

Nota Técnica

Criopreservação de embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) contendo tecido de reserva

Cryopreservation of zygotic embryos of syringe (*Hevea brasiliensis*) containing reserve fabric

Tereza Cristina de Carvalho^I 
Ricardo Antônio Ayub^{II} 
Elaine Cristine Piffer Gonçalves^{III} 
Camila Audrey dos Reis^{II} 

^ICentro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, Brasil

^{II}Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil

^{III}Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Colina, SP, Brasil

RESUMO

A conservação de sementes recalcitrantes de seringueira é pouco duradoura, quando comparada com espécies que possuem sementes ortodoxas. Dessa forma, a preservação da espécie ocorre especialmente em campo na forma da planta inteira, o que requer muito espaço físico. A biotecnologia, por meio da técnica da criopreservação pode ser uma ferramenta auxiliadora na manutenção da viabilidade das sementes durante o seu armazenamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de embriões zigóticos de seringueira, contendo o tecido de reserva, submetidos a distintas formas de vitrificação, seguido da conservação por meio da criopreservação. Para realização da pesquisa foram utilizadas sementes de seringueira, produzidas no estado de São Paulo. Primeiramente, foram estudadas distintas formas de vitrificação dos embriões zigóticos contendo o tecido de reserva. Os embriões foram avaliados logo após a vitrificação e aos sete dias de conservação em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C. As avaliações realizadas foram: determinação do teor de água, viabilidade dos embriões pelo teste de tetrazólio, germinação *in vitro* e condutividade elétrica. Os resultados foram analisados em delineamento inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2 x 5, sendo o primeiro fator época de avaliação (antes e após a criopreservação) e o segundo fator, as formas de vitrificação. Conclui-se que é necessário testar um maior período de exposição dos embriões nas soluções de vitrificação, especialmente nas soluções que apresentaram melhores resultados de viabilidade e germinação (soluções: • 50% de glicerol; • 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose; e • 2 M glicerol seguidos de PVS). Adicionalmente, deve ser analisado um maior nível de desidratação dos embriões, o qual a espécie possa suportar, para que possam ser expostos a criopreservação.

Palavras-chave: Recalcitrante; Biotecnologia; Vitrificação; Nitrogênio líquido

ABSTRACT

The conservation of recalcitrant rubber seeds is not very durable when compared to species that have orthodox seeds. Thus, the preservation of the species occurs especially in the field in the form of the entire plant, which requires a lot of physical space. Biotechnology, through the technique of cryopreservation, can be an auxiliary tool in maintaining the viability of seeds during their storage. Thus, the objective of this work was to evaluate the viability of rubber tree zygotic embryos, containing the reserve tissue, submitted to different forms of vitrification, followed by conservation through cryopreservation. To carry out the research, rubber seeds, produced in the state of São Paulo, were used. First, different forms of vitrification of the zygotic embryos containing the reserve tissue were studied. The embryos were evaluated immediately after vitrification and after seven days of storage in liquid nitrogen at a temperature of -196°C. The evaluations carried out were: determination of the water content, viability of the embryos by the tetrazolium test, in vitro germination and electrical conductivity. The results were analyzed in a completely randomized design, in a 2x5 factorial scheme, the first factor being the time of assessment (before and after cryopreservation) and the second factor, the forms of vitrification. It is concluded that it is necessary to test a longer period of exposure of embryos in the vitrification solutions, especially in the solutions that presented better results of viability and germination (solutions: • 50% glycerol; • 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol, 15% (w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.4 M sucrose; and • 2 M glycerol followed by PVS). In addition, a higher level of dehydration of the embryos, which the species can support, must be analyzed, so that they can be exposed to cryopreservation.

Keywords: Recalcitrant; Biotechnology; Glazing; Liquid nitrogen

1 INTRODUÇÃO

A seringueira *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. Adr. de Juss.) Müell. Arg. é a maior fonte de borracha natural do mundo (VIEIRA *et al.*, 2017), sendo considerada a espécie mais importante do ponto de vista comercial (GONZALES *et al.*, 2013; PAES-TAKAHASHI *et al.*, 2016; TERRA *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2017). Sua borracha é obtida das partículas contidas no látex, fluído citoplasmático extraído continuamente dos vasos laticíferos situados na casca das árvores por meio de cortes sucessivos de finas fatias de casca, processo denominado de sangria (PAES-TAKAHASHI *et al.*, 2016; CRUZ; PEREIRA; MENDONÇA, 2017).

