# ENCAPSULAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES SINTÉTICAS PARA CONSERVAÇÃO DE UMA PALMEIRA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

**Débora Pellanda Fagundes[1], Joana Silva Costa[2], Ingridh Medeiros Simões[2], Simone Wellita Simão de Carvalho[1], José Carlos Lopes[1], Rodrigo Sobreira Alexandre[2].**

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

[2]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, simoes.ingridh@gmail.com, rodrigosobreiraalexandre@gmail.com.

**Resumo**

*Euterpe edulis* Martius, é uma palmeira nativa da Floresta Atlântica, considerada uma espécie-chave para o ecossistema, pois frutifica em períodos de escassez de alimento, sustentando uma ampla diversidade de fauna. No entanto, a espécie enfrenta dificuldades na sua propagação natural. Na busca por alternativas para conservação da espécie o presente trabalho desenvolveu protocolo de produção e armazenamento de sementes sintéticas, que foram produzidas a partir de embriões somáticos e armazenadas a 27±2 °C por 0 dias e 30 dias. A taxa de germinação foi de 98% para sementes armazenadas por 0 dias e 73% após 30 dias de armazenamento, sem diferença estatística. Os resultados demonstram que as sementes sintéticas podem ser armazenadas por 30 dias sem perda significativa de viabilidade.

**Palavras-chave**: *Euperte edulis*. Conservação *ex-situ*. Germinação. Cultura de Tecidos.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Agronômica - Engenharia Florestal

## Introdução

*Euterpe edulis* Martius, conhecida popularmente como juçara, é uma palmeira nativa da Floresta Atlântica. Desempenha um papel ecológico importante, sendo considerada uma espécie-chave para o ecossistema, pois frutifica em períodos de escassez de alimento, sustentando uma ampla diversidade de fauna, incluindo seres humanos (Henderson *et al*., 1995). No entanto, desde a década de 1960, a exploração da juçara para a extração de palmito (Trevisan *et al*., 2015), que resulta na morte da planta, associada com a degradação da Floresta Atlântica, defaunação e as limitações na propagação natural da espécie, levou a inclusão da juçara na lista de espécies ameaçadas de extinção (Brasil, 2024).

A propagação e conservação da juçara são desafiadoras. A espécie não produz perfilhos, é monocaule (Schulz *et al*., 2016), e na natureza se reproduz exclusivamente por sementes. Contudo, as sementes são recalcitrantes, o que inviabiliza o armazenamento a longo prazo pois, não toleram dessecação do embrião ou baixas temperaturas (Gatti *et al*., 2008).

Nesse contexto, o armazenamento e a germinação de embriões somáticos (ES) é uma biotecnologia, que pode ser utilizada como estratégia para a preservação de germoplasmas dessa espécie. Assim, técnicas de cultura de tecidos podem ser utilizadas para a produção de ES, que poderão ser encapsulados para gerar sementes sintéticas, culminando na produção e aclimatização de plântulas.

Portanto, o objetivou-se, como o presente estudo estabelecer um protocolo para o armazenamento e germinação de sementes sintéticas de juçara. Para isso, ES foram encapsulados gerou-se sementes sintéticas, as quais foram armazenadas por 0 e 30 dias e, posteriormente, germinadas *in vitro,* aclimatizadas e cultivadas *ex vitro*. Os ES foram obtidos a partir da reprogramação celular de embriões

zigóticos, gerados via embriogênese somática indireta (ESI). Este protocolo pode ser utilizado em programas de conservação da espécie.

**Metodologia**

Foram utilizados sementes verdadeiras coletadas de matrizes de *Euterpe edulis*, no Espírito Santo, Brasil (20° 38' 24,1" S e 41° 21' 13,4" W), que foram levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAE-UFES), Espírito Santo, Brasil.

