RAFINOSE NA SOLUÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO AUXILIA NA SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Euterpe edulis* MARTIUS

Joana Silva Costa[1], Simone Wellita Simão de Carvalho[2], Camilly Aparecida Silva Lacerda[1], Maria Alice Brandão Silva[2], Jéssica Karina Mesquita Vieira[1], Débora Pellanda Fagundes[2], Rodrigo Sobreira Alexandre[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, joanasilvacosta9@hotmail.com, lacerdaacamilly@gmail.com, jessica.k.vieira@edu.ufes.br, rodrigosobreiraalexandre@gmail.com

[2]Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Agronomia, Alto Universitário, S/Nº, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, simonewellita@gmail.com, alice.gestaoambiental@gmail.com, debora.pellanda@yahoo.com.br

Resumo - A criopreservação de espécies recalcitrantes, como a *Euterpe edulis*, é dificultada pela elevada sensibilidade dessas espécies às condições de desidratação e congelamento. Nesse contexto, a utilização de açúcares, como a rafinose, pode contribuir para a proteção celular durante a criopreservação. Assim, objetivou-se analisar diferentes concentrações de rafinose (0; 0,10; 0,20 e 0,30 M) na solução de criopreservação de embriões somáticos de *E. edulis*. Foi observada sobrevivência em todos os tratamentos, variando de 64 a 80%, com maior porcentagem na concentração de 0,10 M de rafinose (80%). Entretanto, não foi observada germinação dos embriões somáticos em nenhum dos tratamentos. Assim, a concentração de 0,10 M de rafinose apresentou o melhor desempenho na manutenção da sobrevivência dos clusters após a criopreservação, embora a ausência de germinação indique a necessidade de ajustes no protocolo para favorecer a recuperação e a retomada do desenvolvimento dos embriões somáticos.

Palavras-chave: Juçara. Oligossacarídeo. Matriz vítrea. Crioprotetores. Conservação.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias.

Introdução

A criopreservação consiste no armazenamento de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido (-196 °C), possibilitando sua conservação por períodos prolongados com manutenção da viabilidade celular (Rauf; Ortiz; Wang, 2025). A eficiência dessa técnica está diretamente relacionada à solidificação do conteúdo aquoso celular sem a formação de cristais de gelo, processo conhecido como vitrificação. Entretanto, materiais vegetais com elevado teor de água apresentam maior dificuldade para atingir condições adequadas de vitrificação, uma vez que a presença de água livre favorece a formação de cristais de gelo, capazes de causar danos às estruturas celulares. Dessa forma, torna-se necessário reduzir o conteúdo de água disponível antes do congelamento, por meio de estratégias de desidratação, como a secagem física e/ou o emprego de soluções crioprotetoras (Ballesteros *et al.*, 2024).

Espécies recalcitrantes possuem elevado teor de água em seus tecidos e sensibilidade à dessecação, o que dificulta sua conservação por métodos convencionais e torna necessária a adoção de estratégias específicas de conservação, como a criopreservação associada à desidratação prévia do material (Lah *et al.*, 2023). A *Euterpe edulis* Martius é uma espécie recalcitrante (Jaganathan, 2021), pertencente à família Arecaceae e nativa da Floresta Atlântica (Garcia *et al.*, 2019). Além de apresentar grande importância ecológica e econômica (Leal *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2023), a espécie está classificada como vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2022), reforçando a necessidade do desenvolvimento de estratégias eficientes para sua conservação.

Entre as estratégias utilizadas para aumentar a tolerância dos materiais vegetais às condições de congelamento, destaca-se o acúmulo de açucares, aminoácidos e metabólicos secundários (Jahed; Saini; Sherif, 2023). Nesse contexto, evidencia-se que a incorporação de açúcares às soluções crioprotetoras pode contribuir para a proteção das estruturas celulares durante o processo de

criopreservação, destacando-se os oligossacarídeos da família da rafinose, que apresentam potencial para aumentar a tolerância dos materiais vegetais ao estresse provocado pelo congelamento (Misra *et al.*, 2023). Diante disso, objetivou-se com esta pesquisa analisar a adição de diferentes concentrações de rafinose na solução de criopreservação de embriões somáticos de *E. edulis*.

Metodologia

Clusters de embriões somáticos de *E. edulis* foram utilizados como material vegetal. Os clusters foram obtidos após 150 dias de cultivo em sala de crescimento, a 27 ± 2 °C, no escuro, sem subcultivos, em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo 20 mL de meio de indução composto por MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose (Dinâmica®), 1 g L^{-1} de polivinilpirrolidona (Synth®), 0,1 g L^{-1} de mio-inositol (Sigma®), 1 g L^{-1} de glutamina (Dinâmica®) e de caseína hidrolisada (Sigma®), 2,5 g L^{-1} de carvão ativado (Dinâmica®) e 3,8 g L^{-1} de ágar (Kasvi®), e suplementado com 300 µM de triclopir (Sigma®) (meio I). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com solução de hidróxido de potássio 1 N (Alphatec®), antes da autoclavagem a 120 °C por 20 min. O triclopir foi esterilizado por filtração e adicionado ao meio após a autoclavagem (Costa, 2026).

