



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Caracterização de diásporos e conservação *ex situ* de populações de
Butia capitata [Mart. (Becc.) Arecaceae]

Giuliano Carvalho Frugeri

BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO-2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Caracterização de diásporos e conservação *ex situ* de populações de
Butia capitata [Mart. (Becc.) Arecaceae]

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Botânica como exigência para
obtenção do título de mestre.

Aluno: Giuliano Carvalho Frugeri

Orientador: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Coorientadora: Dra. Gabriela Ferreira Nogueira

BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO-2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pai e mãe, por toda a compreensão, auxílio e companheirismo.

Agradeço a minha tia Francisca e o Gilberto pelo carinho, hospitalidade e preocupação.

Agradeço ao professor e orientador Jonny Everson Scherwinski Pereira, por me aceitar como orientando, pela paciência e compreensão e assim me ajudando a ser um cientista.

Aos colegas de laboratório: Paulo, Emília, Jenifer, Jaqueline, Inaê, Luciana, André, Felipe, Patrícia, Hugo e Raphael pela companhia e ajuda nos momentos de dúvida.

Um obrigado a dupla Gabriela e Zan, pela paciência em explicar, quantas vezes fosse necessário, cada experimento, cada técnica e também pelas conversas e conselhos.

Obrigado ao professor Luciano e a equipe pedagógica do IFGoiano Campus Morrinhos pela compreensão e auxílio durante minhas ausências. Também ao professor Audicir por disponibilizar as sementes para os experimentos.

Obrigado aos colegas da UNB. Foram várias parcerias feitas durante as matérias que ajudaram de algum modo no meu crescimento científico.

Aos amigos: Luiz, Diogo, Bruno e Tadeu, obrigado pelas conversas de incentivo.

Obrigado Rejane por tudo. Em todos os momentos você esteve presente e de alguma forma ajudando. Obrigado pelo carinho e pela atenção durante esse período de estudo.

A todos do departamento e secretaria de botânica...

OBRIGADO

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama esquemático de diásporos de *B. capitata*. A: comprimento longitudinal; B: diâmetro equatorial. A seta indica o eixo na qual foram realizadas as medições com três repetições; C: espessura da polpa; D: pirênio (endocarpo e endosperma)..... 11
- Figura 2. Aspecto geral do diásporo de *Butia capitata*. A: Fruto; B: Pirênio (endocarpo e semente) destaque ao opérculo; C: corte longitudinal do endocarpo, destaque para a posição do embrião; D: semente; E: corte longitudinal de uma semente, destaque para o embrião..... 18
- Figura 3. Etapas da germinação *in vitro* de *Butia capitata*. A: embrião curvado 10 dias, após a inoculação; B: protusão da radícula seguida da emissão da bainha foliar; C: plântula com 60 dias, após a inoculação com parte aérea desenvolvida (seta: destaque da radícula); D: parte aérea pigmentada, após exposição a luz; E: plântula completa aos 200 dias, após a inoculação. As etapas de A a C ocorreram na ausência de luz e etapas de D a E ocorreram na presença de luz..... 23
- Figura 4. Teor de umidade de embriões zigóticos de populações de *Butia capitata* em função do tempo de dessecação. Equações da regressão: Arinos $y = 0,8817x^2 - 14,369x + 59,44$; $R^2 = 85,75\%$; Mirabela $y = 0,9049x^2 - 15,029x + 64,335$; $R^2 = 90,65\%$; Serranópolis $y = 0,9452x^2 - 16,035x + 68,878$; $R^2 = 91,26\%$ 28
- Figura 5. Germinação de embriões zigóticos de populações de *Butia capitata* em função do tempo de dessecação: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si para os embriões mergulhados em nitrogênio líquido (+NL) ou não mergulhados (-NL) e as médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ao longo do tempo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Equações da regressão: Arinos $y_{(-)NL} = -0,5357x + 68,4524$ $R^2 = 10,44\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -10,08x^2 + 19,46x + 0,8730$ $R^2 = 86,02\%^{**}$; Mirabela $y_{(-)NL} = -0,5952x + 68,3333$ $R^2 = 12,02\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -1,2259x^2 + 19,82x + 0,3968$ $R^2 = 86,28\%^{**}$; Serranópolis $y_{(-)NL} = -0,7436x + 80,11$ $R^2 = 9,22\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -1,1607x^2 + 18,27x + 4,528$ $R^2 = 88,57\%^{**}$; sendo N.S.= não significativo e ** = altamente significativo..... 30

Figura 6. Aclimatização de plantas provenientes de germinação *in vitro* de *Butia capitata*: A; plantas enraizadas antes do processo de aclimatização. B; pré-aclimatização das plantas utilizando copo transparente para isolamento e proteção da planta. C; planta transferida para saco plástico contendo solo em casa de vegetação..... 36

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Teores de umidade observados na polpa, na semente e no embrião zigótico de frutos de <i>Butia capitata</i> coletados em populações localizadas no norte de Minas Gerais, na safra 2014/2015.....	19
Tabela 2. Dados morfométricos referentes aos frutos, sementes e embriões de <i>Butia capitata</i> das populações de Arinos, Mirabela e Serranópolis.....	20
Tabela 3. Formação de radícula, parte aérea e desenvolvimento de planta completa a partir de embriões excisados de sementes submetidas a diferentes temperaturas e tempos de armazenamento, em três populações de <i>B. capitata</i>	25
Tabela 4. Formação de parte aérea e da planta completa a partir de embriões zigóticos, oriundos de três populações de <i>B. capitata</i> , submetidos a diferentes tempos de dessecação, mantidos (+NL) ou não mantidos (-NL) em nitrogênio líquido.....	33

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
Atm	Atmosfera
°C	Grau Celsius
<i>et al.</i>	Expressão latina que significa “e outros”
g	Grama (unidade de medida de massa)
H	Hora (unidade de tempo)
L	Litro (unidade de medida de volume)
mL	Mililitro (unidade de medida de volume)
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
NL	Nitrogênio Líquido
S	Sul (orientação geográfica)
W	Oeste (orientação geográfica)
RAE	Equivalente de Atividade de Retinol

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A espécie <i>Butia capitata</i>	3
2.2. Importância da caracterização de frutos e sementes	5
2.3. Propagação	6
2.4. Conservação de germoplasma	7
2.5. Aclimatização.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Material vegetal	10
3.2. Caracterização de diásporos	10
3.3. Material vegetal para os experimentos de conservação.....	12
3.4. Conservação de sementes a médio-longo prazo em diferentes temperaturas	13
3.5. Criopreservação de embriões zigóticos.....	14
3.6. Aclimatização.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Caracterização de diásporos	17
4.2. Conservação de sementes a médio-longo prazo em diferentes temperaturas	22
4.3. Criopreservação de embriões zigóticos.....	27
4.4. Aclimatização.....	33
5. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

Popularmente conhecida como butiá ou cabeçudo o coquinho-azedo (*Butia capitata*) é uma espécie de palmeira endêmica do Bioma Cerrado, na região próxima a divisa dos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. Esta espécie destaca-se pela utilização como alimento e pelo comércio de produtos derivados de frutos, sementes e folhas. Esse estudo teve por objetivo caracterizar diásporos de três populações de coquinho-azedo (Arinos, Mirabela e Serranópolis), além de desenvolver estratégias de conservação *ex situ* da espécie, por meio do armazenamento de sementes e embriões zigóticos a médio-longo prazo em várias temperaturas, incluindo subzero. Inicialmente, frutos, sementes e embriões foram caracterizados quanto suas características morfológicas. Para a conservação, sementes das três populações foram armazenadas nas temperaturas de 25 °C, 6 °C, -20 °C e -196 °C por até 360 dias. Em outro experimento, embriões zigóticos foram criopreservados com diferentes teores de umidade. Como resultado, observou-se que a população de Arinos apresentou resultados mais expressivos para a maioria dos caracteres avaliados, como por exemplo comprimento e largura dos frutos e sementes. A conservação de sementes das três populações mostrou-se viável em temperaturas ultrabaixas (-20 e 196 °C), quando armazenadas em períodos de até 360 dias e com umidade próxima a 5%. A criopreservação de embriões zigóticos mostrou-se eficiente com na conservação da espécie atingindo taxas de germinação entre 70 e 86%, quando a umidade dos embriões mergulhados em nitrogênio líquido estavam entre 10 e 14%. Na fase de aclimatização as plantas que chegaram até a etapa da casa de vegetação apresentaram 90% de sobrevivência.

Palavras-chave: *Butia capitata*, conservação de sementes, criopreservação, embrião zigótico, germinação *in vitro*, germoplasma.

ABSTRACT

Popularly known as butiá or jelly palm, the “coquinho-azedo” (small coconut-sour), *Butia capitata* is an endemic palm species from the Cerrado biome, especially from the region near the border of the states of Goiás, Minas Gerais and Bahia. This specie stands out by the use as food and by the trade of products derived from fruits, seeds and leaves. This study aimed to characterize diaspores from three populations of “coquinho-azedo” (Arinos, Mirabela and Serranópolis) and to develop strategies for the *ex situ* conservation of the specie. These strategies included the mid and long-term storage of seed and zygotic embryos under many temperatures, including subzero. Initially, fruits, seeds and embryos were morphologically characterized. For the preservation of the three populations, seeds were stored at temperatures of 25 ° C, 6 ° C, -20 ° C and -196 ° C for up to 360 days. In another experiment, zygotic embryos were cryopreserved with different moisture contents. As a result, it was observed that the population of Arinos presented better results for most characters, such as length and width of fruits and seeds. The seed conservation of the three populations showed to be feasible in ultralow temperatures (-20 to 196 ° C) when stored for periods up to 360 days and moisture content around 5%. Cryopreservation of zygotic embryos was efficient allowing the conservation of the specie, whose germination rates reached from 70 to 86% when the humidity of embryos conserved in liquid nitrogen were from 10 to 14%, respectively. In the acclimatization phase, the plants that have reached the appropriate stage to the greenhouse had 90% survival.

Keywords: *Butia capitata*, germination *in vitro*, cryopreservation, zygotic embryos, seed storage, conservation.

1. INTRODUÇÃO

As palmeiras são importantes para a agricultura e economia do Brasil, principalmente pela produção de palmito, frutos, óleo, cera, madeira e produtos com fins medicinais (Kalil Filho e Resende, 2001). Entre as palmeiras com destaque no mercado nacional poderiam ser citadas o açazeiro (*Euterpe oleracea*) (Menezes *et al.*, 2008), o dendezeiro (*Elaeis guineenses*) (Camilo *et al.*, 2009), a macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Bandeira *et al.*, 2013), a pupunheira (*Bactris gasipaes*) (Yuyama *et al.*, 2003) e o cocoqueiro (*Cocos nucifera*) (Lorenzi *et al.*, 2010).

O gênero *Butia* pertence à família Arecaceae e está distribuído por vários países da América do Sul, entre eles o Brasil (Soares e Longhi, 2011), com diversas espécies presentes em território brasileiro (Lorenzi *et al.*, 2004).

Dentro desse gênero, a espécie *Butia capitata* ganha destaque pela utilização como alimento. Popularmente conhecida como butiá, cabeçudo ou coquinho-azedo, a espécie é endêmica do Bioma Cerrado, na região próxima a divisa dos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (Silva, 2008; Lorenzi, 2010; Lima, 2011). Quando em fase reprodutiva esta palmeira chega a medir até 5 m de altura, apresentando estipe recoberta por folhas de cor verde-acinzentada formando uma grande copa (Lima, 2011).

As folhas dessa palmeira são utilizadas na produção e venda de artesanatos, como vassouras e cestos. Seus frutos são aproveitados como fonte de alimento pelos moradores e pela fauna herbívora (Rossato e Barbieri, 2007; Faria *et al.*, 2008; Lima, 2010).

Contudo, as populações de *Butia* vêm sofrendo com o extrativismo descontrolado, o desmatamento e o pisoteio provocado pela criação extensiva de gado (Azambuja, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011), que também se alimenta de palmeiras jovens e das partes reprodutivas (Silva e Scariot, 2013). Adicionalmente, a espécie sofre influência mecânica do endocarpo que, devido a sua rigidez, dificulta a germinação (Fior *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2011) e impede a formação de bancos de sementes no solo e a regeneração de novas plantas (Silva e Scariot, 2013). Esses fatores em conjunto, limitam a

multiplicação para fins agronômicos e dificultam as atividades voltadas para conservação da variabilidade genética da espécie em condições de campo.

A variabilidade genética dentro de uma espécie é fundamental para garantir seu potencial adaptativo frente às adversidades ambientais (Ribeiro e Rodrigues, 2006). Magalhães *et al.* (2015) alertam para a erosão genética de populações de *Butia capitata* no Norte do Estado de Minas Gerais. Nesse sentido, estratégias de conservação e manejo de populações naturais surgem como alternativa para a solução de problemas de populações exploradas, impedindo que elas desapareçam da natureza, além de fornecer subsídios para o melhoramento genético, cultivo e propagação (Ribeiro e Rodrigues, 2006). Dentro dessas estratégias, as técnicas de cultura *in vitro* de tecidos e órgãos vegetais têm sido desenvolvidas e aprimoradas para superar limitações inerentes aos métodos tradicionais de propagação e conservação das espécies (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010). A criopreservação das estruturas vegetais tem mostrado a maneira mais eficaz de preservação a longo prazo por interromper o metabolismo celular e permitir a regeneração em qualquer momento sem risco de variação genética (Carvalho e Vidal, 2003).

