCIC XXIX CONGRESSO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE *Solanum calvences* SOB DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO

TALIS BASILIO DA SILVA¹, MARISA TANIGUCHI², RODRIGO NICOLAO³,
JULIANA APARECIDA FERNANDO⁴, GUSTAVO HEIDEN⁵, LEONARDO
FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – talesbs28@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – rodrnicolao@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – juli_fernando@yahoo.com.br;

⁵Embrapa Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Solanum calvences Bitter é uma espécie de batata-silvestre, parente da batata cultivada (HAWKES, HJERTING; 1969), que caracteriza-se por apresentar má formação das anteras, as quais são estéreis e não produzem pólen, dificultando sua utilização em programas de melhoramento genético. Para alguns autores *S. calvences* é sinônimo de *S. chacoense*, representando plantas triploides dessa espécie (HAWKES; HJERTING, 1969; BRÜCHER, 1975; HIJMANS et al., 2007; KLASSEN; CASTRO; HEIDEN, 2017).

Atualmente, devido às mudanças climáticas, estudos com germoplasma de parentes silvestres da batata, são importantes como forma de tornar disponíveis informações para uso em programas de melhoramento. No Brasil, *S. calvences* destaca-se por apresentar características de tolerância a estresses bióticos e abióticos (SARTO et al., 2018). Além disso, se trata da única batata-silvestre brasileira com distribuição tropical e acredita-se que o germoplasma dessa espécie possa apresentar genes de interesse (MOLIN; CASTRO; HEIDEN, 2017).

Em relação à estresses abióticos, a eficiência do uso de nutrientes se torna importante em busca de características associadas a sua absorção e utilização (SCHUM, 2014). *Solanum tuberosum*, por apresentar elevado potencial produtivo, depende muitas vezes da fertilização com o uso de nitrogênio (MILAGRES, 2018). Na utilização deste nutriente deve-se evitar doses elevadas, pois pode induzir a planta a alongar excessivamente a parte aérea, e se for aplicada tardiamente pode interferir na qualidade dos tubérculos (CARDOSO, 2017). Tem-se utilizado doses em parcelas na aplicação do nitrogênio, reduzindo uma possível lixiviação (MILAGRES, 2018).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho, foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de *S. calvences* sob deficiência de nitrogênio.

Apêndices D - Resumos apresentados em anais de congressos

D.1 SARTO, M. T.; ESLABAO, M. P.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Criopreservação ex situ de espécies de Butia (Arecaceae).** In: V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018, FORTALEZA. V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018.

Conservação ex situ de espécies do gênero *Butia* (Arecaceae)

MARISA TANIGUCHI SARTO¹; MARCELO
PISKE ESLABÃO²; Tales Basílio da Silva³; JULIANA APARECIDA FERNANDO³;
GUSTAVO HEIDEN⁵; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – marceloesl7@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – juli_fernando@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – juli_fernando@yahoo.com.br

⁵EMBRAPA Clima Temperado – gustavo.heiden@embrapa.br

⁶Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

Resumo

Butia é um gênero de palmeiras ocorrente no Brasil, com interesse agroindustrial, ornamental, medicinal e alimentício. As distintas espécies encontram-se ameaçadas, devido à degradação do habitat natural pela agricultura intensiva, desmatamento, urbanização e extrativismo predatório. Neste contexto, a criopreservação é uma alternativa para conservação em longo prazo de recursos genéticos de *Butia*. Objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação, viabilizando a conservação em longo prazo dessas espécies. Sementes de *B. odorata*, *B. paraguayensis* e *B. yatay* foram desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos; em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 2,5 % de cloro ativo e duas gotas de Tween 20®, por 20 minutos; e submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Embriões foram extraídos e pré-tratados com sacarose (0,4 M) ou não (testemunha), por 60 minutos. Posteriormente, foram imersos em PVS2 (Plant vitrification solution 2), por 20 minutos a 0°C e em nitrogênio líquido a -196°C, durante 5 dias. O descongelamento foi realizado a 37 °C por 2 minutos em banho maria e lavagem em solução de sacarose 1,2 M. Seguido de inoculação em meio de cultivo MS com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), carvão ativado a 1,5% p/v, sacarose a 3% p/v e ágar a 0,5%. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições contendo cinco embriões cada uma. Decorridos 30 dias de cultivo, observou-se regeneração de 30% dos embriões de *B. yatay* e 15% dos embriões de *B. odorata* pré-tratados com 0,4 M de sacarose. Em *B. paraguayensis* pré-tratados e no tratamento controle, não houve regeneração dos embriões. A baixa percentagem de germinação dos embriões possivelmente está relacionada ao tempo de armazenamento das sementes, considerando um possível comportamento de sementes