Após a obtenção dos clusters, o material foi submetido a um período adicional de cultivo de 30 dias, destinado à desidratação desses explantes, sendo os primeiros 15 dias em meio I modificado com 60 g L^{-1} de sacarose e os 15 dias subsequentes em meio I modificado com 90 g L^{-1} de sacarose. Após esse período, os clusters foram transferidos, em câmara de fluxo laminar (Pachane®), para criotubos (Kasvi®) contendo 1 mL de solução crioprotetora composta por 50% de sacarose (p v^{-1}), 50% de glicerol (v v^{-1}; Synth®) e 15% de dimetilsulfóxido (v v^{-1}; Synth®) (Fagundes *et al.*, 2026), acrescida de diferentes concentrações de rafinose (0; 0,10; 0,20 e 0,30 M; Dinâmica®). Os clusters permaneceram sob essas condições por 1 h e, posteriormente, foram imersos em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após 24 h de exposição ao nitrogênio líquido, os clusters foram descongelados a 40 °C por 2 min e lavados três vezes em solução de sacarose 50% (p v^{-1}). Posteriormente, os clusters foram transferidos para meio I sem triclopir, suplementado com 5 µM de ácido abscísico (Sigma®), e mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo claro/escuro de 8/16 h e irradiância luminosa de 4 µmol m^{-2} s^{-1}, durante 30 dias (Fagundes *et al.*, 2026). Após 30 dias de cultivo, foram analisadas a sobrevivência (%) e a germinação (%).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído por quatro tratamentos correspondentes às concentrações de rafinose (0; 0,10; 0,20 e 0,30 M), com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por cinco clusters de embriões somáticos.

Resultados

A sobrevivência dos clusters de embriões somáticos de *E. edulis* após a criopreservação variou entre os tratamentos com diferentes concentrações de rafinose. No tratamento sem adição de rafinose, foi observada sobrevivência de 64%, enquanto a adição de 0,10 M de rafinose à solução crioprotetora resultou na maior porcentagem de sobrevivência (80%), acréscimo de 16% em relação ao controle. Nos tratamentos contendo 0,20 e 0,30 M de rafinose, foram observadas porcentagens de sobrevivência de 68 e 64%, respectivamente (Tabela 1). Apesar da sobrevivência observada após a criopreservação, os embriões somáticos que compunham os clusters não apresentaram germinação em nenhum dos tratamentos durante o período de avaliação.

Tabela 1 - Sobrevivência de clusters de embriões somáticos de *E. edulis* após criopreservação em diferentes concentrações de rafinose.

Rafinose (M)	Sobrevivência (%)
0,00	64,0 ± 3,27
0,10	80,0 ± 16,33
0,20	68,0 ± 3,27
0,30	65,0 ± 6,00

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A solução crioprotetora utilizada como base em todos os tratamentos deste experimento continha 15% de dimetilsulfóxido - DMSO (v v^{-1}), além de sacarose e glicerol. A presença do DMSO pode ter contribuído para a manutenção da viabilidade dos clusters após a criopreservação, uma vez que foi observada sobrevivência em todos os tratamentos, independentemente da concentração de rafinose adicionada à solução. O DMSO atua como crioprotetor penetrante, reduzindo a formação de cristais de gelo e contribuindo para a proteção das estruturas celulares durante o congelamento (Klbik *et al.*, 2022). Esse composto tem sido utilizado em diversos estudos de criopreservação, incluindo protocolos para *E. edulis*, *Elaeis guineensis* e *Cocos nucifera* (Lédo *et al.*, 2018; Wilms *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2023; Fagundes *et al.*, 2026).

A maior sobrevivência (80%) foi observada no tratamento contendo 0,10 M de rafinose na solução crioprotetora. Entretanto, nas concentrações de 0,20 e 0,30 M, observou-se redução da sobrevivência, com valores de 68 e 64%, respectivamente. Isso pode estar relacionado com um processo de toxidez, gerado pelo aumento da concentração de solutos na solução crioprotetora. Valendo ressaltar que esse aumento é a principal causa de efeitos tóxicos, como estresse osmótico, aumento da viscosidade enzimática e metilação de DNA (Kang *et al.*, 2025).

Por fim, apesar da sobrevivência observada em todos os tratamentos, os embriões somáticos presentes nos clusters não apresentaram germinação ao final do período de avaliação. A ausência de germinação pode estar relacionada ao estádio de desenvolvimento dos clusters utilizados na criopreservação. Embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento apresentam maior diferenciação estrutural e celular, o que pode reduzir sua tolerância à desidratação e aumentar sua sensibilidade ao estresse criogênico (Białoskórska; Rucińska; Boczkowska, 2024). Esse comportamento também foi observado por Fagundes *et al.* (2026) em *E. edulis*, que verificaram maior sensibilidade ao estresse criogênico em embriões somáticos em estádios mais avançados de desenvolvimento. Assim, embora a sobrevivência dos clusters indique que parte do material permaneceu viável após a criopreservação, a ausência de germinação sugere que a sobrevivência não foi suficiente para garantir a retomada do desenvolvimento dos embriões somáticos.