Visto a importância social, ambiental e ecológica da espécie, aliado à erosão genética, ao endemismo da espécie e a escassez de trabalhos, esse estudo tem por objetivo a caracterização de diásporos de três populações de *Butia capitata*, além de desenvolver estratégias de conservação *ex situ* da espécie, por meio do armazenamento de sementes e embriões zigóticos a médio-longo prazo em temperaturas subzero e criogênicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Butia capitata*

Butia capitata (Mart.) Becc é uma palmeira com altura variando entre 3 e 5 metros, com folíolos rígidos e pecíolo com espinhos nas margens (Silva, 2008; Silva e Scariot, 2013). A espécie é popularmente conhecida como coquinho azedo, butiá ou cabeçudo, sendo encontrada nos Estados mais ao centro do Brasil, como: Goiás, Minas Gerais e Bahia (Lima *et al.*, 2011).

Durante a idade reprodutiva da planta, o limbo pode variar em comprimento entre 81 e 120 cm e as plantas podem conter 25 ou mais folhas (Rosa *et al.*, 1998). As folhas são usadas no artesanato para a confecção de cestos e cordões, e suas fibras são exploradas na indústria de vassouras (Fior *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011). A espécie pode ser explorada também como elemento de paisagismo em parques e jardins (Neves *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Fior *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011). Vale ressaltar que, apesar de apresentar características semelhantes, as plantas de *B. capitata* encontradas no Centro-Norte brasileiro não devem ser confundidas com as de *B. odorata* localizadas no Sul e em outros países, como o Uruguai e Argentina (Lorenzi *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013; Sant'ana-Santos *et al.*, 2015).

As flores de *B. capitata* são dioicas e estão fixadas em uma ráquila, formando uma inflorescência, com aproximadamente, de 64 ráquulas (Rosa *et al.*, 1998). Estas flores têm coloração amarela e as estruturas sexuais estão distribuídas desproporcionalmente, com o número de pistilos maior na base, dois ou três estames rodeando cada pistilo na porção mediana e somente estames no ápice da inflorescência, sendo toda a estrutura floral protegida por uma espata rígida (Mercadante-Simões *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2011). Em uma mesma inflorescência, estames atingem o amadurecimento, em média, 14 dias antes dos pistilos, evento conhecido como protandria (Rosa *et al.*, 1998; Mercadante-Simões, 2006). O período de floração da espécie ocorre entre os meses de março e setembro (Lima *et al.*, 2011).

Os frutos do coquinho azedo são do tipo drupa e apresentam coloração amarelada, avermelhada ou roxeada. O formato é oval e a polpa é carnosa. Parte do pericarpo pode ser usada na alimentação (Moura *et al.*, 2010). A frutificação ocorre nos meses de junho a dezembro (Lima *et al.*, 2011).

De acordo com Faria *et al.*, 2008, esses frutos apresentam alto valor nutricional quando comparado com outras espécies frutíferas. O teor de potássio é maior no coquinho azedo (462 mg/100g) que no abacate (347 mg/100g) e na banana (333 mg/100g), que são frutos considerados ricos neste mineral. A quantidade de vitamina C encontrada na polpa de coquinho azedo (53 mg/100g) é semelhante a laranja (47 mg/100g) e os valores de pró-vitamina A (146,2 RAE/100g) são equivalentes aos encontrados nos frutos de manga (60-215 RAE/100mg) e acerola (42-225 RAE/100mg). Em cada 100 gamas de polpa de fruto há quantidade suficiente para nutrir, com doses diárias recomendadas pelo Instituto Americano de Medicina, uma criança de 8 anos, com 100% de vitamina C e 40% de pró-vitamina A.

Com a retirada do epicarpo, geralmente amarelo, e do mesocarpo carnoso, observa-se uma estrutura resistente formada pelo endocarpo que envolve normalmente uma ou casualmente até três sementes (Moura *et al.*, 2010). A semente também é apreciada como alimento (Faria *et al.*, 2008a; Moura *et al.*, 2010), possuindo grande quantidade de lipídeos (predominância de ácidos láurico e outros ácidos de cadeia média), fibras e minerais como fósforo, potássio, magnésio e enxofre, sendo indicado para mistura e preparo de doces, pães e bolos (Faria *et al.*, 2008).

O endocarpo rígido interfere negativamente na germinação de *B. capitata*, uma vez que, induz dormência exógena mecânica ou física em suas sementes (Fior *et al.*, 2011). Estudos têm relatado que a escarificação e a retirada do endocarpo, geralmente, aumentam a percentagem de germinação e o índice de velocidade de emergência. Além disso, a escarificação associada à adição de ácido giberélico, diminui o tempo médio do processo germinativo (Lopes *et al.*, 2011).

2.2. Importância da caracterização de frutos e sementes

A caracterização dos frutos e sementes é importante por contribuir para a diferenciação de indivíduos em um mesmo gênero ou em gêneros diferentes (Cunha-Silva *et al.*, 2012). Desta forma, os dados podem ser utilizados para fins industriais ou agrônômicos, os quais podem ser baseados na produtividade, no sabor, no tamanho dos frutos e na percentagem de polpa, além da seleção de mudas ou matrizes para os mais diversos usos (Silva e Scariot, 2013).

Barbosa *et al.* (2010) ao observarem uma população de *M. flexuosa* (buriti), verificaram variações biométricas consideráveis em tamanho, forma e cor dos frutos, a fim de encontrar matrizes com maior potencial para a produção de óleo. Análise biométrica de frutos de *Butia* foram utilizados por Rivas e Barilani (2004) para estimar a capacidade reprodutiva no Uruguai. Reis *et al.* (2010) verificaram que em *Copernicia prunifera* (carnaúba), sementes de tamanho médio e grande apresentam maior velocidade na protusão do pecíolo cotiledonar. Diferenças morfológicas ou variações biometrias são critérios utilizados na escolha de sementes, com objetivo de produção de mudas mais vigorosas (Moura *et al.*, 2010; Silva e Scariot, 2013).

As diferenças na morfologia das estruturas podem indicar se essas ocorreram devido às variações genéticas entre as populações (Oliveira *et al.*, 2007) ou à resposta a fatores climáticos (Schwartz *et al.*, 2010). Essas variações servem como ferramenta para estudos da ecologia das espécies (Cunha-Silva *et al.*, 2012). A biometria pode apresentar-se como uma ferramenta que auxilia não só na seleção de características industriais e agrônômicas, mas também, no estudo de recuperação de espécies. São poucos os estudos que comparam dados biométricos entre populações do gênero *Butia* para esses fins, havendo poucas informações sobre as populações de *Butia capitata* no Norte de Minas Gerais.

2.3. Propagação

A propagação da maioria das espécies da família Arecaceae é sexuada (Sudharsan *et al.*, 1993; Scherwinski Pereira *et al.*, 2006) e, com algumas exceções, também pode ocorrer por divisão de touceiras (Lorenzi *et al.*, 2004). A germinação consiste em processos biológicos que ocorrem no embrião, caracterizado por uma sequência ordenada de eventos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, que resultam na retomada do crescimento que culmina na protusão da radícula (Ferreira e Borghetti, 2004; Costa e Marchi, 2008).

Geralmente em palmeiras, a germinação, em condições de campo, é lenta e desuniforme. O tempo de germinação varia entre e até nas mesmas espécies, podendo ainda assim, variar entre uma safra e outra em um mesmo indivíduo (Meerow e Broschat, 2012).

Plantas de coquinho azedo desenvolvem caule solitário e, portanto, não formam touceiras (Lorenzi *et al.*, 2010). A propagação é exclusivamente sexuada, porém, a germinação é considerada difícil, devido a dormência mecânica provocada pela interferência do endocarpo rígido e do opérculo, que promove resistência às células do embrião para romperem essa região (Lopes *et al.*, 2011; Fior *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). Assim, quando o pirênio é escarificado e o opérculo retirado, há uma melhora nas taxas e velocidade de germinação (Broschat e Donselman, 1987, Fior *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2011).

Vários autores destacam a necessidade de desenvolver protocolos para a regeneração *in vitro* de palmeiras, como o coquinho azedo, em virtude dos métodos clássicos de melhoramento genético dessas espécies serem complexos e demorados em razão do lento crescimento (Pereira *et al.*, 2007, Luis e Scherwinski-Pereira, 2014), da germinação ser considerada difícil (Lopes *et al.*, 2011; Fior *et al.*, 2011), por não formarem touceiras, o que impede o uso de métodos de propagação vegetativa convencionais (Lorenzi *et al.*, 2010), além da oportunidade de conservação da variabilidade genética (Ribeiro e Rodrigues, 2006).

2.4. Conservação de germoplasma

As populações naturais de *Butia capitata* vêm sofrendo em suas áreas de ocorrência com o extrativismo predatório, desmatamento e pisoteio provocado pela criação extensiva de gado (Azambuja, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011).

A conservação *ex situ*, ou seja, em condições diferentes às do seu habitat natural, vem ganhando destaque para a conservação de recursos genéticos de espécies ameaçadas de extinção e/ou com alguma importância econômica. Essa conservação desdobra-se em métodos convencionais, como preservação de plantas em campo, de sementes em câmaras de conservação, e em tecnologias alternativas, como a conservação *in vitro* (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010). A seleção de um ou vários métodos depende das necessidades, possibilidades e da espécie em foco (Santos e Bettencourt, 2002). Contudo, de maneira geral, o armazenamento de sementes é um dos métodos mais utilizados (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010), por serem a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas e, também, por algumas suportarem um determinado grau de secagem e baixas temperaturas durante o armazenamento (Costa, 2009).

A conservação de sementes consiste na dessecação de sementes atingindo baixos teores de umidade (3-7%) e o armazenamento em baixas temperaturas (Santos, 2001). A longevidade de uma semente é condicionada por características genéticas (Costa, 2009) e pelas condições de armazenamento, como umidade relativa, temperatura, tipo de embalagem, disponibilidade de oxigênio e período de armazenamento (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Em geral, as sementes são classificadas como ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. Sementes que toleram dessecação entre 5% e 7%, baixas temperaturas e apresentam maior tempo de tolerância de armazenamento são classificadas como ortodoxas. Sementes que, geralmente, não toleram dessecação e/ou baixas temperaturas são geralmente classificadas como recalcitrantes e sementes que toleram dessecação e suportam o

armazenamento em baixas temperaturas apenas por pequenos períodos de tempo são classificadas como intermediárias (Costa, 2009).

Os estudos de conservação de sementes, particularmente sob temperaturas criogênicas, são recentes e quando aplicados a palmeiras ainda são incipientes (Luis, 2013). As sementes de palmeiras são oleaginosas e quando armazenadas por longos períodos de tempo, normalmente, tem sua viabilidade reduzida, tornando um desafio para os pesquisadores desenvolver métodos de conservação para estas espécies (Peres *et al.*, 2004).

Em um estudo previamente realizado com *Butia capitata*, Dias (2012) verificou que as sementes foram sensíveis ao armazenamento a -18°C por 90 dias, o que não ocorreu em temperatura ultrabaixa do nitrogênio líquido (-196°C) que manteve a viabilidade das mesmas. Neste trabalho os autores não apresentam justificativa para tal comportamento, demonstrando que estudos adicionais com a espécie devem ser realizados a fim de avaliar a influência de diferentes umidades das sementes durante o armazenamento, estrutura e estabilidade de membranas, temperatura de descongelamento e o comportamento dessas durante o armazenamento a médio-longo prazo, uma vez que o referido trabalho foi realizado por apenas 90 dias.

2.5. Aclimatização

O processo de aclimatização consiste em submeter uma planta que desenvolveu em ambiente controlado às condições de campo de forma gradual, permitindo sua sobrevivência e crescimento (Ledo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007). Nas condições impostas durante o período *in vitro*, as plantas encontram dificuldades para a transição do mecanismo heterótrofo para o autótrofo (Bezerra, Aloufa e Lichston, 2009), devido a aspectos estruturais anatômicos, como espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, baixa capacidade de sustentação pela pouca quantidade de tecidos, como esclerênquima e colênquima, e estômatos não funcionais (Campostrini e Otoni, 1996).

As plantas cultivadas *in vitro* desenvolvem em meio de cultura, o qual difere tanto em aspectos físicos como químicos do solo. Ledo *et al.* (2007), em estudos com *Cocos nucifera*, obtiveram germinação de embriões *in vitro* e, após 210 dias, as plantas foram transferidas para substrato contendo areia durante a etapa de aclimatização e, em seguida, transferidas para campo, onde conseguiram atingir idade adulta e a fase reprodutiva. Ângelo *et al.* (2011) trabalhando com *Elaeis guineenses* e *Elaeis oleifera* após germinar *in vitro* embriões zigóticos de ambas as espécies conseguiram melhores resultados na aclimatização de plantas que apresentavam sistema radicular mais desenvolvido. Em seus trabalhos com *E. guineenses*, Pádua (2012) verificou que esta palmeira apresenta melhor taxa de aclimatização, quando apresentam melhor desenvolvimento radicular no momento da transferência do meio de cultura para o substrato. Além de fatores ligados ao vegetal, o sucesso da aclimatização também está relacionado com o recipiente (Santos, 2007; Couto *et al.* 2010), o sombreamento (Sousa e Silva, 1999), o substrato (Silva *et al.*, 2006; Ledo *et al.*, 2007) e comprimento da raiz (Bandeira *et al.*, 2013).

Para aumentar o sucesso na etapa de aclimatização o vegetal deve ser gradualmente exposto em contato com as condições externas. Esse processo é conhecido como pré-aclimatização. Em trabalhos com *Acrocomia aculeata*, Borcioni e Negelle (2012) e Luis (2013) transferiram plantas germinadas em meio de cultura para um recipiente contendo substrato vedado com saco plástico transparente para evitar a dessecação excessiva, porém permitir a passagem de luz. Nesses casos, a retirada do saco plástico foi feita de forma gradual por meio de cortes nas extremidades, em intervalo de uma semana, até retirada completa da cobertura

Até o momento, os trabalhos com *Butia capitata in vitro* não relatam detalhes sobre a etapa de aclimatização, evidenciando assim, a importância do estudo com a espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos descritos nesse estudo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCTII) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na cidade de Brasília, Distrito Federal.