O protocolo de embriogênese somática foi iniciado conforme descrito por Oliveira *et al*. (2022). As sementes foram descascadas e desinfestadas utilizando-se álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguidas de hipoclorito de sódio – NaOCl (Êxodo Cientifica®) a 2,5% (v/v) por 20 minutos e amoxicilina (EMS®) a 3 g $L^{-1}$ por 20 minutos. Cada etapa da desinfestação foi seguida por três lavagens com água destilada e autoclavada a 121 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 kgf $cm^{-2}$.

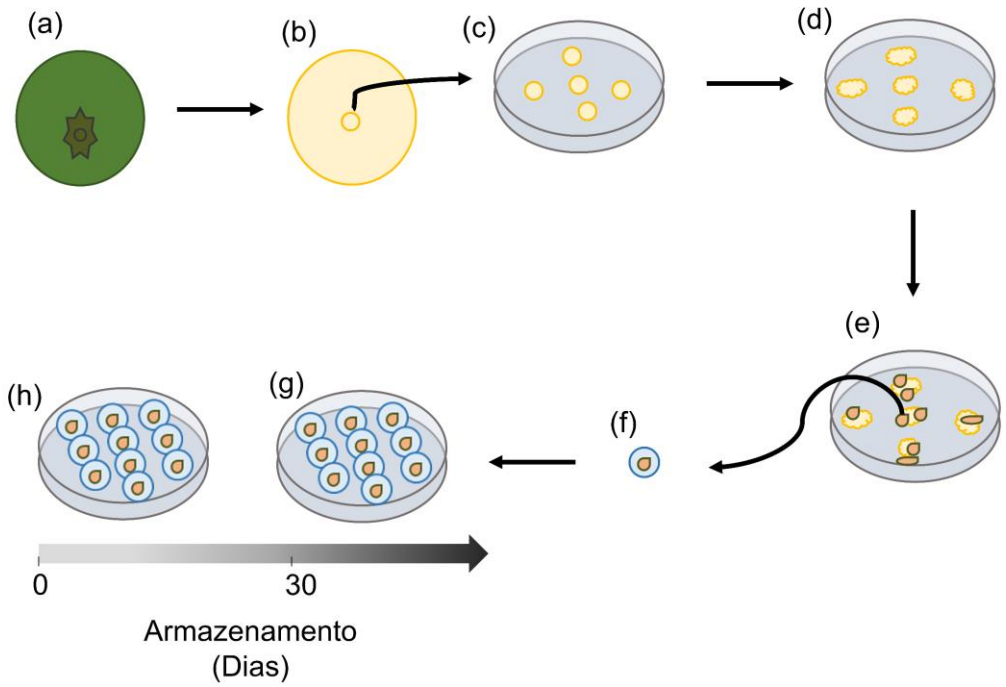
Em seguida, os embriões zigóticos foram extraídos das sementes e colocados em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 20 mL de meio MS basal (Murashige; Skoog, 1962), 4,43 g $L^{-1}$ (Sigma®), suplementado com 1 g $L^{-1}$ de polivinilpirrolidona (Synth®), 30 g $L^{-1}$ de sacarose (Dinâmica®), 6 g $L^{-1}$ de ágar (Kasvi®) e 300 µM de picloram (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 com KOH (Alphatec®). As placas foram incubadas no escuro.

Durante a fase de maturação, os explantes foram transferidos para placas contendo o mesmo meio descrito anteriormente, porém com 5 µM de ácido abscísico (ABA) (Sigma®) e sem a adição de picloram. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 8/16 horas, e intensidade luminosa de 30 µW $cm^{-2}$ $nm^{-1}$.

O encapsulamento das sementes sintéticas foi realizado após a maturação dos embriões somáticos. Estes foram isolados e transferidos para uma solução de alginato de sódio $NaC_6H_7O_6$, 3% (Sigma®) preparada com meio MS força total, (Dinâmica®), 30 g $L^{-1}$ de sacarose (Dinâmica®), com pH ajustado para 5,7±0,1.