intermediárias ou recalcitrantes. No entanto, a solução de sacarose demonstrou alto potencial para uso como pré-tratamento em protocolos de criopreservação. Conclui-se que novos estudos de tempo de armazenamento e desidratação de sementes das espécies de *Butia* devem ser realizados utilizando soluções concentradas de sacarose, a fim de otimizar a criopreservação e viabilizar a conservação em longo prazo

1. INTRODUÇÃO

O butiazeiro é uma palmeira pertencente à família arecaceae, característica do Uruguai e do Brasil (FIOR et al., 2011). Apresenta diversas possibilidades de usos na agroindústria devidos seus atributos nutricionais e medicinais. Além disso, possui potencial paisagístico (LOPES e al., 2011). Apesar de sua importância, a conservação de populações naturais e multiplicação do butiazeiro apresentam limitações devido à propagação convencional ser por sementes, e essas por sua vez apresentam dormência com germinação lenta, baixa e desuniforme, o que onera e limita a produção de mudas (FIOR et al., 2011; LOPES e al., 2011). Adicionalmente, o extrativismo predatório aliado às ações como desmatamento, queimadas, e

D. 2 SARTO, M. T.; SANTOS, J. S.; MACHADO, I. E. F.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Indução de calos in vitro em *Solanum calvescens* (Solanaceae)**. In: V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018, FORTALEZA. V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2018.

INDUÇÃO DE CALOS IN VITRO EM *SOLANUM CALVESCENS* (SOLANACEAE)

Marisa Taniguchi Sarto¹; Jaqueline da Silva dos Santos¹; Inessa Emanuelle da Fonseca Machado¹; Juliana Aparecida Fernando¹; Gustavo Heiden²; Leonardo Ferreira Dutra²

¹Universidade Federal de Pelotas ²Embrapa Clima Temperado. *E-mail do autor apresentador: leonardo.dutra@embrapa.br

Solanum calvescens é uma espécie de batata-silvestre, parente da batata cultivada comercialmente (*Solanum tuberosum*). A espécie possui características de tolerância a estresses bióticos e abióticos com potencial de uso no melhoramento da batata cultivada. Não há relatos de estudos com a espécie, seja em relação à sua conservação, seja para elucidar seu comportamento em cultivo in vitro. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi induzir calogênese em explantes foliares e ápices de *S. calvescens*, com o intuito de otimizar o cultivo in vitro e possível incorporação em programa de melhoramento genético. Explantes foliares excisados (3 mm²) contendo a nervura principal foram inoculados com a parte abaxial em meio de cultura MS suplementado com 30 g de sacarose, PVP a 1 g L⁻¹, 2,4-D - ácido diclorofenóxiacético (0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µM) e geleificado com 2,5 g de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O mesmo procedimento foi realizado para ápices excisados com aproximadamente 2 mm. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições constituídas por uma placa contendo 10 explantes cada uma. O material estabelecido foi mantido em sala de crescimento, no escuro, por 30 dias a 25±2° C. Após 30 dias de cultivo, foram analisadas porcentagem de formação de calos e formação de raízes. Não foi observada a formação de calos e raízes em explantes foliares, no entanto, verificou-se o intumescimento em 15% dos explantes submetidos a 10,0 µM de 2,4-D. A concentração de 5 µM de 2,4-D proporcionou a maior porcentagem (77%) de ápices com formação de raízes e menor formação de calos (17%). Quando houve o aumento da concentração de ácido 2,4-D para 20µM, houve 50% de explantes com formação de calos e 15% com formação de raízes. Cada tecido da planta pode apresentar respostas diferentes frente às alterações das concentrações de reguladores de crescimento, como as auxinas, sendo que o efeito fisiológico de cada regulador depende da sua concentração no meio e da concentração endógena presente nos explantes utilizados, podendo promover ou não um balanço hormonal. Embora a formação de raízes não seja desejável, neste caso, tal resposta indica que há viabilidade de se estabelecer o cultivo in vitro da espécie. Conclui-se que a adição de 20,0 µM de 2,4-D induziu maior formação de calos, enquanto que a adição de 5,0 µM de 2,4-D favoreceu a formação de raízes em ápices de *S. calvescens*.