As coletas das amostras de *B. capitata* ocorreram entre os meses de novembro e janeiro, durante as safras de 2013/2014 para os experimentos de conservação de sementes; 2014/2015 para a caracterização morfométrica dos diásporos, além de 2015/2016 para os experimentos de criopreservação de embriões zigóticos. No total foram estudadas três populações, encontradas nos municípios de Arinos (15° 55' 01"S e 46° 06' 20" W) de Mirabela, em uma propriedade particular chamada Fazenda Baixa (16° 16' 2.31"S e 44° 11' 45.14"W), além da de Serranópolis, próxima a comunidade rural de Campos (15° 53' 59"S e 42° 49' 22.88"W).

3.2. Caracterização de diásporos

Para estimar a variabilidade biométrica entre as populações de Arinos, Mirabela e Serranópolis, sessenta frutos frescos com consistência firme e superfície lisa, que caracterizava aspecto saudável e estágio maduro, foram selecionados aleatoriamente.

Inicialmente, realizou-se a limpeza superficial dos frutos com água corrente e, após a secagem, avaliou-se o diâmetro equatorial (mm) e o comprimento longitudinal (mm) de cada um deles (Figura 1). Ressalta-se que, pela irregularidade do formato do fruto, o diâmetro equatorial foi medido em três vezes, seguindo a sua rotação. As medições das demais partes do fruto foram realizadas a partir da dissecação dos mesmos, com auxílio de um bisturi cirúrgico.

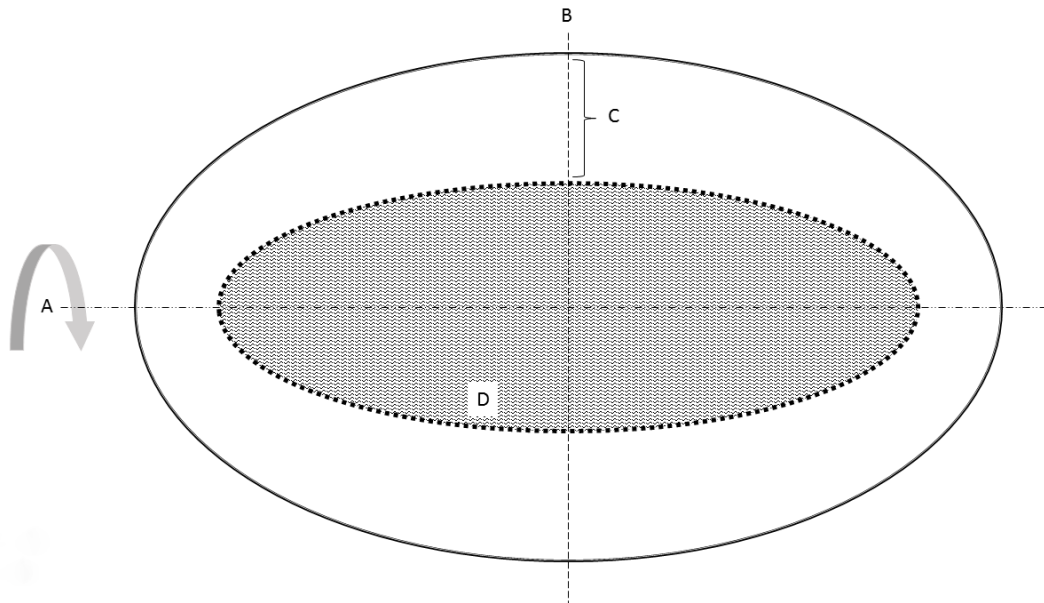


Figura 1. Diagrama esquemático de diásporos de *B. capitata*. A: comprimento longitudinal; B: diâmetro equatorial. A seta indica o eixo na qual foram realizadas as medições com três repetições; C: espessura da polpa; D: pirênio (endocarpo e endosperma).

Parte da polpa foi retirada na porção media equatorial para possibilitar a medição da sua espessura em três regiões distintas. Em seguida, a polpa foi retirada por completo para a aferição da massa e o teor de umidade. A massa fresca do fruto foi calculada a partir da soma da massa da fresca polpa e massa fresca do pirênio.

Com a exposição do pirênio, o mesmo teve sua massa fresca calculada antes de ser quebrado para verificação da espessura do endocarpo e separação do endosperma. Posteriormente, determinou-se o teor de umidade do endocarpo e endosperma separadamente. Com o fruto fresco, o endosperma ainda se encontrava preso ao endocarpo, o que não permitiu a sua retirada sem provocar injúrias e/ou quebra, o que inviabilizou as medições (comprimento longitudinal e comprimento transversal). Para tanto, cada população foi separada em dois lotes, sendo cada lote composto por três repetições de dez frutos.

Para a continuação das medições novos frutos foram despulpados para extração dos pirênios (sementes e endocarpo rígido). Nessa etapa utilizou-se um liquidificador industrial (Bermar BM-31) colocando, aproximadamente, $\frac{1}{4}$ do

volume total do copo do liquidificador com frutos e outro $\frac{1}{4}$ completado com água. A retirada total da polpa ocorreu entre 30 a 45 segundos de beneficiamento. Após esse período, o processado foi colocado em uma peneira de tela em aço de 70 cm de diâmetro para separação dos pirênios. Os pirênios separados foram então secos à sombra e em local ventilado durante 14 dias para facilitar a extração das sementes sem causar injúrias ao endosperma.

Com a separação do endosperma intacto, o comprimento longitudinal e o diâmetro equatorial na porção média foram medidos. O embrião, desta mesma semente, foi excisado para a medição do comprimento longitudinal e diâmetro equatorial (mm).

Com os dados coletados foi possível calcular a proporção de polpa pela razão entre a massa da polpa pela massa do fruto fresco, e a proporção do pirênio, por meio da razão entre a massa do pirênio e a massa do fruto fresco.

As medições de comprimento, largura dos frutos, pirênios e embriões foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital (MITUTOYO Digital Caliper). Para a determinação dos teores de umidade da polpa, semente e embrião foi utilizada uma balança de precisão analítica unibloc (SHIMADZU AUY 200) e estufa com circulação de ar (NOVA ETICA 400 HX420-ID).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado sendo três repetições com dez indivíduos para cada população estudada e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3.3. Material vegetal para os experimentos de conservação

Frutos maduros de *B. capitata*, caracterizados pela coloração amarelada do epicarpo, foram coletados nos municípios de Mirabela, Serranópolis e Arinos localizados na Região Norte do Estado de Minas Gerais. Os frutos foram armazenados em sacos plásticos durante o transporte até o local da realização dos experimentos.

Os procedimentos de despolpa, extração, separação e secagem dos pirênio para a extração das sementes foram feitos conforme descrito no item 3.2.

Para a separação da semente e do endocarpo foi utilizado uma morsa (número 3) a fim de evitar injúrias nas sementes durante a quebra do endocarpo rígido que, possivelmente, comprometeriam o embrião por ocasião da desinfestação.

Para o processo de desinfestação, as sementes foram imersas em álcool 70% por 3 minutos e solução de hipoclorito de sódio a (2 - 2,5% de cloro ativo) por 30 minutos, seguido por três enxágues com água destilada e esterilizada.

As sementes obtidas foram usadas como fonte de explantes para os experimentos de conservação de germoplasma de *B. capitata*.

3.4. Conservação de sementes a médio-longo prazo em diferentes temperaturas

Para a conservação a médio-longo prazo, sementes de *B. capitata* das populações de Arinos, Mirabela e Serranópolis, com teor de umidade de aproximadamente 5% foram utilizadas. A umidade foi calculada pela fórmula: $U\% = [(P_i - P_f) / P_i] * 100$, sendo: P_i = massa inicial da amostra (g), P_f = massa final da amostra (g), U = teor de água em percentagem de base úmida (%).

Uma vez obtidas, as sementes foram acondicionadas em envelopes tipo aluminizados trifoliados (polietileno-alumínio-polietileno) e impermeáveis, os quais foram lacrados com seladora elétrica e armazenadas por períodos de tempo de 0, 90, 180 e 360 dias sob diferentes temperaturas: 25°, 6°, -20° e -196°C (nitrogênio líquido). As sementes foram armazenadas a 25°C foi em sala de crescimento do laboratório de cultura de tecidos. A 6°C em freezer e a 196°C mergulhadas em nitrogênio líquido. As sementes armazenadas a -20°C foram abrigadas no interior da câmara fria do banco de sementes, todos localizados na EMBRAPA Cenargen.

As amostras armazenadas em temperatura de -196 °C foram acondicionadas em “canisters” de alumínio e colocadas em botijões contendo o nitrogênio líquido.

Após cada período de conservação, as amostras foram retiradas das respectivas temperaturas e, para as sementes armazenadas em -20°C e -196°C,

o descongelamento foi feito de forma rápida. Nesse caso, as embalagens com as sementes foram imersas em banho-maria a 40 °C por cerca de 90 segundos.

Posteriormente, as sementes foram desinfestadas conforme descrito no item 3.3, os embriões excisados e inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 gL⁻¹ de sacarose e 2,5 gL⁻¹ de Phytigel (Sigma). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. A incubação dos embriões ocorreu no escuro por 21 dias e, posteriormente, sob luminosidade de 52 μmm⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

As avaliações foram realizadas mensalmente, por meio da verificação da taxa de germinação com base na formação de radícula. Para este estudo, a germinação foi compreendida como processo biológico que resulta na retomada do crescimento e que culmina na protusão da radícula (Ferreira e Borguetti, 2004). A formação da radícula e parte aérea foi compreendida como desenvolvimento.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 4 x 4 (períodos de armazenamento x temperaturas de conservação), totalizando 16 tratamentos. Cada tratamento foi composto por três repetições de 10 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno (x/100)^{0,5}.

3.5. Criopreservação de embriões zigóticos

Para o experimento de criopreservação, embriões zigóticos foram excisados das sementes de *B. capitata* desinfestadas (item 3.3) com auxílio de pinças, bisturis e alicates odontológicos das três populações estudadas: Arinos, Mirabela e Serranópolis.

Inicialmente, os embriões zigóticos foram hidratados em meio ágar-água e mantidos em condição de escuro e temperatura de 25±2 °C por 16 horas, a fim de uniformizar a umidade dos mesmos. Nessa etapa, a massa fresca (g) dos embriões foi medida antes e após a hidratação.

Em seguida, os embriões zigóticos ficaram expostos ao fluxo de ar fornecido por capela de fluxo laminar para a dessecação por períodos de: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Após cada tempo de dessecação, 30 embriões foram inoculados diretamente em meio de germinação, caracterizando o tratamento controle e 30, foram colocados em criotubos (2 mL) estéreis e imersos diretamente em nitrogênio líquido (NL) por 48 horas. Outros 30 embriões foram levados a estufa a 104°C para medição da umidade calculada pela fórmula: $U\% = [(P_i - P_f) / P_i] * 100$, sendo: P_i = massa inicial da amostra (g), P_f = massa final da amostra (g), U = teor de água em percentagem de base úmida (%).

Para o descongelamento, os criotubos foram retirados do NL e rapidamente mergulhados em banho-maria a 40°C por 90 segundos. Em seguida, os embriões foram retirados dos criotubos e inoculados assepticamente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de germinação.

O meio de germinação foi composto de sais e vitaminas do meio de MS, acrescido com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. A incubação dos embriões ocorreu no escuro por 21 dias e, posteriormente, sob luminosidade de 52 μmm⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Após 60 dias de cultivo foi avaliado a germinação dos embriões zigóticos. Para este estudo, a germinação foi compreendida como processo biológico que resulta na retomada do crescimento e que culmina na protusão da radícula (Ferreira e Borguetti, 2004). A formação da radícula e parte aérea foi compreendida como desenvolvimento.

O experimento foi montado em esquema fatorial 7 x 2 (períodos de dessecação x criopreservação) totalizando 14 tratamentos, sendo cada tratamento formado por 3 repetições de 10 embriões zigóticos, para cada população. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno (x/100)².

3.6. Aclimatização

Após os períodos de conservação, as plantas obtidas foram aclimatizadas em casa-de-vegetação. Nessa etapa, somente as plantas que apresentavam comprimento de raiz e parte aérea superior a 2,0 cm foram utilizadas. Neste estágio, as plantas estavam com aproximadamente 200 dias após a germinação.

Para evitar a perda de plantas, realizou-se um procedimento de pré-aclimatização das plantas anteriormente à passagem destas para condições de casa-de-vegetação. As plantas foram retiradas do meio de cultura e lavadas em água corrente para retirada do excesso de meio. Após a limpeza, cada planta foi transplantada para copos plásticos transparentes de 200 mL de capacidade contendo substrato formado por areia e Bioplant[®] na proporção de 1:1 (v/v). Cada recipiente foi devidamente acomodado com outro acima, os quais foram fixados com fita crepe nas bordas e incubados em câmara de germinação (Percival) com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. As plantas foram irrigadas manualmente todos os dias durante 30 dias.

Na primeira fase, que correspondeu as duas semanas iniciais, as plantas ficaram totalmente isoladas por outro copo plástico. Na segunda fase, ou seja, nas duas semanas finais, o copo da parte superior foi retirado permitindo o contato da planta com o ambiente, embora as plantas tenham continuado no interior da câmara de germinação. Após esse período as plantas foram conduzidas para casa de vegetação para melhor desenvolvimento.