Utilizando uma pipeta de Pasteur (Cralplast®) com a ponta cortada, os embriões foram aspirados e gotejados em uma solução de cloreto de cálcio $CaCl_2$, 0,2 M (Dinâmica®) por 20 minutos. As cápsulas formadas foram lavadas com água autoclavada e armazenadas em placas de Petri à temperatura ambiente (27±2°C) no escuro. Nos tempos de 0 dias e 30 dias, as sementes sintéticas foram descomplexadas utilizando nitrato de potássio $KNO_3$, 0,2 M (Dinâmica®) por 20 minutos, lavadas com água autoclavada, e colocadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio MS previamente descrito, porém sem adição de reguladores de crescimento (Figura 1).

Figura 1 – Germinação de sementes sintéticas. (a) semente verdadeira recém-coletada. (b) semente verdadeira descascada, com destaque para o embrião zigótico (círculo em amarelo), (c) estabelecimento dos embriões zigóticos. (d) indução à embriogênese somática indireta (ESI). (e) maturação dos embriões somáticos (ES). (f) encapsulamento do ES. (g-h) armazenamento dos embriões somáticos por 0 dias (g) e 30 dias (h).




Fonte: O autor.

As sementes sintéticas foram germinadas *in vitro* em uma sala de crescimento, sob um fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, com intensidade luminosa de 30 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ e temperatura de 27±2 °C. Ao final do período de germinação, foi avaliada a taxa de germinação para os diferentes tratamentos.

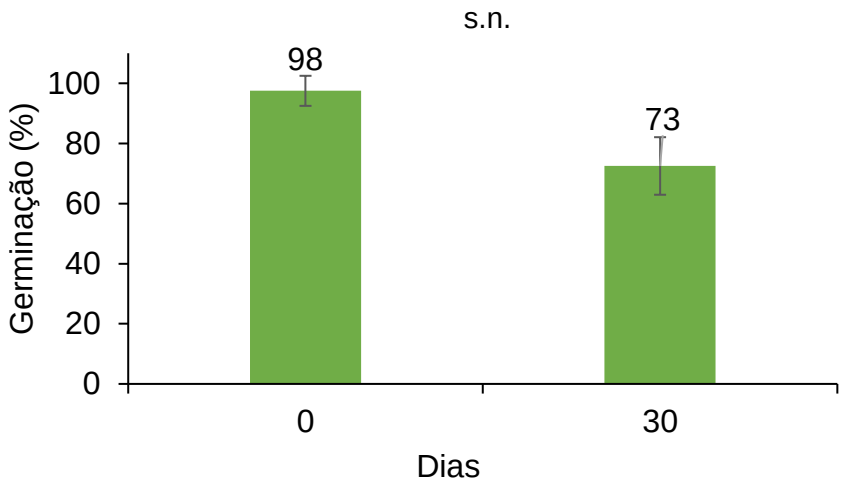
No processo de aclimatização, as plântulas somáticas foram transferidas para recipientes de polietileno com volume de 136 mL (Nutriplan®), contendo 120 mL de substrato comercial autoclavado (Mecplant®) umedecido com água destilada e autoclavada. Os recipientes foram então acondicionados em sacos com fechamento hermético (Talge®). Após 10 dias, foram feitos furos de 2 mm nos sacos, e as plântulas foram mantidas nessas condições por mais 10 dias. Ao término desse período, os recipientes foram retirados dos sacos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (sementes sintéticas com 0 dias de armazenamento e sementes sintéticas com 30 dias de armazenamento). Cada tratamento teve quatro repetições, com 10 sementes sintéticas em cada repetição. Os resultados das taxas de germinação foram submetidos ao Teste t de Student ($p<0,05$) (R Core Team, 2024).

## Resultados

Os resultados apresentados no gráfico demonstram que as sementes sintéticas sem armazenamento (0 dias) tiveram uma taxa de germinação média de 98%, enquanto as sementes sintéticas armazenadas por 30 dias apresentaram uma taxa de germinação média reduzida, de 73%. Apesar da diferença observada entre as médias dos dois tratamentos, a análise estatística indicou que essa diferença não é significativa ($p>0,05$) (Figura 2). Isso sugere que os embriões somáticos (ES) de *E. edulis* podem ser armazenados por 30 dias sem perda significativa da viabilidade das sementes sintéticas.