Palavras-chave: Batata-silvestre; calogênese; recursos genéticos.

Agradecimentos: CAPES, CNPq (429368/2016-0), EMBRAPA, UFPEL.

D.3 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; DORNELES, A. O. S.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Criopreservação de *Solanum chacoense* (Solanaceae)**. In: 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Petrolina. Anais do 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. 2019.

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Solanum chacoense* (Solanaceae)

MARISA TANIGUCHI¹; ANDRIO SPILLER COPATTI²; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES³; JULIANA APARECIDA FERNANDO⁴; GUSTAVO HEIDEN⁵; LEONARDO FERREIRA DUTRA⁶

Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (441493/2017-3) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC.

- (1) Doutoranda; Universidade Federal de Pelotas; Pelotas, RS; marisataniguchi@yahoo.com.br
 (2) Doutorando; Universidade Federal de Pelotas; Pelotas, RS; andriocopatti@gmail.com
 (3) Doutorando; Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS; athos_odin@hotmail.com
 (4) Professora; Universidade Federal de Pelotas; Pelotas, RS; juli_fernando@yahoo.com.br
 (5) Pesquisador; Embrapa Clima Temperado; Pelotas, RS; gustavo.heiden@embrapa.br
 (6) Pesquisador; Embrapa Clima Temperado; Pelotas, RS; leonardo.dutra@embrapa.br

Solanum chacoense é uma batata-silvestre, parente das batatas cultivadas (*Solanum tuberosum*), que possui resistência à diversas doenças, tolerância a estresses abióticos e com adaptação em uma ampla gama de habitats. Em função destas características, sua utilização em programas de melhoramento de batata é imprescindível. No entanto, este recurso genético é cada vez mais vulnerável às ações antrópicas, o que pode ser contornado com técnicas de conservação em longo prazo como a criopreservação. O trabalho objetivou estabelecer o tamanho ideal dos explantes para criopreservação via vitrificação. Segmentos caulinares e gemas axilares de *Solanum chacoense*, com aproximadamente 2 e 3 mm, respectivamente, foram isoladas de plântulas cultivadas in vitro. Os explantes foram pré-cultivados em meio de cultivo MS 0,3 M de sacarose, por 24 horas em condições de escuro. Decorrido este período, procedeu-se o encapsulamento dos explantes em matriz de alginato de sódio 4% (w/v), constituída por alginato de sódio, dissolvida meio de cultivo MS 50% dos sais minerais, acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), inositol (0,1 g L⁻¹) e PVP (1 g L⁻¹). A complexação foi realizada em solução de cloreto de cálcio (100 mM) por 20 minutos, com posterior triplice lavagem em água destilada autoclavada e descomplexação em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos. O tratamento controle constituiu-se de explantes não encapsulados. Posteriormente, os explantes foram tratados com solução de carregamento por 20 minutos antes da imersão em PVS2 por 50 minutos. Após, o material foi inserido em tubos de criopreservação de 10 mL contendo PVS2 e imersos em nitrogênio líquido, por 24 horas. O descongelamento foi realizado por imersão em banho-maria a 40 °C por três minutos e em solução de descarregamento a 25 °C por 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 36 µmol m⁻²s⁻¹ e 25 ± 2 °C. Foram utilizados para cada tratamento 3 parcelas, compostas por 3 placas de Petri

D.4 TANIGUCHI, M.; COPATTI, A. S.; SILVA, T. B.; FERNANDO, J. A.; HEIDEN, G.; DUTRA, L. F. **Cultivo *in vitro* de batatas silvestres**. In: 22º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 9º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2019, Petrolina.

D.5 SARTO, M. T.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F. **Otimização do cultivo *in vitro* de butiazeiro (*Butia odorata*, Arecaceae).** In: 70° CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2019, Maceió. 70° CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA e 36ª REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2019.