Em casa-de-vegetação, as mudas foram transferidas para sacos plásticos contendo substrato constituído de solo vermelho, areia lavada e esterco bovino (3:1:1 v/v), em sacos plásticos pretos com 17 cm x 11 cm. Nestas condições, as plantas foram irrigadas diariamente, evitando-se jatos diretos na muda para não provocar nenhum tipo de dano físico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização de diásporos

De maneira geral verificaram-se resultados bastante homogêneos com relação ao estado de desenvolvimento dos diásporos, uma vez que em todas populações, os frutos selecionados para as análises apresentavam coloração amarelada, consistência firme e com superfície lisa, característica do estágio maduro.

Os frutos do coquinho azedo são do tipo drupa com formato ovalado (Figura 2A) e muitos apresentavam o diâmetro equatorial irregular, provavelmente devido a vários frutos desenvolverem próximos em um mesmo cacho. O epicarpo e o mesocarpo apresentam consistência carnosa e fibrosa, compondo a polpa que é a parte mais explorada comercialmente (Faria *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2010). O endocarpo rígido apresenta uma cor marrom e três cicatrizes longitudinais, com um opérculo entre cada cicatriz (Figura 2B). A semente possui superfície marrom e repleta de reentrâncias e com um apêndice voltado para um dos opérculos (Figura 2C). Ainda em relação a semente, a mesma possui simetria bilateral e, na superfície, uma cicatriz longitudinal na porção do opérculo (Figura 2D). O endosperma é branco com uma cavidade no centro formando um eixo por onde o haustório se desenvolve (Oliveira *et al.*, 2013). Em uma das extremidades da porção polar posicionada próxima ao opérculo está acomodado o embrião zigótico (Figura 2E).

Frutos coletados para os experimentos de morfometria, foram dissecados para a medição da umidade da polpa, semente e embrião. Os frutos provenientes de Serranópolis alcançaram média 86,6% para o teor de umidade da polpa sendo significativo em relação as outras populações. Não houve diferença estatística entre as populações quanto aos teores de umidade para sementes. Para os teores de umidade do embrião as populações de Arinos e Serranópolis diferem estatisticamente de Mirabela sendo o maior valor observado para Arinos (Tabela 1).

Nas avaliações biométricas realizadas em frutos e sementes das populações de *B. capitata* verificou-se, de modo geral, uma superioridade dos números para a população de Arinos (Tabela 2).

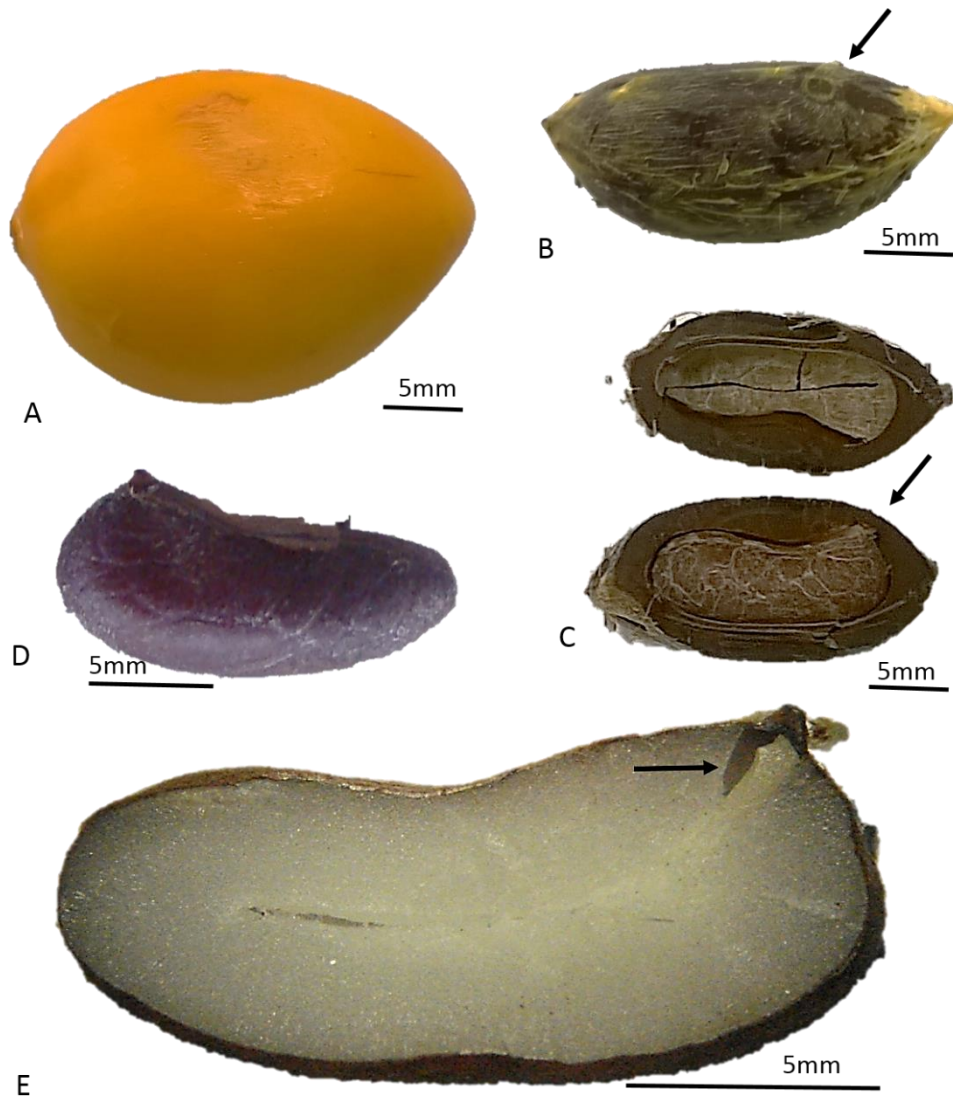


Figura 2. Aspecto geral do diásporo de *Butia capitata*. A: Fruto; B: Pirênio (endocarpo e semente) destaque ao opérculo; C: corte longitudinal do endocarpo, destaque para a posição do embrião; D: semente; E: corte longitudinal de uma semente, destaque para o embrião.

É observado diferença estatística para as variáveis como comprimento do fruto, largura do fruto, massa fresca do fruto, massa fresca e seca da polpa, comprimento, largura e massa fresca do pirênio, massa e comprimento da semente. Todas essas variáveis apresentaram maiores médias para a população de Arinos (Tabela 2).

Tabela 1. Teores de umidade observados na polpa, na semente e no embrião zigótico de frutos de *Butia capitata* coletados em populações localizadas no norte de Minas Gerais, na safra 2014/2015

Populações	Teores de umidade		
	Polpa	Semente	Embrião
Arinos	79,0±2,0 c	6,2±9,0 a	18,4±8,0 a
Mirabela	82,4 ±1,0 b	5,3±2,0 a	7,5±8,0 b
Serranópolis	86,2 ±2,0 a	6,7±8,0 a	14,4±8,0 a
CV(%)	2,46	18,9	30,39

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Para as variáveis espessura do endocarpo, e largura do embrião, houve diferença estatística onde a população de Serranópolis apresentou as melhores médias.

Arinos e Mirabela apresentaram percentagens menores, de 12 e 17,8%, em relação a espessura do endocarpo, 10 e 5%, em relação ao comprimento do embrião e 11 e 12,5%, respectivamente, em relação a largura do embrião, quando comparadas com a população de Serranópolis.

As únicas variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre as populações foram a espessura da popa e a largura da semente.

Estudos realizados por Moura *et al.* (2010) concluíram que, quando maior os frutos, melhor a produção de polpa. Os dados obtidos pela população de Arinos estão de acordo com esse trabalho já que apresentou as melhores médias para as características maior comprimento longitudinal com 34,29 mm, maior massa fresca do fruto 8,22 g, maior massa fresca da polpa 6,21 g.

Tabela 2. Dados morfométricos referentes aos frutos, sementes e embriões de *Butia capitata* das populações de Arinos, Mirabela e Serranópolis

Variáveis analisadas	Populações			CV%	F
	Arinos	Mirabela	Serranópolis		
Comprimento do fruto (mm)	34,3±0,2 A	26,3±0,1 C	28,4±0,2 B	4,7	269,1**
Largura do fruto (mm)	22,7±0,2 A	21,6±0,2 B	21,6±0,2 B	6,1	6,9 **
Massa fresca do fruto (g)	8,2±1,6 A	6,5±0±0,1 B	6,6±1,6 B	14,9	24,78**
Espessura da polpa (mm)	4,8±0,07 A	4,7±0,1 A	4,8±0,1 A	12,2	0,3 ^{ns}
Massa fresca da polpa (g)	6,2±0,1 A	5,1±0,1 B	4,9±0,1 B	15,3	20,2**
Massa seca da polpa (g)	1,3±0,03 A	0,8±0,02 B	0,6±0,03 C	18,9	91,7**
Comprimento do pirênio (mm)	26,4±0,2 A	21,7±0,2 C	23,0±0,2 B	5,5	100,5**
Largura do pirênio (mm)	11,4±0,2 A	10,8±0,1 B	11,3±0,1 AB	7,8	4,5*
Massa fresca do pirênio (g)	2,0±0,5 A	1,3±0,2 C	1,6±0,4 B	21,5	24,5**
Espessura do endocarpo (mm)	2,1± 0,07 B	1,9±0,06 B	2,4±0,05 A	15,6	11,8**
Massa da semente (g)	0,3±0,1 A	0,3±0,1 B	0,3±0,1 B	21,9	11,5
Comprimento das sementes (mm)	16,0±0,2 A	12,4±0,1 C	13,8±0,05 B	7,7	83,2
Largura da semente (mm)	6,2±0,1 A	6,3±0,1 A	5,9±0,1 A	10,2	2,9
Comprimento do embrião (mm)	3,1±0,07 B	3,3±0,1 AB	3.5±0,7 A	13,6	4,5*
Largura do embrião (mm)	0,9±0,02 B	0,8±0,03 B	0,9±0,03 A	15,3	6,5**

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O comprimento do fruto ou comprimento longitudinal diferiu estatisticamente para as três populações, sendo a de Arinos a que apresentou maior valor, com 34,29 mm, em relação a Mirabela que foi de 26,25 mm e Serranópolis com 28,37 mm. A diferença entre a maior e a menor média é de 8,04 mm, o que representa 23,45%. Esses valores estão próximos aos observados por Silva e Scariot (2013) que, durante 2006 e 2007, verificaram para o comprimento longitudinal de frutos médias de 25,2 mm para Mirabela, 25,4 mm para Serranópolis e por Moura *et al.* (2010) foi observado média de 26,87 mm.

Pedron *et al.* (2004) ao analisarem a massa fresca de frutos de populações de *B. odorata* em Santa Maria, RS, verificaram uma variação de 5,6 a 26,4 g entre eles.

A largura do fruto ou diâmetro equatorial foi superior para Arinos, com média 22,74 mm, diferindo estatisticamente das demais populações. Moura *et al.* (2010) verificaram diâmetro equatorial de 21,1 mm em populações do município de Montes Claros e Silva e Scariot (2013) descreveram valores de 22,4 mm e 23,1 mm para populações de Mirabela e Serranópolis.

A massa fresca do fruto, a massa fresca da polpa e a massa fresca do pirênio também foram maiores para a população de Arinos, com valores de 8,22 mm, 6,21 mm e 2,01 mm, respectivamente. Contudo, observou-se que as demais populações apresentaram médias semelhantes àquelas descritas por Silva e Scariot (2013), sendo para a massa fresca da polpa 5,83 mm e 6,35 mm; para massa fresca dos frutos de 6,94 g e 7,6 g; para a massa fresca da polpa de 5,83 g e 6,35 g, respectivamente para Mirabela e Serranópolis. Moura *et al.* (2010) descreveu para a massa fresca do fruto média de 8,02 g e para a massa fresca da polpa média de 6,4 g. Rivas e Barilani (2004) encontraram uma variação menor ao analisarem massa fresca de frutos de *Butia odorata* em populações no Uruguai com médias variando de 5,7 a 8,1 g.

A massa fresca do pirênio apresentou diferenças significativas entre as populações estudadas, sendo Arinos a maior entre as populações, com 2,01 g, seguido de Serranópolis com 1,67 g e Mirabela com 1,36 g. Moura *et al.* (2010) verificaram para a massa fresca do pirênio média de 1,62 g e Silva e Scariot (2013) verificaram 1,1 g e 1,25 g para Mirabela e Serranópolis, respectivamente.

Barbosa *et al.* (2010) verificaram em *M. flexuosa* (buriti) variações biométricas consideráveis em uma população ao observar tamanho, forma e cor dos frutos. Silva e Scariot (2013) concluem que parâmetros biométricos diferem entre populações de *Butia capitata* no Cerrado e que frutos podem ser usados como critério para a escolha de sementes quando se tem objetivo de produção de mudas. Reis *et al.* (2010) verificaram que em *Copernicia prunifera* (carnaúba) sementes de tamanho médio e grande apresentam maior velocidade na protusão do pecíolo cotiledonar. Análises biométricas de frutos de *Butia* foram utilizadas

por Rivas e Barilani (2004) para estimar a capacidade reprodutiva e produtiva de palmeiras no Uruguai

A exploração da polpa é um critério agrônômico com capacidade de melhoramento. Nunes *et al.* (2010) compararam vários genótipos de *Butia* provenientes de uma população de Santa Vitória dos Palmares-RS, separando alguns indivíduos a fim de explorar o aproveitamento de polpa para consumo *in natura*. A produtividade da polpa pode ser utilizada na seleção agrônômica dos melhores indivíduos de *B. capitata* para a extração de frutos (Silva e Scariot, 2013). Neste estudo, pôde-se verificar que os frutos da população de Arinos apresentam as melhores características para o uso da polpa pela indústria, como exemplo, comprimento e massa fresca do fruto (Tabela 2).