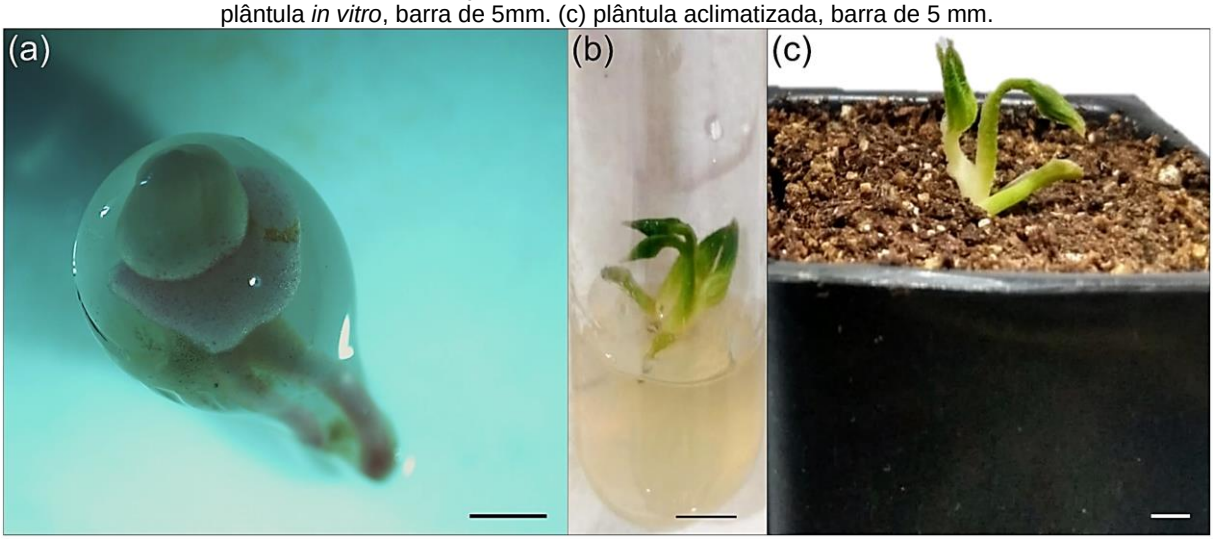
Figura 2 – Taxa de germinação de sementes sintéticas.




Fonte: O autor.

A figura 3 ilustra o crescimento das plântulas após a descomplexação das sementes sintéticas e a fase de aclimatização.

Figura 3 – Desenvolvimento e aclimatização. (a) semente sintética germinando *in vitro*, barra de 100 µM. (b) plântula *in vitro*, barra de 5mm. (c) plântula aclimatizada, barra de 5 mm.




Fonte: O autor.

**Discussão**

Os resultados indicam que o armazenamento por 30 dias à 27±2 °C não comprometeu significativamente a taxa de geminação das sementes sintéticas, sugerindo que esse método biotecnológico pode ser utilizado em armazenados de ES sem perda substancial de viabilidade durante esse período. Estudos com produção de sementes sintéticas de *Stipagrostis pennata* (Trin.) De Winter indica altas taxas de germinação no encapsulamento de ES (Aghbolaghi *et al.*, 2022).

Para espécies ameaçadas, como certas palmeiras, a utilização de sementes sintéticas pode ser uma ferramenta valiosa para a conservação. A produção de sementes sintéticas para a espécie do gênero Cannabis, fornece um sistema para propagação em massa e conservação de germoplasma

(Zarei *et al*., 2022). Esses bancos de germoplasma podem ser usados para reintroduzir espécies na natureza ou para realizar cruzamentos controlados, garantindo a diversidade genética de populações. Micropropágulos que podem sustentar o potencial de regeneração após armazenamento em baixa temperatura e são usados para preservação de germoplasma e troca de materiais vegetais (Faisal; Alatar, 2019).