Um dos grandes desafios dessa espécie é a produção de mudas de qualidade e em quantidade suficiente, visando ao aumento do seu potencial produtivo (GOMES; SPERANDIO; CALDEIRA, 2012; NOAL *et al.*, 2013). No intuito de obter novas plantas, a multiplicação da seringueira se dá especialmente por meio de sementes. As sementes

de seringueira, por serem recalcitrantes (SHUIB *et al.*, 2018), devem ser colocadas para germinar imediatamente após a dispersão do fruto da planta-mãe (NAKKANONG; NUALSRI, 2018), pois, nesse momento, as sementes apresentam taxas de germinação acima de 80% (PEREIRA, 1978; SHUIB *et al.*, 2018).

A conservação das sementes de seringueira foi objeto de estudo por Shuib *et al.* (2018), que verificaram que sementes logo após o primeiro mês de armazenamento tiveram sua germinação reduzida; sendo que, no segundo mês de armazenamento, a germinação foi no máximo de 5%. Marcos-Filho (2015) relatou que a conservação das sementes depende da manutenção do elevado grau de umidade (acima de 25%), porém a germinação muitas vezes se inicia nessa condição, ocasionando o descarte dessas plântulas e inviabilidade do processo.

Por outro lado, a criopreservação é uma alternativa que pode ser aplicada na conservação de sementes de seringueira, especialmente pelas sementes dessa espécie serem recalcitrantes e a redução da temperatura atuar de forma positiva na viabilidade dos embriões por longo período de tempo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; CHARLOQ *et al.*, 2016). Diferentes técnicas são utilizadas para a criopreservação de espécies de sementes recalcitrantes. A conservação de embriões zigóticos de seringueira, por meio da criopreservação foi estudada por Nakkanong e Nualsri (2018), que usaram embriões zigóticos maduros de seringueira pré-cultivados durante três dias no meio MS suplementado com sacarose 0,3 M, submetidos à vitrificação, encapsulação e criopreservados. Após a criopreservação, a taxa de sobrevivência e regeneração dos embriões zigóticos encapsulados variaram de 27,98% e 37,50%.

Um dos maiores desafios da criopreservação de embriões de espécies recalcitrantes é a redução do grau de umidade até níveis seguros para a criopreservação. Essa secagem é necessária, pois o congelamento dos tecidos embrionários sem a retirada de um volume mínimo de água das células, pode ocasionar a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular. Nesse sentido, técnicas crioprotetoras

podem ser usadas (FERRARI *et al.*, 2016), visando proteger a célula do congelamento. A vitrificação é a técnica mais utilizada para a criopreservação de explantes, não exigindo o uso de equipamentos programáveis e com alta porcentagem de recuperação (FERRARI *et al.*, 2016).

A vitrificação é um método eficiente contra o congelamento, pois as soluções crioprotetoras utilizadas causam a viscosidade e estabilidade das organelas e líquido celular, reduzindo o potencial hídrico da célula (TAIZ *et al.*, 2017). Além de impedir a formação de cristais de gelo no interior das células e as lesões que podem causar, tornando o sistema biológico lento e sendo adequado antes do processo da criopreservação (SANTOS, 2000; HIRANO *et al.*, 2011; FERRARI *et al.*, 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de embriões zigóticos de seringueira contendo o tecido de reserva, submetidos a distintas formas de vitrificação, seguido da conservação por meio da criopreservação.

2 MATERIAL E MÉTODO

Para realização do trabalho foram utilizadas sementes de seringueira, todas elas pertencentes a plantas do clone GT 1, cultivada no estado de São Paulo, sendo a colheita realizada na segunda quinzena do mês de fevereiro de 2020 e as avaliações realizadas na primeira quinzena do mês de março do mesmo ano. As plantas de seringueira, das quais obtiveram-se as sementes, são cultivadas de forma isolada de outras matrizes. Uma vez que a planta é alógama, o cruzamento existente entre elas, devido às condições de cultivo, não permite a variabilidade genética entre as sementes produzidas, tal fato não interfere na pesquisa, pois o objetivo foi o estudo da conservação das sementes. Na sequência, as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40% (v/v), com 2,0 a 2,5% de cloro ativo, acrescida com 1 a 2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20®) sob agitação durante 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água bidestilada esterilizada (LOPES *et al.*, 2013). Decorrida a assepsia das sementes, realizou-se a

excisão dos embriões zigóticos contendo o tecido de reserva (endosperma), visto que sua remoção causaria danos físicos ao eixo embrionário. Os embriões foram colocados em recipiente fechado para evitar a perda de água dos tecidos celulares (FRIZZO, 2013).