Otimização do cultivo “in vitro” de butiazeiro (*Butia odorata*, Arecaceae)

Taniguchi, Marisa ⁽¹⁾; Fernando, Juliana A. ⁽¹⁾; Dutra, Leonardo F. ⁽²⁾

(1) Universidade Federal de Pelotas; (2) Embrapa Clima Temperado
marisataniguchi@yahoo.com.br

Os butiazeiros são palmeiras pertencentes à família Arecaceae, com potencial ornamental, medicinal e alimentício. As espécies de *Butia* estão ameaçadas de extinção em função de ações antrópicas. Além disso, a conservação de populações naturais e a multiplicação dos butiazeiros são limitadas, já que suas sementes apresentam dormência, germinação lenta, baixa e desuniforme, onerando e dificultando a produção de mudas. Assim, o estabelecimento de técnicas de cultivo “in vitro” é uma ferramenta para estudos de germinação, produção de mudas e conservação de recursos genéticos de *Butia*. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estabelecer protocolo de germinação “in vitro” de sementes de *Butia odorata*. As sementes foram desinfestadas, os embriões excisados e inoculados em frascos contendo meio MS, com 75% dos sais minerais, suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar, 6,5 g L⁻¹, acrescido de 0,25 g L⁻¹ de inositol, 1 g L⁻¹ de carvão ativado, PVP 1 g L⁻¹ e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L⁻¹. A testemunha constou de meio de cultura sem adição do fitorregulador. O pH do meio foi ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem a 120° C. Após a inoculação, os tubos foram mantidos no escuro por sete dias. Aos 30 dias avaliaram-se a germinação (de acordo com a protrusão da radícula), o comprimento da parte aérea e comprimento da raiz. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando para cada tratamento cinco parcelas, compostas por cinco frascos, contendo cinco embriões cada um. Os maiores percentuais de germinação (74%) foram obtidos em meio de cultivo com 2,0 e 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os maiores comprimentos de parte aérea e de raízes foram obtidos com adição de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. O aumento dos comprimentos da parte aérea e das raízes pode estar relacionado ao efeito da auxina que, aplicada em baixas concentrações, induz o crescimento, o desenvolvimento e a expansão dos tecidos vegetais. O cultivo no escuro por sete dias, o uso do carvão ativado e adição de 2,4-D ao meio de cultura, proporcionaram um percentual maior de plântulas enraizadas. Dessa forma, o presente protocolo pode auxiliar em estudos futuros para a manutenção da propagação das espécies de *Butia* spp.

(CAPES, CNPq, EMBRAPA, UFPEL, NEOTROPICAL GRASSLAND CONSERVANCY)

Palavras-chave: Monocotiledônea, Arecaceae, Germinação “in vitro”



D.6 TANIGUCHI, M.; GOVEIA, G. G.; DALLMANN, C. M.; DUTRA, L. F. **Obtenção de unidade encapsuláveis de mandioca 'vassourinha'**. In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2020, Edição on-line. VI Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2020.



VI CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS
RECURSOS GENÉTICOS E BIOECONOMIA: INOVAÇÃO PARA UM FUTURO SUSTENTÁVEL

Unidades encapsuláveis de mandioca (Vassourinha)

Marisa Taniguchi¹; Guilherme Gouveia²;
Camila Müller Dallmann³; Leonardo Ferreira Dutra⁴*

¹Universidade Federal de Pelotas; ²Universidade Federal de Pelotas; ³Universidade Federal de Pelotas; ⁴ Embrapa Clima Temperado *E-mail do autor apresentador: (Utilizar fonte Arial 11).