4.2. Conservação de sementes a médio-longo prazo em diferentes temperaturas

Em meio de cultura para germinação, a primeira alteração morfológica observada no embrião zigótico excisado das sementes de *B. capitata* foi o intumescimento, caracterizado pelo aumento do seu tamanho. A segunda alteração morfológica foi o alongamento do haustório, acompanhado de uma curvatura (Figura 3 A). Após estas duas etapas, ocorreu a protusão da radícula seguida da emissão da bainha foliar (Figura 3 B). Aos sessenta dias de cultivo, as plântulas aclorofiladas (Figura 3 C) foram transferidas para sala de crescimento e expostas a radiação luminosa, quando passaram a produzir pigmentos fotossintetizantes (Figura D). Após 200 dias da inoculação, verificou-se o desenvolvimento de plântulas completas e a formação dos eófilos (Figura 3 E).

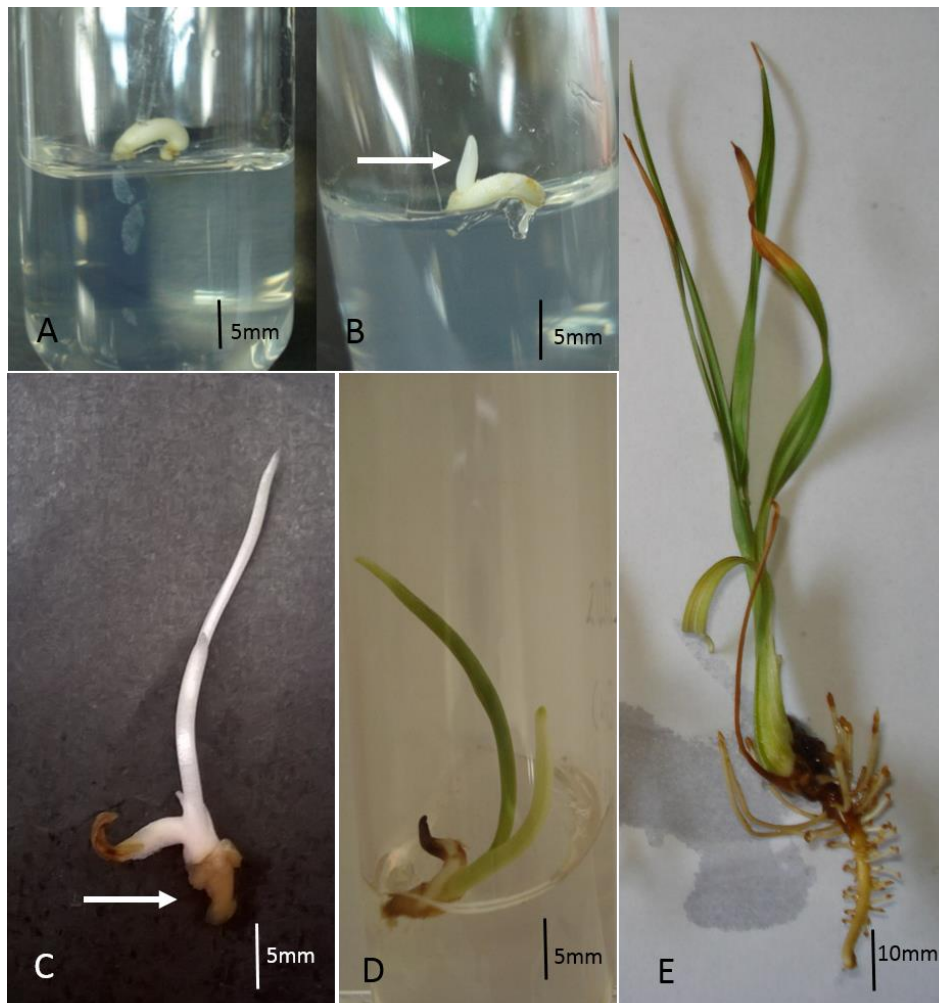


Figura 3. Etapas da germinação *in vitro* de *Butia capitata*. A: embrião curvado 10 dias, após a inoculação; B: protusão da radícula seguida da emissão da bainha foliar; C: plântula com 60 dias, após a inoculação com parte aérea desenvolvida (seta: destaque da radícula); D: parte aérea pigmentada, após exposição a luz; E: plântula completa aos 200 dias, após a inoculação. As etapas de A a C ocorreram na ausência de luz e etapas de D a E ocorreram na presença de luz.

Para a conservação de sementes de *Butia capitata* verificou-se que, de maneira geral, para cada tempo, as médias foram significativas entre as diferentes temperaturas de conservação. Na Tabela 3 podem ser observados os resultados obtidos para a protusão de radícula e formação da bainha foliar após 0 (controle), 90, 180 e 360 dias de conservação das sementes em temperaturas de 25°, 6°, -20° e nitrogênio líquido (-196 °C).

As sementes de Arinos apresentaram índice de germinação de 73% no tratamento controle (0 dias). Nas temperaturas de 25° e 6°C a percentagem de protusão da radícula sofreu uma diminuição ao longo dos tempos de armazenamento, diferindo já no tempo de 90 dias. Na temperatura de -20°C as médias de germinação não foram observadas diferenças ao longo dos tempos, mesmo diminuindo de 73 para 40% após 360 dias de armazenamento. Em temperatura de -196°C as médias diferiram estatisticamente após 360 dias de armazenamento. As melhores médias para o desenvolvimento de plantas completas foram nas temperaturas de -20 e -196°C. As duas temperaturas diferiram estatisticamente somente na passagem do tempo de 0 para 90 dias e se mantiveram nos tempos posteriores.

As sementes da população de Mirabela apresentaram média inicial de germinação de 73%. A percentagem de protusão da radícula não diferiu estatisticamente ao longo dos tempos de armazenamento em temperaturas subzero. Em temperaturas de 25° e 6°C as médias diminuíram ao longo do tempo de armazenamento, diferindo estatisticamente já em 180 dias. As temperaturas de -20° e -196°C se mostraram melhores ao longo de 360 dias, com índice de protusão da radícula superior ao controle com 77 e 83%, respectivamente. Quando observado o desenvolvimento das plantas, os resultados diferiram apenas em temperatura de 25°C apresentando menor percentagem de desenvolvimento de plantas a partir de 90 dias de armazenamento das sementes. A melhor média foi obtida em temperatura de -196°C com 76,6% de plantas completas.

Pode ser observado visualmente que Serranópolis apresentou os menores valores para as médias de germinação das sementes entre as três populações. Antes mesmo do armazenamento, a média de germinação foi de apenas 23%. Em temperatura de 25°C a taxa de protusão de radícula foi decrescente ao longo do tempo chegando a 0%.

Tabela 3. Formação de radícula, parte aérea e desenvolvimento de planta completa a partir de embriões excisados de sementes submetidas a diferentes temperaturas e tempos de armazenamento, em três populações de *B. capitata*

População	Tempo	Temperatura (°C)			
		25	6	-20	-196
Arinos	Radícula (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	50,0±9,0 aA
	90	40,0±9,0 bA	53,0±4,0 abA	60,0±6,0 aA	47,0±9,0 abA
	180	23,0±6,0 bB	30,0±8,0 bB	63,0±8,0 aA	63,0±8,0 abA
	360	23,0 bA	40,0±9,0 bA	53,0±9,0 aA	37,0±8,0 bA
	Parte aérea (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA
	90	47,0±9,0 abA	43,3±9,0 abA	40,0±9,0 bA	33,0±8,0 bA
	180	20,0±6,0 bcB	23,3±6,0 bB	60,0±9,0 abA	40,0±9,0 bAB
	360	0,0 cB	30,0±8,0 bAB	40,0±9,0 bA	43,0±9,0 abA
	Planta completa (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA
90	23,0±0,6 bA	33,0±8,0 bA	37,0±9,0 bA	33,0±8,0 bA	
180	20,0±0,6bB	23,3±0,6 bB	60,0±9,0 abA	40,0±9,0 bAB	
360	0,0 bB	30,0±7,0 bA	40,0±9,0 bA	30,0±7,0 bA	
Mirabela	Radícula (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 abA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA
	90	50,0±9,0 abB	87,0±4,0 aA	87,0±4,0 aA	83,0±5,0 aA
	180	27,0±7,0 bcB	57,0±9,0 bA	80,0±5,0 aA	60,0±8,0 aA
	360	16,0±5,0 cB	67,0±8,0 abA	77,0±6,0 aA	83,0±5,0 aA
	Parte aérea (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 abA
	90	47,0±9,0 aA	53,0±9,0 aA	53,0±9,0 aA	73,0±7,0 abA
	180	10,0±3,0 bB	53,0±9,0 aA	73,0±7,0 aA	47,0±9,0 bA
	360	7,0±2,0 bB	70,0±7,0 aA	63,0±8,0 aA	83,0±5,0 aA
	Planta completa (%)				
	0	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA	73,0±7,0 aA
90	40,0±8,0 bA	53,0±9,0 aA	53,0±9,0 aA	66,0±8,0 aA	
180	10,0±3,0 bcB	53,0±9,0 aA	73,0±7,0 aA	47,0±9,0 aA	
360	7,0±2,0 cB	67,0±8,0 aA	63,0±8,0 aA	76,6±6,0 aA	
Serranópolis	Radícula (%)				
	0	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA
	90	23,0±6,0 aAB	6,0±2,0 aB	10,0±3,0 aB	37,0±8,0 aA
	180	3,0±1,0 aB	27,0±7,0 aAB	30,0±7,0 aA	23,0±6,0 aAB
	360	0,0 aB	20,0±6,0 aAB	27,0±7,0 aA	20,0±6,0 aAB
	Parte aérea (%)				
	0	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA
	90	17,0±5,0 aA	7,0±2,0 aA	7,0±2,0 aA	23,0±6,0 aA
	180	3,3±1,0 aB	16,0±5,0 aAB	30,0±7,0 aA	23,0±6,0 aAB
	360	0,0 aB	20,0±6,0 aAB	27,0±7,0 aA	17,0±5,0 aAB
	Planta completa (%)				
	0	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA	23,0±6,0 aA
90	17,0±5,0 aA	6,0±2,0 aA	6,0±2,0 aA	23,0±6,0 aA	
180	3,0±1,0 aA	23,0±6,0 aAB	30,0±7,0 aA	23,0±6,0 aAB	
360	0,0 aB	20,0±6,0 aAB	27,0±7,0 aA	17,0±5,0 aAB	

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e as médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em baixas temperaturas, a taxa de protusão da radícula foi superior ao controle em -20°C nos tempos de armazenamento de 180 e 360 dias com 30 e 27%, respectivamente, e em -196°C aos 90 dias com 37% de protusão, porém retornando a valores próximo ao inicial. Pode ser observado na formação de plantas completas que as médias não diferem para todos os tempos durante os 360 dias de armazenamento. A em temperatura de -20°C, onde iniciou-se com 23% e finalizou com 27% de plantas completas. A formação de plantas completas na temperatura de 25°C diminuiu ao longo dos tempos de armazenamento, chegando a 0%.

A conservação de sementes não foi viável para nenhuma das populações à temperatura de 25°C. A germinação para Arinos e Mirabela diminuiu ao longo do experimento e tornou-se significativa já no tempo de 180 dias. Serranópolis permaneceu com médias não significativas estatisticamente em todos os tempos, embora tenham diminuído ao longo do experimento e em 360 dias chegou a 0% (morte total dos explantes).

Esses dados corroboram com Lima *et al.* (2009) que observaram que a espécie *B. capitata* é incapaz de manter bancos de sementes por longos períodos em ambientes naturais devido à baixa taxa de germinação atribuído à perda de viabilidade. Essa dificuldade de regenerar e a sazonalidade na produção podem tornar estas espécies vulneráveis a ações antrópicas e, conseqüentemente, suscetível ao processo de extinção (Sarmiento e Villela, 2010). Diferente ao que ocorre com *B. capitata*, Ribeiro *et al.* (2012) verificou que a espécie *A. aculeata* (macaúba) não perdeu a capacidade germinativa das sementes ao serem armazenadas durante 90 dias em temperaturas diferentes de 10, -20 e -196°C. Os autores ainda concluem que é possível formar bancos dessas para a espécie *A. aculeata* devido a capacidade de sementes manterem o vigor por até três anos.

De modo geral, na comparação entre as diferentes temperaturas de armazenamento de sementes, a de -20°C e -196°C foram as que apresentaram melhores resultados de germinação para conservação a médio-longo prazo de *Butia capitata*. Dessa forma, a espécie demonstra ser tolerante quando armazenada em temperaturas negativas com teor de umidade próximo a 5%.

Dias *et al.* (2015) armazenou sementes de *B. capitata* da população de Mirabela a 5% de umidade durante 90 dias em temperaturas diferentes de -196°, -18°, 10 e 25°C e verificou que a melhor temperatura para armazenamento de sementes foi de -196°C. No presente estudo, as médias das populações mantiveram significativas altas ao longo dos tempos estudados nas temperaturas de -196°, -20° e 6°C.

A taxa de germinação no período de tempo de armazenamento de 0 dias foi de 73% para Arinos e Mirabela e 23% para Serranópolis. Pivetta *et al.* (2005), ao compararem a germinação de três espécies de *Arecaceae*, concluíram que a maturidade fisiológica após a colheita dos frutos influencia consideravelmente a taxa de germinação das sementes. Teixeira *et al.* (2011) verificaram que para a palmeira *Archontophoenix alexandrae* a germinação sofre influência de tratamentos realizados antes do armazenamento. A fermentação dos frutos por três dias e o despoldamento após a coleta, influenciaram negativamente na germinação de sementes armazenadas por 120 dias. Penariol (2007) trabalhando com *Roystonea regia* e Luz *et al.* (2014) com *Sabal mauritiiformis*, descrevem a influência do estágio de maturação na germinação de sementes de *Arecaceae* após armazenadas. Assim, é possível que o comportamento observado entre as altas taxas de germinação de Arinos e Mirabela para com Serranópolis pode ser devido a sazonalidade e o período de coleta dos frutos, não podendo excluir também possíveis efeitos do manejo dos frutos, desde o momento da coleta até o processamento.