Logo após a remoção do tegumento dos embriões, determinou-se o grau de umidade dos mesmos, de acordo com Brasil (2009); e a fim de testar os procedimentos de crioproteção, uma outra amostra de embriões contendo o tecido de reserva, foi submetida a cinco formas de vitrificação, abaixo descritas:

1 - Tratamento-testemunha, sem a imersão dos embriões em solução crioprotetora (adaptado de FRIZZO, 2013);

2 - Embriões imersos em solução composta por 50% de glicerol, durante 10 minutos, a 0°C;

3 - Embriões imersos em solução composta por 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose, por 10 minutos, a 0°C;

4 - Embriões imersos em 2 M glicerol, por 20 minutos, a 0°C, e depois imersos em *Plant Vitrification Solution* (PVS), por 10 minutos, a 0°C (adaptado de FERRARI *et al.*, 2016). O meio PVS é composto pela formulação MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,4 M sacarose, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etilenoglicol e 15% (v/v) DMSO;

5 - Embriões imersos em 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol, por 20 minutos, a 0°C (adaptado de GOMES-COPELAND *et al.*, 2012).

Após a exposição dos embriões nas soluções de vitrificação, os mesmos foram submetidos à desidratação lenta, que variou entre 2 a 12 horas. Para isso, os embriões zigóticos contendo o tecido de reserva, foram colocados em recipientes fechados (gerbox, contendo tela de alumínio), preenchido no fundo do recipiente com 80 g de sílica gel (NAKKANONG; NUALSRI, 2018). O grau de umidade dos embriões foi monitorado com base em pesagens, até obtenção do valor médio de 30% de água.

Após a vitrificação e desidratação, os embriões foram divididos em duas amostras, que foram submetidas aos seguintes procedimentos: a) aos testes de avaliação da viabilidade antes do congelamento; e b) acondicionamento dos embriões + endosperma em recipientes de alumínio, seguido de congelamento em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C , em botijões criogênicos, por sete dias, sendo as avaliações de viabilidade realizadas após esse período. Optou-se por não encapsular os embriões + endosperma, visando seguir protocolos praticados em outras pesquisas com criopreservação (FARIA *et al.*, 2016).

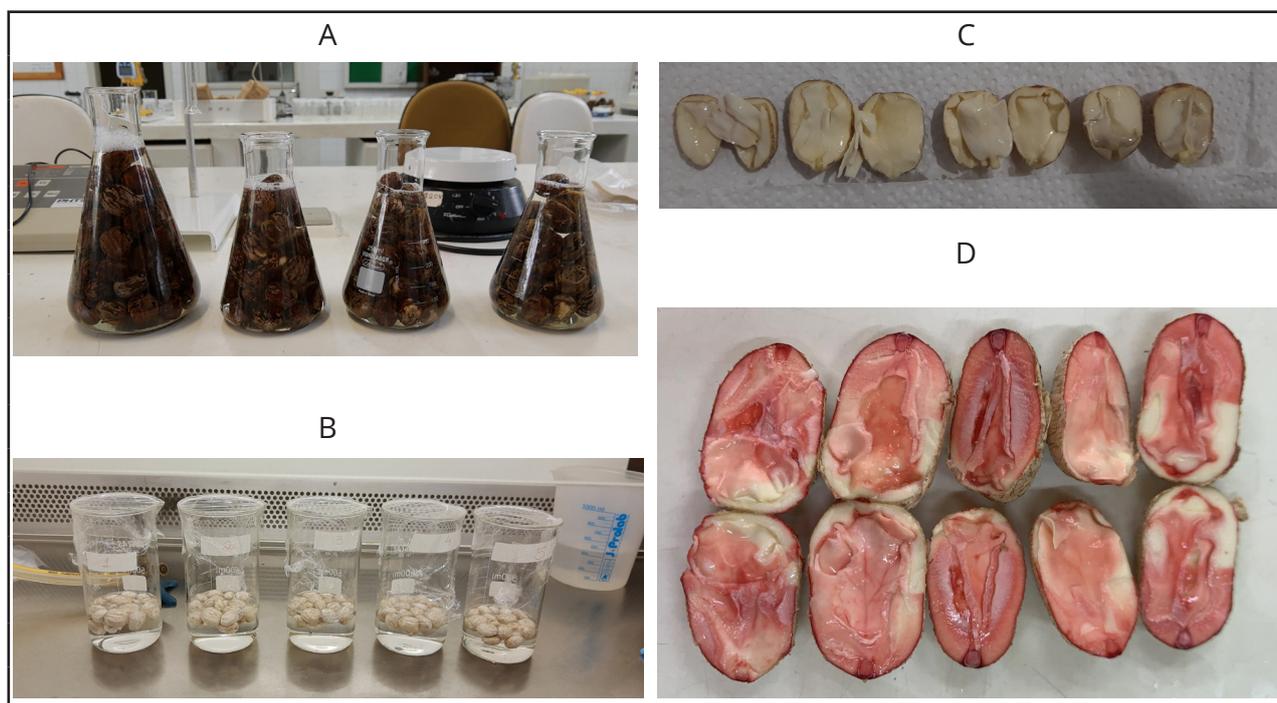
As avaliações de qualidade e viabilidade dos embriões contendo os tecidos de reserva, seguem descritas abaixo:

A determinação do grau de umidade foi realizada conforme descrito por Brasil (2009), sendo adotado o método da estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem média de duas subamostras de 5 embriões zigóticos cada (BRASIL, 2009).

Na realização do teste de tetrazólio, foram adotadas cinco repetições de cinco embriões cada, de acordo com padrões de avaliação indicados nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os embriões foram submetidos ao corte longitudinal, sendo posteriormente pré-hidratados entre papel por período de 18 horas a 20°C , na sequência foram imersos em solução de tetrazólio a 0,5%, a 40°C , por 2 a 3 horas de coloração no escuro (Figura 1). Passado esse período, realizou-se a lavagem dos embriões e os mesmos foram avaliados com auxílio de microscópio estereoscópio, de forma que os embriões foram classificadas em duas classes, sendo: embriões viáveis, situação em que as principais estruturas do embrião estão intactas e completamente coloridas com a tonalidade rosa-brilhante a carmim-vermelho, com seus tecidos íntegros; e embriões não viáveis, situação em que os embriões estão totalmente descoloridas ou com suas estruturas vitais descoloridas. Os resultados foram expressos em porcentagem média de embriões zigóticos viáveis e não viáveis por época de avaliação e forma de vitrificação adotada.

A condutividade elétrica foi analisada com cinco repetições de 10 embriões contendo o tecido de reserva, para cada época e forma de vitrificação. O procedimento adotado foi adaptado de Gomes-Copeland *et al.* (2012), para embriões zigóticos de coqueiro, em que 10 embriões mais o endosperma de sementes de seringueira, pertencentes a cada repetição foram pesados, e na sequência embebidos em copos de plástico (200 mL de capacidade), contendo 80 mL de água deionizada e mantidos em BOD a temperatura constante de 20°C, por oito horas. Decorrido esse período, a condutividade elétrica foi medida com um medidor de condutividade e o valor obtido foi dividido pela massa inicial dos embriões. Os resultados foram obtidos pela média das cinco repetições e expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}$ por tratamento.

Figura 1 – Teste de tetrazólio (TZ), sendo representado por: (A) assepsia das sementes, (B) imersão em solução de TZ, (C) sementes inviáveis e (D) viáveis



Fonte: Imagens (A, B e C) Autores (2020); Imagem (D) Juliana Scarpim Bueno Veiga (2020)

Na realização da germinação *in vitro*, adotaram-se cinco repetições com dois embriões para cada época de avaliação e forma de vitrificação. Os embriões foram acondicionados em frascos de vidro, contendo meio de cultura MS (MURASHIGE;

SKOOG, 1962), suplementado com 0,6 a 0,7 μM cinetina, 1,0 μM ácido naftalenoacético, 1,4 μM ácido giberélico e 4 g L^{-1} de carvão ativado, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O conjunto foi mantido em sala climatizada, sob a intensidade da luz de 2.500 lux, e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados foram expressos em porcentagem média de embriões germinados com desenvolvimento de plântulas normais.