A produção da raiz de mandioca exerce papel fundamental na segurança alimentar de países em desenvolvimento, estando presente em mais de 100 países. A mandioca apresenta grande potencial produtivo devido a suas características, de tolerância a déficits hídricos, a diversos patógenos, é consumida em diferentes formas no Brasil. Dentro da Cultura da mandioca o acesso utilizado, Vassourinha uma Crioula, é importante para a base genética e o melhoramento da mandioca. Portanto, formas de transferência e transporte, desse recurso genético é de interesse, assim, a utilização de unidades encapsuláveis apresenta vantagens devido as suas principais função serem a proteção dos propágulos, a facilidade de armazenamento, conservação e intercâmbio de germoplasma. Objetivo desse trabalho, foi testar o meio de regeneração de unidades encapsuláveis de mandioca Vassourinha. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado. Gemas laterais, foram excisados de plantas de mandioca cultivadas in vitro, adicionadas à matriz de alginato de sódio 4% (w/v). A composição da matriz de encapsulamento foi constituída por alginato de sódio, dissolvida em MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em seguida, as gemas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM) por 20 minutos para complexação. Posteriormente, foram imersas em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio e descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos. As unidades encapsuláveis foram então inoculadas em meio de cultivo de acordo com o tratamento T1-MS 42 + 0,02 ANA; T2 -MS 42 + 0,02 BAP + 0,02 ANA; T3- MS 20+ 0,05 BAP +0,1 ANA +0,2 GA₃; T4-MS 20+ 0,02 BAP +0,01 ANA +0,1 GA₃, Todos os tratamentos foram acrescidos de sacarose (30,0 g L⁻¹), inositol (0,1 g L⁻¹) e PVP - polivinilpirrolidona (1,0 g L⁻¹). posteriormente o material foi mantido sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C, durante 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições, compostas por uma placa, contendo 10 unidades encapsuláveis cada uma. A variável analisada foi porcentagem de emergência de unidades encapsuláveis. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância utilizando-se o software estatístico SISVAR[®]. Foi observado maior porcentagem (30%) de emergência das cápsulas, no meio de cultivo T4, seguidos de 30% T3, 20% T2 e 20% T1. Além dos danos que podem ser causados pelo manuseio do material, acredita -se que para explantes de vassourinha sejam necessárias novas adaptações de meios de regeneração das cápsulas, além de observar a possibilidade alterar a composição da cápsula para induzir ao melhor desenvolvimento dos explantes.

Palavras-chave: Mandioca, unidades encapsuláveis.

Apêndices E - Demais tipos de produção técnica

E.1 TANIGUCHI, M.; ESLABAO, M. P.; SILVA, T. B.; BARBIER, R. L.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F.; HEIDEN, G. **Estabelecimento *in vitro* e Criopreservação de Espécies de *Butia* (Arecaceae) para Conservação *ex situ* de Germoplasma.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 337, 2020.

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.



Estabelecimento *in vitro* e criopreservação de espécies de *Butia* (Arecaceae) para conservação *ex situ* de germoplasma

Marisa Taniguchi¹; Marcelo Piske Eslabão²; Tales Basílio da Silva³; Rosa Lía Barbieri⁴; Juliana Aparecida Fernando⁵; Leonardo Ferreira Dutra⁶; Gustavo Heiden⁷

¹ Bióloga, mestra em Fisiologia Vegetal, doutoranda em Fisiologia Vegetal, UFPEL, Pelotas, RS.

² Biólogo, mestre em Agronomia, doutorando em Agronomia, UFPEL, Pelotas, RS.

³ Graduando de Ciências Biológicas, UFPEL, Pelotas, RS.

⁴ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

⁵ Bióloga, doutorado em Biologia Vegetal, docente da UFPEL, Pelotas, RS

⁶ Engenheiro Agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

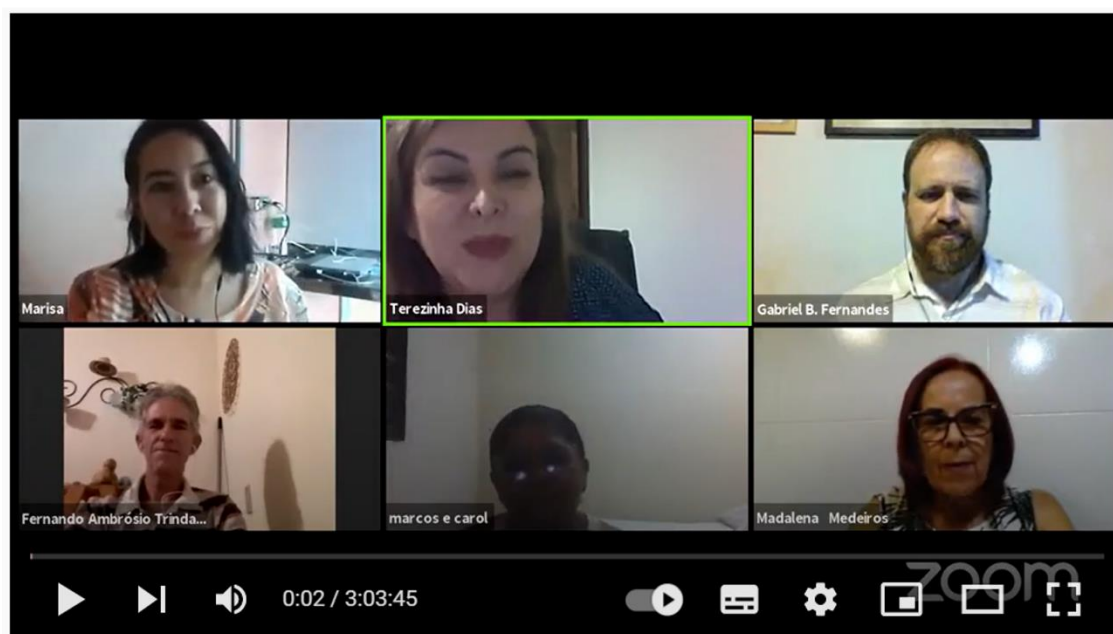
⁷ Biólogo, doutor em Botânica, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Apêndices F - Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