4.3. Criopreservação de embriões zigóticos

A curva do teor de umidade dos embriões zigóticos em função do tempo de dessecação pode ser visualizada na Figura 4. Após o período de hidratação, o teor de umidade inicial dos embriões zigóticos nas três populações foi de 69,6% para Arinos, 72,9% para Mirabela e 77,8% para Serranópolis. Nas duas primeiras horas de dessecação, em câmara de fluxo laminar, a umidade caiu expressivamente em todas as populações estudadas, embora tenha sido gradual e estabilizado com o passar do tempo.

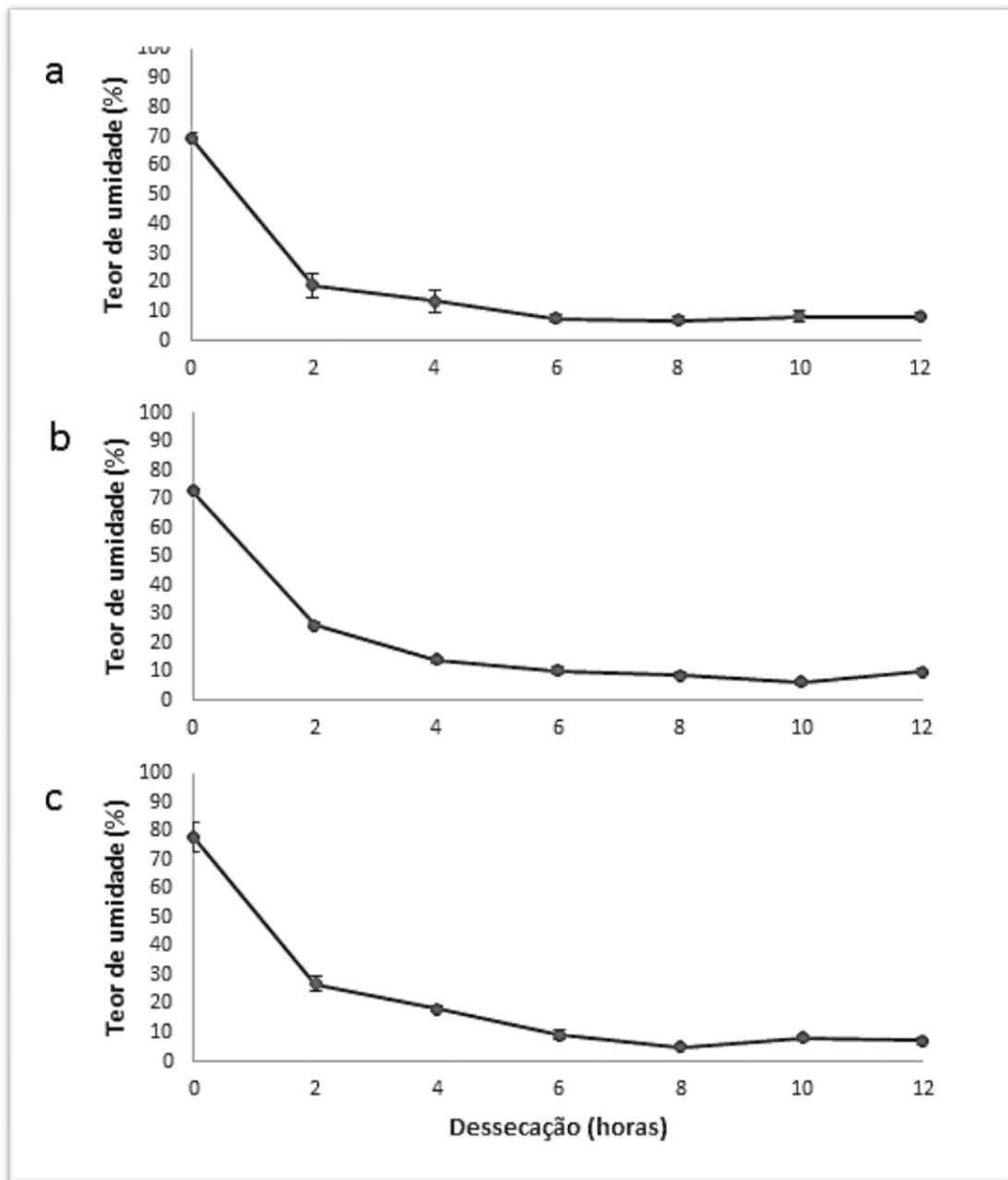


Figura 4. Teor de umidade de embriões zigóticos de populações de *Butia capitata* (a: Arinos, b: Mirabela e c: Serranópolis) em função do tempo de dessecação. Equações da regressão: Arinos $y = 0,8817x^2 - 14,369x + 59,44$; $R^2 = 85,75\%$; Mirabela $y = 0,9049x^2 - 15,029x + 64,335$; $R^2 = 90,65\%$; Serranópolis $y = 0,9452x^2 - 16,035x + 68,878$; $R^2 = 91,26\%$.

Os embriões excisados da população de Arinos após duas horas de exposição ao fluxo apresentaram teor de umidade de 18,9%, 13,6% após 4

horas, 7,7% após 6 horas, mostrando estabilização após 8 horas de dessecação, quando apresentou 6,9% de umidade.

Para os embriões excisados de Mirabela, após duas horas de exposição ao fluxo, a umidade diminuiu para 25,9%. Após 4 horas de exposição ao fluxo a umidade reduziu para 14,2%, 10,4% após 6 horas e atingindo a estabilidade em 8 horas de dessecação com 8,5% de umidade.

Para os embriões excisados da população de Serranópolis, após duas horas de exposição ao fluxo, o teor de umidade diminuiu para 26%. Após 4 e 6 horas, para 18% e 9%, respectivamente, com valores estabilizados após 8 horas, com teor de umidade de 5,1%.

Pode ser observado neste experimento (Figura 5) que, de modo geral, embriões das populações de Arinos, Mirabela e Serranópolis, que não foram submetidos ao nitrogênio líquido (tratamento controle) apresentaram médias de germinação que não diferiram ao longo dos períodos de dessecação. A menor valor obtido foi de 56,6% de germinação para as populações de Arinos e Mirabela, após 2 horas de dessecação, e 86% de germinação para Serranópolis, após 8 horas de dessecação.

A taxa de germinação inicial observada para o tratamento controle foi de 76% para a população Arinos, 76% para Mirabela e 86% para Serranópolis, ou seja, quando os embriões não foram mergulhados em nitrogênio líquido. Contudo, para os embriões criopreservados no tempo 0 horas (sem dessecação em fluxo de ar), por causa da alta umidade, não houve germinação dos mesmos, o que diferenciou estatisticamente os tratamentos (-NL e +NL).

Os embriões da população de Arinos, após 2 horas de dessecação e mergulhados em nitrogênio líquido, apresentaram 23% de germinação, diferindo estatisticamente dos embriões que não foram submetidos ao nitrogênio durante o mesmo período (média de aproximadamente 57%). Pôde-se observar que a partir de 4 horas de dessecação, as médias de germinação relativas aos embriões criopreservados não diferiram entre si, mantendo uma taxa superior a 76% (Figura 5).

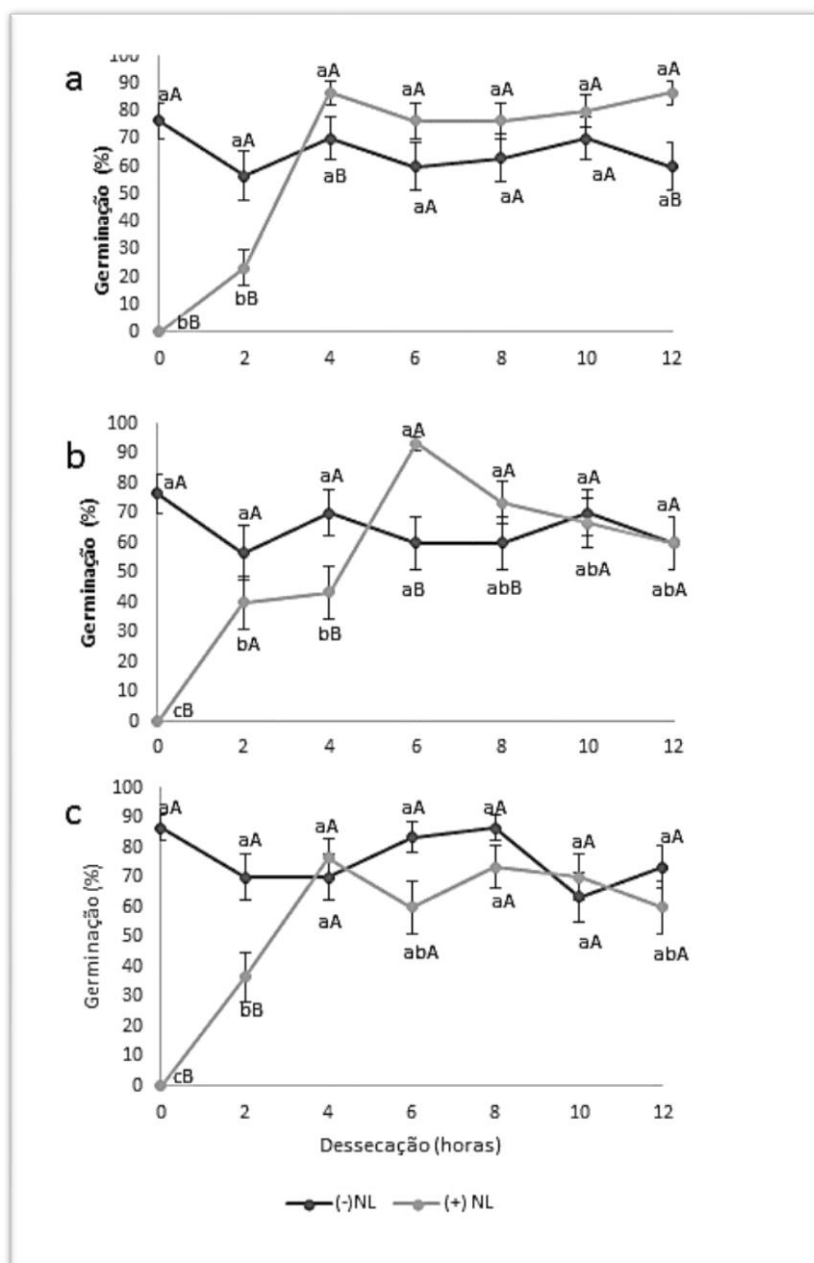


Figura 5. Germinação de embriões zigóticos de populações de *Butia capitata* (a: Arinos, b: Mirabela e c: Serranópolis) em função do tempo de dessecação: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si para os embriões mergulhados em nitrogênio líquido (+NL) ou não mergulhados (-NL) e as médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao longo do tempo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Equações da regressão: Arinos $y_{(-)NL} = -0,5357x + 68,4524$ $R^2 = 10,44\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -10,08x^2 + 19,46x + 0,8730$ $R^2 = 86,02\%^{**}$; Mirabela $y_{(-)NL} = -0,5952x + 68,3333$ $R^2 = 12,02\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -1,2259x^2 + 19,82x + 0,3968$ $R^2 = 86,28\%^{**}$; Serranópolis $y_{(-)NL} = -0,7436x + 80,11$ $R^2 = 9,22\%$ N.S. e $y_{(+)NL} = -1,1607x^2 + 18,27x + 4,528$ $R^2 = 88,57\%^{**}$; sendo N.S.= não significativo e ** = altamente significativo.

Estes valores são semelhantes aos observados pelos embriões não mergulhados em nitrogênio, exceto para o período de 12 horas, onde a germinação dos embriões expostos a temperatura ultrabaixa se sobressaiu em relação ao controle (-NL) (Figura 5).

Embriões excisados da população de Mirabela e mergulhados em nitrogênio líquido, entre os períodos de 2 e 4 horas, apresentaram as menores médias para a germinação, com média de 40 e 43%, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. A maior média para germinação foi alcançada no período de 6 horas, onde os embriões, com aproximadamente 10% de umidade, atingiram 93% de emissão de radícula (germinação) e diferiram estatisticamente dos embriões não mergulhados em nitrogênio líquido. Nos períodos de dessecação superiores a 6 horas, as médias de germinação se mantiveram estáveis em relação aos embriões criopreservados ou não (Figura 5).

Para Serranópolis, os embriões excisados e mergulhados em nitrogênio líquido apresentaram média de 36% de germinação após 2 horas de dessecação, sendo significativamente inferior aos demais tempos. Após 4 horas, verificou-se um aumento para 76% na taxa de germinação, valor que se manteve nos períodos seguintes. A diferença estatística entre os embriões mergulhados e não mergulhados ocorreu somente nos períodos de 2 e 6 horas de dessecação. A taxa de germinação foi 70% e 36,6% em 2 horas e 83,3% e 60% em 6 horas de exposição ao fluxo laminar, respectivamente, para embriões não mergulhados e mergulhados em nitrogênio líquido (Figura 5).