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizados (DIC), em esquema fatorial 2 x 5, sendo o primeiro fator época de avaliação (antes e após a criopreservação) e o segundo fator, as formas de vitrificação. As médias foram comparadas pelo teste de Student *Newman Keuls* a $p\leq 0,05$, com exceção dos dados do grau de umidade, dos quais não se realizou a análise estatística. Todos os dados foram computados e inseridos no Excel visando gerar as tabelas, sendo realizada a análise estatística por meio do programa RStudio (2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados apresentados do grau de umidade dos embriões de seringueira, verifica-se que esse variou entre 28,5% a 33,2% para aqueles embriões dos quais o tegumento havia sido recém-extraído. Os mesmos embriões foram submetidos aos tratamentos com soluções de vitrificação, para serem analisados quanto a sua viabilidade, antes e após a criopreservação. Decorrido o período de exposição dos embriões às soluções de vitrificação, os mesmos foram novamente avaliados quanto ao grau de umidade e constatou-se variação entre 31,9% a 44,3% (Tabela 1).

Constata-se que após os tratamentos dos embriões com as soluções de vitrificação, o conteúdo de água aumentou, refletindo a embebição dos tecidos celulares pelas soluções. Esperava-se tal resultado, pois os embriões foram imersos nas soluções crioprotetoras. Entretanto, antes do congelamento, deve ser feita a redução do grau de umidade dos embriões, de forma muito cautelosa, para preparar os embriões para a criopreservação (NAKKANONG; NUALSRI, 2018). Observa-se que sementes de seringueira, com teor de água próximo de 30%, mantêm a viabilidade,

sendo que teores de água inferiores a 15% e 20% a perda da viabilidade é total (Tabela 1).

Embora a redução do grau de umidade dos embriões tenha sido realizada, procurou-se manter o grau de umidade ao redor de 30,0% para todos os tratamentos, após a desidratação. O grau de umidade dos embriões após esse procedimento variou entre 30,2% a 31,1%, sendo a diferença entre esses valores de 0,9%, ou seja, muito sutil para interferir na confiabilidade das avaliações (MARCOS-FILHO, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados médios do grau de umidade de embriões de seringueira, antes e após a vitrificação, sendo adotada a imersão nas seguintes soluções: (1) sem crioproteção, (2) 50% de glicerol, (3) 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose, (4) 2 M glicerol seguidos de PVS e (5) 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol; e após a desidratação dos embriões

Tratamentos	Grau de umidade (%) dos embriões contendo os tecidos de reserva		
	Antes da vitrificação	Após a vitrificação	Após a desidratação
1	31,9	31,9	30,2
2	31,0	35,8	30,5
3	28,5	34,7	30,7
4	27,3	38,4	31,1
5	33,2	44,3	30,5

Fonte: Autores (2020)

Verifica-se que as soluções de vitrificação adotadas não causaram a perda da viabilidade dos embriões, pois a análise do teste de tetrazólio após a exposição dos embriões em solução de vitrificação permitiu constatar atividade respiratória das células. Dessa forma, a adoção do tratamento sem crioproteção (Tratamento 1, Tabela 2) permitiu obter o maior valor de viabilidade (90%). A menor porcentagem de viabilidade dos embriões, de 65%, foi observada quando se realizou a imersão dos embriões em solução com 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol (Tratamento 5, Tabela 2).

Após a redução do grau de umidade dos embriões, bem como a conservação dos mesmos em criopreservação, foi analisada a viabilidade desses pelo teste de

tetrazólio, a qual foi nula (Tabela 2). Tal resultado pode estar relacionado ao fato da formação de cristais de gelo no meio intracelular, pois o teor de água dos tecidos celulares de 30,2 a 31,1% (Tabela 1), atrelado à exposição dos embriões no nitrogênio líquido, em uma temperatura inferior à crítica, favoreceu a nucleação e formação de cristais de gelo (FARIA *et al.*, 2016). Apesar do conteúdo de água intracelular baixo, ser o desejado para a criopreservação (ENGELMANN, 2011), a seringueira é uma espécie recalcitrante (NAKKANONG; NUALSRI, 2018; SHUIB *et al.*, 2018), que naturalmente perde a viabilidade com níveis de água muito abaixo de 30%.

Tabela 2 – Dados médios da viabilidade pelo teste de tetrazólio (antes e após a criopreservação) de embriões de seringueira, que passaram pelo processo de vitrificação, sendo adotada a imersão nas seguintes soluções: (1) sem crioproteção, (2) 50% de glicerol, (3) 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose, (4) 2 M glicerol seguidos de PVS e (5) 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol

Tratamentos	Viabilidade dos embriões de seringueira pelo TZ (%)	
	Após vitrificação sem criopreservação	Após vitrificação + criopreservação
1	90 Aa	0 B*
2	78 Ac	0 B
3	85 Ab	0 B
4	78 Ac	0 B
5	65 Ad	0 B
C.V. (%)	6,71	

Fonte: Autores (2020)

Em que: Letras maiúsculas e minúsculas não diferem entre si na linha e coluna, respectivamente, pelo teste de Student *Newman Keuls* a $p \leq 0,05$. *Médias na coluna não diferem entre si.