F.1 BIO.SABER. **Fisiologia Vegetal e a conservação *ex situ* de recursos genéticos da biodiversidade brasileira.** Plataforma YouTube, 01 jul. 2020. Disponível em: <https://youtu.be/2_DKgyVZAbY>.



F.2 REDE REPOUSO AGROECOLOGIA. **Métodos de conservação de sementes.** Plataforma YouTube, 17 set. 2021. Disponível em: <<https://youtu.be/3gemepkl2bg>>.



F.3 REDE REPOUSO AGROECOLOGIA. **Mudanças climáticas, sementes crioulas e segurança alimentar.** Plataforma YouTube, 10 set. 2021. Disponível em: <<https://youtu.be/7rrleHMPWYk>>.



E.4 TANIGUCHI, M. **Prospecta: Biofábrica Amazônia**. Plataforma YouTube, mar. 2022. Disponível em: <https://youtu.be/zvFr1Sh_gxE>.



Apêndices G - Participação em bancas de trabalhos de conclusão

G.1 OLIVEIRA, J. H. F.; WALBER, C. D.; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Adryelle Subtíl de Quadros. **Fitoterápicos: higiene e cura a base de plantas**. 2021 - Escola SESI Ensino Médio Heitor José Muller.

G.2 GALLO, C. M.; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Abel da S. Costa Sobrinho e Albertino G. dos Santos Neto. **Aspectos do saneamento básico no Brasil e uma análise do Estado de Alagoas**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade São Vicente de Pão de Açúcar.

G.3 GALLO, C. M; TANIGUCHI, M. Participação em banca de Juliene dos Santos Silva e Quiteria Suzana Candido de Matos. **Etnobotânica de plantas medicinais na comunidade quilombola mocambo - Porto da Folha - Sergipe.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade São Vicente.

G.4 GUERIOS, M. H. S.; TANIGUCHI, M.; ROSA, G. G. Participação em banca de Débora Goulart Iodi e Lorena Pittet. **Métodos de propagação de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.).** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Positivo

Apêndices H - Participação em bancas de comissões julgadoras

H.1 WALBE, C.; OLIVEIRA, J.; TANIGUCHI, M. **A influência do espectro de cores no crescimento das plantas.** 2020. Escola SESI Montenegro.

H.2 SARTO, M. T. **VII Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Clima Temperado Ciência na prática.** 2018. Embrapa Clima Temperado.

Apêndices I - Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de Conclusão de Curso

I.1 Talis Silva Basílico. **Criopreservação de *Solanum Commersonii malmeanum*.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas. Orientador: Marisa Taniguchi.

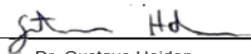
Iniciação Científica

I.2 Rodrigo Nicolão. **Relatório de estágio curricular supervisionado. 2019. Iniciação Científica.** (Graduando em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Marisa Taniguchi.

Atestado

Atestamos, para os devidos fins, que Marisa Taniguchi, coorientou o aluno do curso de Agronomia, da Universidade Federal de Santa Catarina do curso de Agronomia, durante o cumprimento do seu estágio curricular obrigatório, entre o período 07 de janeiro e 08 de março de 2019.

Título Cultivo in vitro de batata silvestre
Discente Rodrigo Nicolão
Data de início da orientação 07 janeiro 2019
Data de fim de orientação 08 março 2019



Dr. Gustavo Heiden

Doutor em Botânica pela Universidade de São Paulo

Pelotas, 05 de abril de 2019