Nos experimentos de criopreservação de *Butia capitata*, as melhores taxas de germinação foram obtidas a partir de 4 horas de dessecação dos embriões zigóticos, onde o teor de umidade foi inferior a 18% nas três populações. Esse resultado indica que a espécie tolera a dessecação a baixos níveis ($\pm 5\%$) e o armazenamento em temperaturas ultra-baixas, estas que são característica de plantas produtoras de sementes com comportamento ortodoxo (Bonner, 2008).

Outras palmeiras também apresentaram tolerância a dessecação e armazenamento em nitrogênio líquido. N'Nan *et al.* (2012) concluíram que a

criopreservação de embriões de *Cocos nucifera*, após dessecação em sílica-gel, é viável, além de possibilitar o controle fitossanitário para o estabelecimento de coleções de germoplasma. Ainda para esta espécie, Sisunandar (2014) observaram que a maturidade do embrião tem relação com a taxa de germinação e formação de plantas completas para os embriões que foram ao nitrogênio líquido. A exposição ao nitrogênio líquido de sementes de *Elaeis guineenses* com tegumento mostrou-se eficaz, sugerindo não ser necessário o resgate dos embriões zigóticos e nem o uso de crioprotetores (Camilo *et al.* 2009).

De acordo com Dickie *et al.* (1992), o comportamento que as sementes de palmeiras possuem ao armazenamento em temperaturas ultra-baixa, associado ao teor umidade podem estar relacionadas a fatores físicos locais onde a espécie se desenvolve. Estes autores sugerem que espécies ortodoxas normalmente são pertencentes a habitats secos, onde naturalmente suas sementes ficam expostas a baixa umidade e que as espécies recalcitrantes e intermediárias são encontradas em ambientes onde não há variações significativas na umidade. O comportamento observado da espécie *B. capitata* corrobora com o descrito por esses autores, já que encontram-se em uma área de Cerrado que apresenta uma longa estação seca (Faleiro e Neto, 2008).

O desenvolvimento de plantas inteiras está associado a emissão inicial da bainha foliar e, posteriormente, a formação do eófilo. Na Tabela 4 pode ser observado que as percentagens de formação de parte aérea são próximas daquelas que indicam a formação de plantas completas para todas populações estudadas. As taxas de germinação foram maiores que as percentagens de desenvolvimento da parte aérea e plantas inteiras, em todos os tempos e para todas as populações, sugerindo que para desenvolver plantas completas é necessário a formação de eófilos. Martins-Corder e Saldanha (2006) observaram que para a espécie *Euterpe edulis* o sucesso na sobrevivência de mudas está relacionado com o melhor desenvolvimento da parte aérea e do diâmetro do colo.

Esses resultados demonstram que a técnica de criopreservação é viável para a manutenção *ex situ* de germoplasma de diversas espécies, como é o caso das palmeiras. No presente estudo foi possível definir a faixa de umidade ideal para exposição dos embriões zigóticos ao nitrogênio líquido que promovesse

altas taxas de germinação, sugerindo ter-se obtido um protocolo a ser aplicado para a conservação da espécie.

Tabela 4. Formação de parte aérea e da planta completa a partir de embriões zigóticos, oriundos de três populações de *B. capitata*, submetidos a diferentes tempos de dessecação, mantidos (+NL) ou não mantidos (-NL) em nitrogênio líquido.

População	Tempo de dessecação (h)	Formação de parte aérea (%)		Planta completa (%)	
		(-) NL	(+) NL	(-) NL	(+) NL
Arinos	0	46,6±9,0 aA	0,0 cB	46,6±9,0 aA	0,0 cB
	2	30,0±8,0 aA	16,6±5,0 bcA	30,0±8,0 aA	13,3±4,0 bcA
	4	50,0±9,0 aA	50,0±9,0 abA	40,0±9,0 aA	50,0±9,0 aA
	6	33,3±8,0 aB	60,0±9,0 aA	33,0±8,0 aB	60,0±9,0 aA
	8	26,6±7,0 aA	46,6±9,0 abA	26,0±7,0 aA	46,0±9,0 abA
	10	46,6±9,0 aA	60,0±9,0 aA	46,6±9,0 aA	60,0±9,0 aA
	12	30,0±8,0 Aa	63,3±9,0 Aa	26,0±9,0 aA	60,0±9,0 aA
Mirabela	0	46,6±9,0 aA	0,0±0 cB	46,6±9,0 aA	0,0±0 cB
	2	30,0±7,0 aA	10,0±3,0 cA	30±7,0 aA	10±3,0 cB
	4	50,0±9,0 aA	26,6±7,0 cbB	43,3±9,0 aA	23,3±6,0 bcA
	6	33,3±8,0 aB	66,6±8,0 aA	30±8,0 aB	63,3±8,0 aA
	8	26,6±7,0 aB	53,3±9,0 abA	26,6±7,0 aB	53,3±9,0 abA
	10	46,6±9,0 aA	46,6±9,0 abA	43,3±9,0 aA	46,6±9,0 abA
	12	30,0±7,0 aA	26,6±7,0 cbA	26,6±7,0 aA	23,3±7,0 bcA
Serranópolis	0	73,3±7,0 aA	0,0±0 cB	70±7,0 aA	0,0±0 cB
	2	56,6±9,0 aA	16,6±5,0 cbB	56,6±9,0 aA	16,6±5,0 bcB
	4	56,6±9,0 aA	56,6±8,0 aA	53,3±9,0 aA	56,6±8,0 aA
	6	60,0±9,0 aA	50±9,0 abA	56,6±9,0 aA	43,3±8,0 abA
	8	76,6±7,0 aA	66,6±8,0 aA	73,3±7,0 aA	63,3±8,0 aA
	10	50,0±9,0 aA	63,3±8,0 aA	46,6±8,0 aA	63,3±8,0 aA
	12	66,6±8,0 aA	66,6±9,0 aA	66,6±9,0 aA	50±9,0 abA

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e as médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

4.4. Aclimatização

Das plantas provenientes dos experimentos de conservação de sementes e criopreservação de embriões zigóticos, observou-se taxas de sobrevivência de 71% e 82%, respectivamente, durante os dias iniciais de pré-aclimatização em câmara de germinação (Figuras 5 A e B). Uma das alternativas

para aumentar o sucesso na etapa de aclimatização é gradualmente expô-lo em contato com as condições externas. Esse processo é conhecido como pré-aclimatização. Em trabalhos com *A. aculeata*, Borcioni e Negrelle (2012) e Luis (2013) transferiram plantas germinadas em meio de cultura para um recipiente contendo substrato vedado com saco plástico transparente para evitar a dessecação excessiva, porém permitindo a passagem de luz. Nesses casos, a retirada do saco plástico foi feita de forma gradual, por meio de cortes nas extremidades, em intervalo de 24 horas, até retirada completa da cobertura após 72 horas.

Após 40 dias em câmara de crescimento (Percival), as plantas sobreviventes foram transferidas para casa de vegetação para o seu completo desenvolvimento e finalização do processo de aclimatização. Nessa segunda fase, de maneira geral, as plantas foram tolerantes as novas condições de cultivo, tendo em vista a taxa de sobrevivência ter sido superior a 90% (Figura 5C).

O processo de aclimatização consiste em submeter uma planta que desenvolveu em ambiente controlado às condições de campo de forma gradual, permitindo condições para sua sobrevivência e crescimento (Ledo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007). Nas condições impostas durante o período *in vitro*, as plantas encontram dificuldades para a transição do mecanismo heterótrofo para o autótrofo (Bezerra, Aloufa e Lichston, 2009), devido a aspectos estruturais anatômicos, como espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, baixa capacidade de sustentação pela pouca quantidade de tecidos, como esclerênquima e colênquima e estômatos não ou pouco funcionais (Campostrini e Otoni, 1996).

As plantas cultivadas *in vitro* desenvolvem em meio de cultura no qual difere tanto em aspectos físicos quanto em aspectos químicos do solo. Ledo *et al.* (2007) em trabalhos com a espécie *C. nucifera* germinaram embriões *in vitro* e, após 210 dias, as plantas foram transferidas para substrato contendo areia para a aclimatização e, em seguida, transferidas para casa de vegetação. Angelo *et al.* (2011) trabalhando com *Elaeis guineenses* e *E. oleifera* após germinar *in vitro* embriões zigóticos de ambas as espécies, conseguiram melhores resultados na aclimatização de plantas que apresentavam maior sistema

radicular. Em trabalho com *E. guineenses*, Pádua (2012) verificou que esta palmeira tem uma melhor taxa de aclimatização quando apresentam melhor desenvolvimento radicular no momento da transferência do meio de cultura para o substrato.

Além de fatores ligados ao vegetal, o sucesso da aclimatização também está relacionado com o recipiente (Santos, 2007; Couto *et al.* 2010), o sombreamento (Sousa e Silva, 1999), o substrato utilizado (Silva *et al.*, 2006; Ledo *et al.*, 2007) e comprimento da raiz (Bandeira *et al.*, 2013). Neste trabalho, fatores como a seleção de plantas com raiz acima de 2 cm de comprimento e parte aérea com 2 ou mais folhas e uma etapa de pré-aclimatização em câmaras de germinação, podem ter diretamente contribuído para que as taxas de sobrevivência durante essa complexa fase de transição do meio *in vitro* para o *ex vitro* fossem observadas.

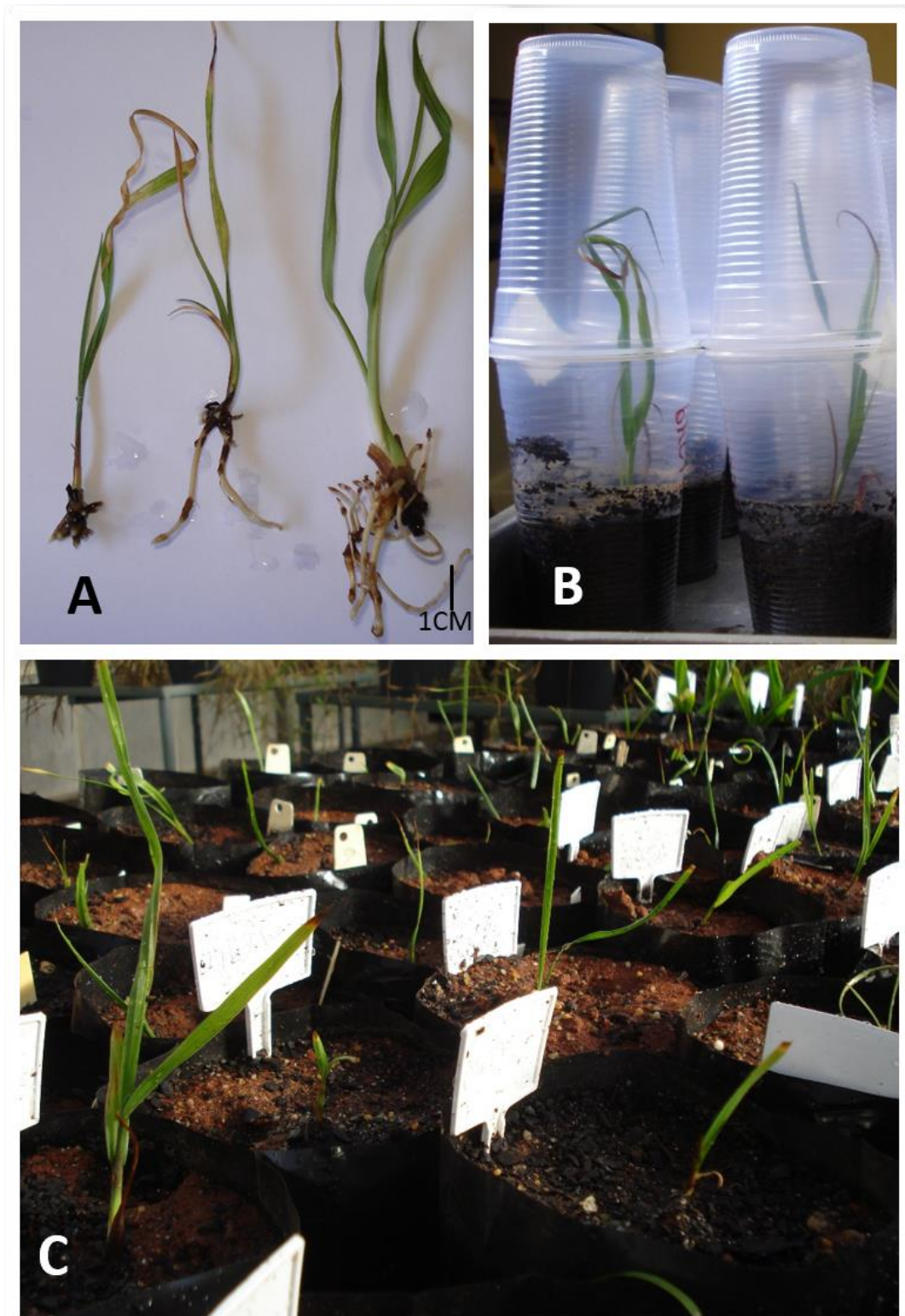


Figura 6. Aclimatização de plantas provenientes de germinação *in vitro* de *Butia capitata*: A; plantas enraizadas antes do processo de aclimatização. B; pré-aclimatização das plantas utilizando copo transparente para isolamento e proteção da planta. C; planta transferida para saco plástico contendo solo em casa de vegetação.

