ADIÇÃO DE AÇUCARES NA SOLUÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO 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], Débora Pellanda Fagundes[2], José Carlos Lopes[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, 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, jclufes@gmail.com

Resumo - A *Euterpe edulis* possui relevância ecológica e econômica e encontra-se classificada como vulnerável a extinção. A criopreservação é o método mais adequado de conservação para essa palmeira, no entanto espécies recalcitrantes como a juçara, possuem alto teor de água em seus tecidos o que dificulta o estabelecimento de protocolos criogênicos. Uma forma de aumentar a eficiência desses protocolos é adicionando açucares e dimetilsulfóxido na solução crioprotetora utilizada durante o processo de criopreservação. Com isso, objetivou-se analisar a eficiência de diferentes soluções de criopreservação para embriões somáticos de *E. edulis*, com adição de sacarose, trealose ou rafinose, com ou sem dimetilsulfóxido. Nesse intuito, clusters de embriões somáticos de *E. edulis* foram expostos a essas soluções por uma hora, e posteriormente congelados em nitrogênio líquido por 24 horas. Após esse período, verificou-se 100% de oxidação em todos os tratamentos analisados. Evento que pode estar associado ao estádio de maturação dos embriões utilizados nesse experimento, o que reforça a necessidade de avaliar essas mesmas soluções crioprotetoras utilizando embriões menos maduros.

Palavras-chave: Juçara. Carboidratos. Crioprotetores. Conservação.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias.

Introdução

A *Euterpe edulis* Martius é uma espécie recalcitrante (Jaganathan, 2021), nativa da Floresta Atlântica e pertencente à família Arecaceae (Garcia *et al.*, 2019), que possui grande potencial ecológico e econômico (Leal *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2023) e está classificada como vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2022), o que demonstra a necessidade de conservação dessa espécie. Espécies recalcitrantes, como a palmeira juçara, possuem maior teor de água em seus tecidos, o que dificulta sua conservação por métodos convencionais. Nesse cenário, surge a necessidade de utilizar a criopreservação combinada com técnicas de desidratação parcial para essas espécies (Lah *et al.*, 2023).

A criopreservação é uma técnica de conservação, por prazo indeterminado, em nitrogênio líquido, utilizada para diferentes materiais vegetais, como embriões, brotos e meristemas. A execução eficiente dessa técnica mantém a viabilidade celular dos materiais (Rauf; Ortiz; Wang, 2025). Para que isso ocorra, o sistema aquoso celular precisa ser solidificado sem a formação de cristais de gelo (vitrificação), processo que é dificultado em materiais com maior teor de água. Sendo necessário, nesses casos utilizar protocolos de desidratação parcial como secagem física e/ou o emprego de soluções crioprotetoras (Ballesteros *et al.*, 2024).

As soluções crioprotetoras influenciam positivamente a recuperação dos materiais pós-descongelamento. Principalmente, quando acrescidas de dimetilsulfóxido, substância relacionada com a diminuição da formação de cristais de gelo (Klbik *et al.*, 2022), e açucares, compostos utilizados para aumentar a tolerância dos materiais vegetais ao estresse provocado pelo congelamento (Misra *et al.*, 2023). Diante disso, objetivou-se analisar a eficiência de diferentes soluções de criopreservação para

embriões somáticos de *E. edulis*, com adição de sacarose, trealose ou rafinose, com ou sem dimetilsulfóxido.

Metodologia

Foram utilizados para criopreservação clusters de embriões somáticos de *E. edulis*, majoritariamente no estádio escutelar, obtidos após 150 dias de cultivo em meio de indução, a 27 ± 2 °C, no escuro, sem subcultivos. Os clusters foram cultivados em placas de Petri (90 × 15 mm), contendo 20 mL de meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 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®), 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada (Sigma®), 2,5 g L^{-1} de carvão ativado (Dinâmica®) e 3,8 g L^{-1} de ágar (Kasvi®). O pH do meio 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. Após a autoclavagem, o meio foi suplementado com 300 µM de triclopir, previamente esterilizado por filtração (Costa, 2026).