Conclusão

A utilização de solução crioprotetora contendo sacarose, glicerol e 15% de dimetilsulfóxido permitiu a sobrevivência de clusters de embriões somáticos de *E. edulis* após a exposição ao nitrogênio líquido, com porcentagens de sobrevivência entre 64 e 80%. Entre as concentrações de rafinose avaliadas, 0,10 M apresentou a maior porcentagem de sobrevivência (80%). Entretanto, a ausência de germinação dos embriões somáticos em todos os tratamentos indica que as condições empregadas neste experimento ainda não foram suficientes para promover a recuperação e a retomada do desenvolvimento após a criopreservação.

Referências

BALLESTEROS, D. *et al.* Current status of the cryopreservation of embryogenic material of woody species. **Front. Plant Sci.**, v. 14, p. 1337152, 2024.

BIAŁOSKÓRSKA, M.; RUCIŃSKA, A.; BOCZKOWSKA, M. Molecular mechanisms underlying freezing tolerance in plants: implications for cryopreservation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 1, p. 1-25, 2024.

BRASIL. Normative Instruction n° 148 of 7 December 2022. National list of endangered species. **Official Gazette of the Federative Republic of Brazil, Executive Branch, Executive Branch**, Brasília, DF, 7 dec. 2022. Section 1, p. 282.

COSTA, J. S. **Structural, physiological, and molecular insights into somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius**. 2026. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2026.

FAGUNDES, D. P. *et al.* A comparison of two vitrification methods and the effect of dimethyl sulfoxide in vitrification solution for cryopreservation of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Plant Cell Tiss. Organ**

Cult., v. 166, p. 15, 2026.

GARCIA, J. A. A. *et al.* Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **J. Funct. Foods**, v. 55, p. 325-332, 2019.

JAGANATHAN, G. K. Ecological insights into the coexistence of dormancy and desiccation-sensitivity in Arecaceae species. **Ann. For. Sci.**, v. 78, p. 1-14, 2021.

JAHED, K. R.; SAINI, A. K.; SHERIF, S. M. Coping with the cold: unveiling cryoprotectants, molecular signaling pathways, and strategies for cold stress resilience. **Front. Plant Sci.**, v. 14, p. 1246093, 2023.

KANG, P. *et al.* Trends and challenges in plant cryopreservation research: a meta-analysis of cryoprotective agent development and research focus. **Plants**, v. 14, p. 447, 2025.

KLBIK, I. *et al.* Cryoprotective mechanism of DMSO induced by the inhibitory effect on eutectic NaCl crystallization. **J. Phys. Chem. Lett.**, v. 13, p. 11153-11159, 2022.

LAH, N. H. C. *et al.* An insight into the behaviour of recalcitrant seeds by understanding their molecular changes upon desiccation and low temperature. **Agronomy**, v. 13, p. 2099, 2023.

LEAL, A. *et al.* Landscape-scale forest loss shapes demographic structure of the threatened tropical palm *Euterpe edulis* mart. (Arecaceae). **For. Ecol. Manage.**, v. 502, p. 119716, 2021.

LÉDO, A. S. *et al.* Cryopreservation of zygotic embryos of the Brazilian green dwarf coconut. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 53, p. 514-517, 2018.

MISRA, V. *et al.* Advancements and prospects of CRISPR/Cas9 technologies for abiotic and biotic stresses in sugar beet. **Front. Genet.**, v. 14, p. 1235855, 2023.

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, D. C. S. *et al.* Towards chemical characterization and possible applications of juçara fruit: an approach to remove *Euterpe edulis* Martius from the extinction list. **J. Food Sci. Technol.**, v. 60, p. 429-440, 2023.

RAUF, S.; ORTIZ, R.; WANG, Y. Oil palm germplasm resources and their conservation: advances and challenges for in vitro conservation. **Plants**, v. 14, p. 3631, 2025.

WEI, Q. *et al.* Cryopreservation and cryotolerance mechanism in zygotic embryo and embryogenic callus of oil palm. **Forests**, v. 14, p. 1-16, 2023.

WILMS, H. *et al.* Developing coconut cryopreservation protocols and establishing cryo-genebank at RDA; a collaborative project between RDA and Bioversity International. **Acta Hortic.**, v. 1234, p. 343-348, 2019.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da CHAMADA CNPq/MCTI Nº 44/2024 - Faixa B - Grupos Consolidados UNIVERSAL. E da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), através do Edital FAPES No. 20/2022 CHAMADA DE APOIO A NÚCLEOS CAPIXABAS EMERGENTES EM PESQUISA. Protocolo: 51439.797.19068.30092022. No. FAPES:

1038/2022P:2022-S76C7, e do Edital FAPES 22/2025 - CHAMADA DE APOIO A NÚCLEOS CAPIXABAS DE EXCELÊNCIA EM PDI - Processo 2025-GPJ0X.