



Nota Científica / Short Communication

Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção

Cryopreservation of a threatened pindo palm species

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

protocolos de criopreservação (Panis *et al.* 2005; Gonzalez-Arno *et al.* 2008; Engelmann 2011).

Visando à proteção dos explantes, são realizados pré-tratamentos com substâncias crioprotetoras que, ao mesmo tempo em que desidratam os tecidos, promovem proteção extra e intracelular. Soluções supersaturadas com açúcares possuem alta viscosidade e previnem lesões celulares por congelamento de fluidos via interceptação de sais (NaCl). Em razão da alta viscosidade, em temperaturas negativas, as moléculas de água ficam aprisionadas entre as moléculas do açúcar, inibindo a formação de cristais de gelo (Hubálek 2003; Morgan *et al.* 2006).

Considerando que não existem trabalhos com conservação de longo prazo de *B. yatay*, espécie ameaçada de extinção, objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação.

Frutos de *Butia yatay* foram coletados em área experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (31°40'41,29"S, 52°26'22,05"W e altitude de 70 m). Sementes foram extraídas do epicarpo, imersas em álcool etílico 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de NaCl 2,5% contendo 0,5 mL de ácido dodecilbenzeno sulfônico por 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Posteriormente, os opérculos foram removidos e as sementes foram embebidas por quatro horas em água destilada autoclavada para extração dos embriões.

Após serem excisados, os embriões foram submetidos aos seguintes tratamentos: (a) congelamento em nitrogênio líquido sem pré-tratamento; (b), (c) e (d) pré-tratamento por imersão em solução de sacarose 0,4; 0,75 e 1,2 M, respectivamente, por 60 minutos, seguida de imersão em solução PVS2 (30% glicerol, 15% etileno glicol, 15% dimetil sulfóxido, 0,4 M sacarose, dissolvidos em sais de MS) por 20 minutos a 25 °C e congelamento em nitrogênio líquido.

Decorridos 10 dias de congelamento, os embriões foram descongelados a 37 °C por 2 minutos em banho maria, lavados em solução de sacarose 1,2 M e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, carvão ativado a 1,5% p/v, sacarose a 3% p/v e ágar a 0,5%. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 23 ± 2 °C, densidade de fluxo de fótons de 42 μmol.m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, durante 30 dias.

Uma parte dos embriões foi inoculada diretamente em meio de cultura MS para avaliação da viabilidade, nas mesmas condições de crescimento dos embriões criopreservados. Os embriões possuíam teor médio de umidade de 27,93%.

Decorridos 30 dias, avaliou-se a percentagem de germinação e o comprimento médio da parte aérea e de raízes.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com três repetições contendo 10 embriões por tratamento. Foram analisados o percentual de embriões germinados e os comprimentos de parte aérea e de raízes. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SISVAR versão 5.1 (Ferreira 2014).

Os embriões utilizados para caracterizar a amostra possuíam alta viabilidade, com 92% de germinação e plantas com 15,57 mm e 17,86 mm de comprimento da parte aérea e de raízes, respectivamente, após 30 dias da inoculação em meio de cultura.

Quando submetidos ao congelamento sem nenhum pré-tratamento, os embriões não sobreviveram (Tab. 1). Provavelmente, a ausência de soluções crioprotetoras levou à formação de cristais de gelo intra-celular, promovendo danos celulares irreversíveis e, conseqüentemente, a morte celular. Este resultado confirma a necessidade do pré-tratamento dos explantes visando à criopreservação.

Os embriões pré-tratados com solução de sacarose 0,4 M apresentaram maior percentagem de germinação e comprimentos da parte aérea e de raízes após a criopreservação (Tab. 1). O percentual de germinação obtido neste tratamento foi igual ao dos embriões utilizados na avaliação da viabilidade, ou seja, não sofreram nenhum tipo de tratamento. Isto indica que o pré-tratamento com o crioprotetor sacarose a 0,4 M foi eficiente e manteve a viabilidade dos embriões durante o congelamento em nitrogênio líquido.

Dias *et al.* (2015) e Frugeri (2016), obtiveram percentuais de 70% e 86% de germinação de embriões de *Butia capitata*. A estratégia utilizada por estes autores foi a promoção da desidratação dos embriões por dessecação. Em contrapartida, Salomão *et al.* (2017) observaram 100% de germinação em embriões de *Butia eriospatha* criopreservados sem qualquer pré-tratamento antes da criopreservação. Por outro lado, neste trabalho, a preservação da integridade das estruturas celulares foi obtida pelo uso de

Tabela 1 – Porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e de raízes de embriões zigóticos de butiazeiro pré-tratados com diferentes concentrações de sacarose e criopreservados em nitrogênio líquido. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Table 1 – Percentage of germination, shoot and root length of cryopreserved zygotic embryos of pindo palm in liquid nitrogen pretreated at different concentrations of sucrose. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Tratamentos	Germinação (%)	Parte aérea (mm)	Raízes (mm)
Controle (sem pré-tratamento)	0 c	0 c	0 b
Sacarose 0,4 M	92 a	10,25 ab	8,37 ab
Sacarose 0,75 M	28 b	6,33 bc	5,01 b
Sacarose 1,2 M	4 c	0 c	0 b
pr ≥ fc:	0,0000	0,0000	0,0004
c.v. (%):	21,71	67,30	91,12

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

crioprotetor, promovendo tanto a desidratação quanto a osmoproteção dos embriões de *B. yatay*.