**Conclusão**

Sementes sintéticas de juçara podem ser armazenadas a 27±2 °C por 30 dias sem que a taxa de germinação seja comprometida, o que permite que esse protocolo seja utilizado em futuras pesquisas de conservação da espécie. Os resultados deste estudo contribuem para o entendimento da viabilidade de sementes sintéticas em práticas de conservação. A possibilidade de armazenar essas sementes por pelo menos 30 dias sem perda significativa de viabilidade é promissora e pode servir como base para estudos futuros que explorem o armazenamento a longo prazo e em diferentes condições ambientais.

**Referências**

AGHBOLAGHI, M. A. *et al*. *Stipagrostis pennata* (Trin.) de winter artificial seed production and seedlings multiplication in temporary immersion bioreactors. **Plants.**, v. 11, p. 3122, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11223122

BRASIL. Instrução normativa nº 148. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da União de 07 de dezembro de 2022**, (Seção 1), p. 282. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf>. Acesso em: 19 de agosto de 2024.

FAISAL, M.; ALATAR, A. A. **Synthetic seeds:** Germplasm regeneration, preservation and prospects. Springer Nature Suíça AG: Springer Cham, v. 1, p. 285, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_1

GATTI, M. G. *et al*. Frost resistance in the tropical palm *Euterpe edulis* and its pattern of distribution in the Atlantic Forest of Argentina. **For. Ecol. Manag**., v. 256, p. 633-640, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.05.012

HENDERSON, A. *et al*. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton University Press, p. 285, 2019. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=l_-JDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=HENDERSON,+A.+et+al.+Field+guide+to+the+palms+of+the+Americas.+Princeton+University+Press,+p.+285,+2019.&ots=mtGjvj_Zol&sig=5wHtLP96yzK5UnyrHQpzOm3UTe4#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 19 de agosto de 2024.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

OLIVEIRA, L. B. *et al*. Morphoanotomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Sci. Hortic.**, v. 299, p. 111051, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111051

SCHULZ, M. *et al*. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Res. Int.**, v. 89, p. 14-26, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027

TREVISAN, A. C. D. *et al*. Market for Amazonian açaí (*Euterpe oleraceae*) stimulates pulp production from Atlantic Forest juçara berries (*Euterpe edulis*). **Agroecol. Sustain. Food Syst.**, v. 39, p. 762-781, 2015. DOI: https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1025461

ZAREI, A. *et al*. Cannabis synthetic seeds: an alternative approach for commercial scale of clonal propagation and germplasm conservation. **Plants**, v. 11, p. 3186, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11233186

**Agradecimentos**

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) (EDITAL FAPES Nº 04/2021 - TAXA DE PESQUISA, Protocolo: 45837.716.19068.15062021 e Edital FAPES N° 08/2021 - MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTOS, Protocolo: 47183.729.19068.22092021), e EDITAL FAPES Nº 12/2021 - Programa de Capacitação de Recursos Humanos na Pós-Graduação - DOUTORADO (PROCAP 2022 – DOUTORADO). A FAPES e CAPES pelo Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) através do projeto “Parcerias Estratégicas nos Estados” EDITAL Nº 18/2020, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFES, Processo Nº 88887.629488/2021-00 e o projeto “Consolidação dos Programas de Pós-Graduação da área de Ciências Agrárias do Estado do Espírito Santo - Ciências Florestais” pelo apoio financeiro da pesquisa, por meio do Edital FAPES/CNPq Nº 23/2018 – PRONEM (Termo de Outorga 131/2021 e Processo Nº 2021-FDGS5).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código financeiro 001, pelo apoio financeiro. À Universidade Federal do espírito Santo (UFES), e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por disponibilizar a estrutura e equipamentos utilizados nesse trabalho.