5. CONCLUSÕES

- Frutos de *B. capitata* coletados da população de Arinos apresentam valores morfométricos, tais como comprimento, largura e massa fresca do fruto e massa fresca da polpa de maneira geral, superiores aos frutos coletados de populações de Mirabela e Serranópolis;
- Sementes de *B. capitata* com umidade próxima a 5% apresentaram os melhores valores de germinação, após serem conservadas em temperaturas negativas de -20°C e de nitrogênio líquido (-196°C) por 360 dias.
- Embriões zigóticos de *B. capitata* são tolerantes a conservação em nitrogênio líquido, podendo assim serem criopreservados em temperaturas ultra-baixas, desde que se encontrem dentro de uma faixa ótima de umidade, preferencialmente entre 10 e 14%.
- Plantas oriundas da conservação de sementes e criopreservação de embriões zigóticos apresentam taxa de sobrevivência superior a 90% durante o processo de aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. C. S.; MORAES, L. A. C.; LOPES, R.; SOUSA, N. R.; CUNHA, R. N. V.; QUISEN, R. C.; *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* (Arecaceae) **Revista Biologia Tropical**. v. 59, n. 3: 1081-1088, September 2011.

AZAMBUJA, A. C. **Demografia e fenologia Reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari em Arambaré, Rio Gande do Sul**. Dissertação de Mestrado UFRS, 2009.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C.; Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose. **Revista Árvore, Viçosa-MG**, v.37, n.4, p.691-700, 2013.

BARBOSA, R. I.; LIMA, A. D.; JUNIOR, M. M.; Biometria de frutos do Buriti (*Mauritia flexuosa* L.F. - ARECACEAE): Produção de polpa e óleo em uma área de savana em Roraima. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, Belém, v. 5, n. 10, jan./jun. 2010.

BEZERRA, K. C. M.; ALOUFA, M. A. I.; LICHSTON, J. E.; Anatomical study of *Malus domestica* var. golden delicious cultivated *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, MG, v. 5, n. 1, p. 1-70, 2009.

BORCIONI, E.; NEGELLE, R. R. B.; Aplicação de análogo de brassinosteróide (Biobras 16®) sobre a germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de bocaiuva. **Ciência Rural**, v.42, n.2, fevereiro 2012.

BONNER, F. T.; Storage of seeds. **The woody plant seed manual**. Washington, DC, US: Department of Agriculture, Forest Service, Agriculture Handbook, v. 727, p. 85-95, 2008.

BRASIL. Regas para Análise de Sementes. [Rules for Analysis of Seeds], Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Mapa/ACS**, Brasília, 2009.

BROSCHAT, T. K.; DONSELMAN, H. Effects of maturity, storage, presoaking, and seed cleaning on germination in three species of palms. **Journal of Environmental Horticulture**, n. 4, p. 6–9, 1987.

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

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 de Fruticultura, Jaboticabal - SP**, v. 32, n. 1, p. 230-239, Março 2010.

DICKIE, J. B.; BALICK, M. J.; LININGTON, I. M.; Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family; **Biodiversity & Conservation**, Volume 1, Issue 2, pg 112-119, June 1992.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. Lavras: **ABCTP**, 1996. 12 p.

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

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2000.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Crioconservação no Melhoramento Vegetal. **EMBRAPA ALGODÃO** (Embrapa Algodão. Documentos, 115). Campina Grande, PB. 22p. 2003.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimação. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Campinas: IAC**, 1998. p. 63-67.

COSTA, C. J. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. Planaltina-DF, **EMBRAPA, CERRADOS**, 2009.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para a produção de bioenergia. **Informativo ABRATES**, Londrina v. 18, n. 1.2.3, 2008.

COUTO, T. R.; JASMIM, J. M.; CARVALHO, V. S.; LOPES, G. E. M.; Germinação *in vitro* e aclimatização de mudas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith em diferentes resíduos de agroindústria. **Plant Cell Culture. Micropropagation, Lavras**, v.6, n.2, p. 57-104, 2010.

CUNHA-SILVA, G. R.; RODRIGUES, C. M.; MIRANDA, S. C.; Dados Biométricos de frutos e sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y. T. Lee & Langenh e *H. martiana* Hayne, **Revista Biotemas**, 25 (3), setembro de 2012.

DIAS, D. S.; **Armazenamento e dormência de sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae)**. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012.

DIAS, D.S.; LOPES, P.S.N.; RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, L.A.A.; MENDES E.V.; CARVALHO, V.S.; Effects of seed structures, sucrose and gibberellic acid on the germination of *Butia capitata* (Arecaceae). **Seed Scienc & Technology**. v.41, p.371-382. 2013.

DURVAL, Y.; ENGELMAN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.). In Bajaj YSP (ed) **Biotecnology in**

Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Sintetic seed. Springer-Verlag: Berlin, p. 335-352, 2005.

ENGELMANN, F.; Plant cryopreservation progress and prospects. ***In Vitro Cell. Development Biology Plant.*** v. 40: p.427–433, September–October 2004

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm—a review. ***Euphytica***, v. 57, n. 3, p. 227-243, 1997.

FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização da Polpa do Coquinho-azedo. (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal - SP**, v. 30, n. 3, p. 827-829, Setembro 2008.

FERREIRA D. F.; Sisvar: a computer statistical analysis system. ***Ciência e Agotecnologia***, 35(6):1039-1042, 2011.

FILHO, E. A.; TAVARES, L. B. B.; PESCADOR, R.; Resíduo agroindustrial da palmeira real da Austrália *Archontophoenix alexandrae* H. Wendl & Drude (Arecaceae) como componente para substrato de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 705-707, jul. 2007.

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

FONSECA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE SIMÕES, M. O.; MENINO, G. C. O.; JESUS, F. M.; REIS, S. B. Morfometria da flor e inflorescência de *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae) em diferentes fases de desenvolvimento, no cerrado de Montes Claros – MG. **Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre**, v. 5, supl. 1, p. 657-659, jul. 2007.

IOSSI, E.; SADER, R.; PIVETTA, K. F. L.; BARBOSA, J. C.; Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, nº 2, p.63-69, 2003.

KALIL FILHO, A. N.; RESENDE, M. D. V. Melhoramento de Espécies Florestais e Palmáceas no Brasil. Anais. Workshop sobre Melhoramento de Espécies Florestais e Palmáceas no Brasil, Curitiba-PR, Capítulo 6, p. 108, 2001.

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 de Fruticultura. Jaboticabal - SP**, v. 23, n. 3, p. 468-472, dezembro 2001.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M.; Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília**, v.42, n.2, p.147-154, fev. 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P.. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, V. V. F.; SILVA, P. A. D.; MEDEIROS, M. B.; SEVILHA, A. C.; SCARIOT, A. O.; Sobrevivência e emergência de plântulas de *Butia capitata* (MART.). Beccari – Arecaceae no Cerrado do norte de Minas Gerais. **In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, 2009.

LIMA, V. V. F.; DA SILVA, P. A. D.; SCARIOT, A. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do coquinho azedo. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2010.

LIMA, V. V. F. **Estrutura e dinâmica de populações de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Beccari, Arecaceae) em áreas de extrativismo no Norte de Minas Gerais, Brasil**, Departamento de Pós-Gaduação em Ciências Florestais, Universidade de Brasília, 2011.

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

LORENZI, H.; SOUSA, H.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. **Árvore brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum: Nova Odessa, SP, p 432. 2004.**

LORENZI, H.; NOBLICK, L. R.; KAHN, F.; FERREIRA, E.; **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras). Plantarum, Nova Odessa, 2010.**

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 118: p.485–496, 2014.

LUIS, Z. G.; **Estratégias para a embriogênese somática e conservação ex situ de germoplasma de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)**, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2013.

MAGALHAES, H. M.; PINHEIRO, L. R.; SILVEIRA, F. A.; MENEZES, M.; DOS SANTOS, J. B.; RESENDE, L. V.; PASQUAL, M.; Genetic diversity of endangered populations of *Butia capitata*: Implications for conservation. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 14(11), pp. 888-900, 18 March, 2015.

MAGALHÃES, H. M.; CATÃO, H. C. R. M.; SALES, N. L. P.; LIMA, N. F.; LOPES, P. S. N. Qualidade sanitária de sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no Norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2371–2374, 2008.

MAGALHÃES, H.M., LOPES, P.S.N., RIBEIRO, L.M., SANT'ANNA-SANTOS, B.F. OLIVEIRA D.M.T.. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, 27, 273-283. (2013).

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 311 – 316, 2008.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; NUNES, Y. R. F.; Reproductive biology of *Butia Capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) in a savanna area of the north of Minas Gerais, Brazil. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 8, n. 2, p. 1-7, jul./dez 2006.

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

MOURA, R. C.; **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho-azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no Norte de Minas Gerais** Departamento de Agoecologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MOURA, R.C., LOPES, P.S.N., BRANDÃO JUNIOR, D.S., GOMES, J.G. & PEREIRA, M.B. Fruit and seed biometry of *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), in the natural vegetation of the North of Minas Gerais, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 415-419, 2010.

MEEROW, A. W.; BROCHAT, T. K. Palm Seed Germination; The Institute of Food and Agricultural Sciences, **University of Florida**. Original publication date July 1991. Reviewed June 2004. Revised August 2012.

NEGEIROS, G. F.; PEREZ, S. C. J. G.A.; Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, n.4, p.391-396, abr. 2004.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, n.1, p. 47-54, 2010.

N'Nan, O.; Borges, M.; Konan, J. L. K.; Hocher, V.; Verdeil, J. L.; Tregear, J.; Malaurie, B.; A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 48(2), 160-166, 2012.

NOGUEIRA, G. F.; **Regeneração, conservação *in vitro* e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. Universidade Federal de Lavras, p. 195, 2013.

NOVARIANTO, H., MASHUD, N., SAMOSIR, Y. M., & ADKINS, S. W.; Embryo maturity plays an important role for the successful cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**,50(6), 688-695. 2014.

NUNES, A. M.; FACHINELLO, J. C.; RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SCHWARTZ, E. Caracteres morfológicos e físico-químicos de butiazeiros (*Butia capitata*) na região de Pelotas, Brasil. **Interciência**, v. 35, n. 7, Jul 2010.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, n. 6, 2013.

OLIVEIRA, M. S. P DE; FERREIRA, D. F.; DOS SANTOS, J. B.; Divergência genética entre acessos de açazeiro fundamentada em descritores morfoagonômicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 501-506. 2007.

PADUA, M. S.; **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro *Elaeis guineensis* Jacq.**, Universidade Federal de Lavras, 2012.

PENARIOL, A. P. **Efeito da temperatura e do estágio de maturação na germinação de sementes de *Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook (Arecaceae)**. 2005. 32f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: Kinetin and gibberelic acid effects. **Ciência e Agotecnologia, Lavras**, v. 31, n. 2, p. 332-336, mar./abr 2007.

PINTO, M. S.; **Embriogênese somática direta e criopreservação de embriões de *Coffea arabica* L. cv. Catuí Vermelho**, Lavras, UFLA, 2012.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, T. G. S.; CARVALHO, V. S.; SILVA, P. O.; NEVES, S. C.; GARCIA, Q. S.; The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. **Seed Scienc & Technology**, 40, 344-353. 2012.

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

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, set./dez. 2006.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; e REIS, A.; Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC, **Brazilian Journal of Botany**, vol. 21 n. 3 São Paulo Dec. 1998.

ROSSATO, M. **Recursos genéticos de palmeiras nativas do gênero *Butia* do Rio Gande do Sul**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

ROSSATO, M.; BARBIERI, R. L.; Estudo Etnobotânico de Palmeiras do Rio Gande do Sul. **Rev. Bras. Agroecologia**, v.2, n.1, fev. 2007.

RIVAS, M.; BARILANI, A. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. de Uruguay. **Agrociencia**, Montevideo, v. 8, n. 1, p. 11-21, 2004.

SANT'ANNA-SANTOS, BRUNO F.; CARVALHO JUNIOR, WELLINGTON G.O.; AMARAL, VANESSA B.. *Butia capitata* (Mart.) Becc. lamina anatomy as a tool for taxonomic distinction from *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick comb. nov (Arecaceae). **Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , v. 87,n. 1,p. 71-81,Mar. 2015.

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos. Lisboa: **Instituto Nacional de Investigação Agária**, 207 p. 2002.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, maio/jun 2001.

SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; SANTANA, D. L. Q.; Manejo Fitossanitário em Viveiros de Palmeiras para Palmito. **CIRCULAR TECNICA 146. EMBRAPA**, ISSN 1517-5278, novembro, 2007.

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

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. *In vitro* germination of Murmuru zygotic embryos (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agotecnologia, Lavras**, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. da S. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: CID, L. P. B (ed) Cultivo in vitro de plantas, **Embrapa Informação Tecnológica**, 303 p. 2010.

SOUZA, A. G.C.; SILVA, S.E.L. Produção de mudas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng. Schum.)). Embrapa Circular Técnica, 1. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 19p. 1999.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; WALTER, J. M.; BISOGNIN, D. A.; CALGAROTO, N. S. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 495-498, 2006.

SILVA, P. A. D. **Ecologia Populacional e Botânica Econômica de *Butia capitata* (Mart.) Beccari no Cerrado no Norte de Minas Gerais**, UNB, 2008

SILVA, P. A. D.; SCARIOT, A. Phenology, biometric parameters and productivity of fruits of the palm *Butia capitata* (Mart.) Beccari in the Brazilian *cerrado* in the

north of the state of Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 3, p. 580-589, 2013.

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

SOARES, K. P.; LONGHI, S. J. A New *Butia* (BECC.) BECC. Species (Arecaceae) of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 203-208, abr.-jun 2011.

SUDHERSAN, C., M. M. ABOEL-NIL & A. AL-BAIZ. Occurrence of direct somatic embryogenesis on the sword leaf of *in vitro* plantlets of *Phoenix dactylifera* L. cultivar barhee. **Current Science**, Bangalore, v. 65, n. 11, p. 887-889, 1993.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C. R.; MACEDO, S. H. M.; FÁVARO, D. I. T.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; BADOLATO, E. S. G.; VANNUCCHI, H. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil, **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2003.