De acordo com Castro *et al.* (2011), pré-tratamentos com crioprotetores devem ser testados em função da espécie e tipo de explante, o que é imprescindível para a escolha da técnica de criopreservação a ser utilizada (Panis & Lambardi 2005).

O alto percentual de germinação dos embriões criopreservados provavelmente se deu em função da proteção extracelular promovida pelo pré-tratamento com sacarose 0,4 M e intracelular pelo uso do PVS2, evitando a formação de cristais de gelo e a conseqüente morte dos embriões. De acordo com Pereira & Marques (2008), os crioprotetores impermeáveis, como a sacarose, devem ser utilizados em associação com aqueles permeáveis, como o PVS2, para que possam penetrar em maior quantidade nas células, prevenindo a formação de cristais de gelo e diminuindo a toxicidade em função da menor concentração necessária.

A sacarose tem sido utilizada durante a fase de pré-cultivo dos explantes previamente à imersão em soluções crioprotetoras (Shatnawi & Johnson 2004). Este dissacarídeo promove a estabilidade da membrana plasmática; tem a capacidade de preservar as proteínas da membrana por meio da substituição da água presente entre as cadeias de aminoácidos, mantendo a proteína estável e evitando sua desnaturação (Leslie *et al.* 1995); retira por efeito osmótico a água livre e leva a célula à desidratação (Vajta 2000; Pereira & Marques 2008).

Por outro lado, os embriões pré-tratados com sacarose 0,75 e 1,2 M tiveram significativa redução na porcentagem de germinação e tendência de redução nos comprimentos da parte aérea e de raízes em relação ao pré-tratamento com 0,4 M (Tab. 1), possivelmente em função de choque osmótico em suas células, ocasionando acentuada desidratação e rompimento das membranas plasmáticas quando submetidos ao congelamento. De acordo com Caldas *et al.* (1998), embora a sacarose seja determinante no crescimento e desenvolvimento das plântulas, sua elevada concentração pode provocar efeito negativo no crescimento e estresse osmótico.

O protocolo de criopreservação definido no presente estudo é o primeiro a ser realizado com *B. yatay*, uma espécie de ocorrência restrita e em risco de extinção, sendo importante alternativa para garantir a conservação desta espécie ameaçada. Embora as respostas sejam variáveis em função do genótipo, espera-se que a metodologia estabelecida possa ser empregada para outras espécies de *Butia*.

Embriões de *Butia yatay* podem ser criopreservados, com subseqüente retomada do crescimento, quando submetidos ao pré-tratamento com sacarose a 0,4 M.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPERGS - Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e ao CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, o apoio financeiro concedido.

Referências

- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (eds.) Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Embrapa-CBAB, Brasília. Pp. 87-132.
- Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR & Rodrigues APR (2011) Intracellular cryoprotant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae* 39: 957.
- Dias DS, Lopes PSN, Ribeiro LM, Oliveira LAA, Mendes EV & Carvalho VS (2015) Tolerance of desiccation and cryopreservation of *Butia capitata* palm seeds. *Seed Science and Technology* 43: 90-100.
- Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47: 5-16.
- Eslabão MP, Ellert-Pereira PE, Barbieri RL & Heiden G (2016) Mapeamento da distribuição geográfica de butiá como subsídio para a conservação de recursos genéticos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 252. Embrapa Clima Temperado, Pelotas. 52p. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166441/1/Boletim-252.pdf>>. Acesso em 20 outubro 2017.
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38: 109-112.
- Frugeri GC (2016) Caracterização de endocarpos e conservação *ex situ* de populações de *Butia capitata* [Mart. (Becc.) [Arecaceae]]. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília. 49p.
- FZB (2016) Lista de espécies da flora ameaçada do Rio Grande do Sul. Disponível em <https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=2&id_uf=23&ano=2013>. Acesso em 03 outubro 2017.
- Gonzalez-Arnan MT, Panta A, Roca WM, Escobar RH & Engelmann F (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92: 1-13.
- Hoffmann JF, Barbieri RL, Rombaldi CV & Chaves FC (2014) *Butia* spp. (Arecaceae): an overview. *Scientia Horticulturae* 179: 122-131.
- Hubálek Z (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
- Kaczmarczyk A, Turner SR, Bunn E, Mancera RL & Dixon KW (2011) Cryopreservation of threatened native Australian species what have we learned and where to from here? *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47: 17-25.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH & Crowe LM (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology* 91: 3592-3597.
- Meletti LMM, Barbosa W, Veiga RFA & Pio R (2007) Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agraria Paranaensis* 6: 13-20.
- Morgan CA, Herman N, White PA & Vesey G (2006) Preservation of microorganisms by drying: a review. *Journal of microbiological methods* 66: 183-193.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Panis B & Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *The Role of Biotechnology* 5: 43-54.
- Panis B, Piette B & Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168: 45-55.
- Pereira RM & Marques CC (2008) Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9: 267-277.
- Reed BM (2008) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin. 513p.
- Salomão AN, Santos IRI, José SCBR & Mundim RC (2017) Avaliação de metodologias para a conservação de germoplasma de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. - Arecaceae. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 324. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 24p. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/161833/1/boletim-de-pesquisa-e-desenvolvimento-324-2.pdf>>. Acesso em 20 outubro 2017.
- Shatnawi MA & Johnson A (2004) Cryopreservation by encapsulation-dehydration of 'christmas bush' (*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40: 239-244.
- Vajta G (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60: 357-364.

Editor de área: Dr. Claudio Barbedo

Artigo recebido em 21/03/2018. Aceito para publicação em 28/08/2019.



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.