Visando à desidratação gradual dos clusters, esse material foi submetido a mais 30 dias de cultivo. Nos primeiros 15 dias, utilizou-se meio MS modificado contendo 60 g L^{-1} de sacarose, seguido por outros 15 dias em meio contendo 90 g L^{-1} de sacarose (Fagundes *et al.*, 2026). Posteriormente, os clusters foram transferidos para criotubos (Kasvi®), contendo 1 mL de solução crioprotetora. Foram testadas seis combinações, constituídas pela associação de 50% de glicerol (v v^{-1}) com 50% de sacarose, rafinose ou trealose (p v^{-1}), na presença ou ausência de 15% de dimetilsulfóxido (v v^{-1}). Os clusters permaneceram em contato com as soluções por 1 h e, em seguida, foram diretamente imersos em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após 24 h de exposição ao nitrogênio líquido, os clusters foram descongelados em banho Maria a 40 °C por 2 min e submetidos a três lavagens em solução de sacarose a 50% (p v^{-1}). Em seguida, foram transferidos para meio MS, suplementado com 5 µM de ácido abscísico (Sigma®). A recuperação dos materiais foi conduzida em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 8/16 h e irradiância luminosa de 4 µmol m^{-2} s^{-1} (Fagundes *et al.*, 2026). Após 30 dias de cultivo, os clusters foram avaliados quanto à oxidação e à germinação, sendo os resultados expressos em porcentagem.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos de 15 repetições cada, totalizando 90 unidades experimentais. Cada repetição foi representada por um cluster de embriões somáticos. As soluções crioprotetoras testadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das soluções crioprotetoras utilizadas na criopreservação de clusters de embriões somáticos de *E. edulis*.

Tratamentos	Composição
S1	50% glicerol + 50% sacarose
S2	50% glicerol + 50% sacarose + 15% de dimetilsulfóxido
S3	50% glicerol + 50% rafinose
S4	50% glicerol + 50% rafinose + 15% de dimetilsulfóxido
S5	50% glicerol + 50% trealose
S6	50% glicerol + 50% trealose + 15% de dimetilsulfóxido

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Resultados

Após 30 dias de cultivo, foi observada oxidação em 100% dos clusters, independentemente da solução crioprotetora utilizada. A oxidação foi acompanhada pela progressiva necrose dos embriões, resultando na ausência de germinação e, consequentemente, na perda da capacidade de recuperação dos materiais submetidos à criopreservação.

Discussão

O estresse oxidativo é frequentemente associado ao processo de criopreservação, especialmente durante as etapas de desidratação e reaquecimento, constituindo uma das possíveis limitações à recuperação dos materiais após a exposição ao nitrogênio líquido. Nessas condições, alterações no equilíbrio redox celular podem favorecer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que,

quando produzidas em níveis superiores à capacidade de defesa antioxidante das células, podem desencadear danos oxidativos e comprometer a viabilidade celular (Popova; Kulichenko; Kim, 2023). Dessa forma, a elevada ocorrência de oxidação observada no presente estudo pode estar associada à ocorrência de estresse oxidativo durante o processo de criopreservação, contribuindo para a necrose dos embriões e a ausência de germinação após o descongelamento.

Além do estresse oxidativo, a elevada oxidação observada pode estar relacionada ao estádio de desenvolvimento dos embriões somáticos utilizados. Embriões somáticos em estádios mais avançados apresentam maior diferenciação estrutural e celular, características que podem reduzir sua tolerância às alterações no conteúdo de água e aumentar sua sensibilidade aos estresses impostos durante a desidratação e a criopreservação (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. Considerando que os clusters utilizados no presente estudo eram constituídos majoritariamente por embriões em estádio escutelar, essa característica pode ter contribuído para a baixa tolerância ao processo de criopreservação e, consequentemente, para a elevada ocorrência de oxidação e necrose observada após o armazenamento.

Conclusão

As soluções crioprotetoras avaliadas não promoveram a recuperação dos clusters de embriões somáticos de *E. edulis*, que apresentaram 100% de oxidação, seguida de necrose e ausência de germinação. Os resultados sugerem que as condições empregadas, possivelmente associadas ao estádio escutelar dos embriões, não foram adequadas para sua criopreservação. Novos estudos devem investigar a utilização de embriões em estádios menos avançados de desenvolvimento, inicialmente empregando as mesmas soluções crioprotetoras e, quando necessário, ajustando as etapas de desidratação e crioproteção, a fim de aumentar a sobrevivência dos embriões após o descongelamento.

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.

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.

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.

POPOVA, E.; KULICHENKO, I.; KIM, H. H. Critical role of regrowth conditions in post-cryopreservation of in vitro plant germplasm. **Biology**, v. 12, p. 542, 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.

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.