As soluções de vitrificação não causaram a inviabilidade dos embriões, pois após a embebição dos embriões nas soluções de TZ, realizou-se a análise da viabilidade pelo teste de tetrazólio, o qual indicou que os embriões estavam vivos (viabilidade sem criopreservação), com uma faixa de viabilidade entre 65% a 90%. Entretanto, observou-

se que a conservação em criopreservação dos embriões causou a inviabilidade dos mesmos (Tabela 2). Esse resultado provavelmente se deve ao fato das soluções de vitrificação testadas não terem favorecido a proteção das células congeladas dos embriões de seringueira; ou ao tempo de exposição dos embriões nas soluções de vitrificação não ter sido conduzido por períodos de até seis horas, como relatado por Nakkanong e Nualsri (2018).

A condutividade elétrica dos embriões foi medida antes e após a criopreservação. Dessa forma, verifica-se que, antes do congelamento, os tecidos celulares, bem como todo o sistema de membrana dos embriões, estavam preservados, pois a liberação de exsudatos foi significativamente inferior ao se comparar com os valores obtidos após a criopreservação. Tais valores são indicativos que a integridade das células foi comprometida, pois a formação de cristais de gelo, tanto no apoplasto como simplasto celular, geram danos a membrana plasmática (TAIZ *et al.*, 2017). Provavelmente, as células de seringueira com a criopreservação tiveram rompimentos na membrana plasmática, o que resultou numa maior liberação de exsudatos (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados médio da condutividade elétrica (antes e após a criopreservação) de embriões de seringueira, que passaram pelo processo de vitrificação, sendo adotado a imersão nas seguintes soluções: (1) sem crioproteção, (2) 50% de glicerol, (3) 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose, (4) 2 M glicerol seguidos de PVS e (5) 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol

Tratamentos	Condutividade elétrica ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}$)	
	Após vitrificação sem criopreservação	Após vitrificação + criopreservação
1	0,0034 Bd	0,1255 Ac
2	0,0045 Bd	0,1358 Ac
3	0,0149 Bb	0,2450 Aa
4	0,0237 Ba	0,1714 Ab
5	0,0095 Bc	0,0882 Ad
C.V. (%)	1,9	

Fonte: Autores (2020)

Em que: Letras maiúsculas e minúsculas não diferem entre si na linha e coluna, respectivamente, pelo teste de Student *Newman Keuls* a $p \leq 0,05$.

Pelos valores obtidos de condutividade elétrica (Tabela 3) para embriões de seringueira, houve comportamento distinto entre as diferentes soluções de vitrificação testadas. Observa-se que a não exposição do embrião à vitrificação (Tratamento 1), bem como a utilização de soluções com 50% de glicerol (Tratamento 2) e 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol (Tratamento 5) foram as condições de vitrificação que proporcionaram menores taxas de liberação de solutos. Talvez um período maior de contato dos embriões nas soluções de vitrificação, conforme apontado por Nakkanong e Nualsri (2018), proporcionasse a redução do potencial hídrico do simplasto e apoplasto celular (TAIZ *et al.*, 2017), protegendo de forma eficiente os tecidos celulares dos embriões de seringueira.

A germinação dos embriões *in vitro*, antes e após a criopreservação, de forma clara, apresentou resultados negativos à conservação dos embriões de seringueira nos métodos testados. Antes da criopreservação, verifica-se alto resultado de germinação (entre 60% a 84%), com resultados mais promissores na condição sem a vitrificação (Tratamento 1, com 80% de germinação) e com solução de 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose (Tratamento 3, com 84% de germinação). Já, após a criopreservação, os resultados de germinação, independentemente do procedimento de vitrificação testado, foram nulos (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados médios da germinação *in vitro* de embriões de seringueira, antes e após a vitrificação, sendo adotada a imersão nas seguintes soluções: (1) sem crioproteção, (2) 50% de glicerol, (3) 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose, (4) 2 M glicerol seguidos de PVS e (5) 1,75 mol L⁻¹ de sacarose e 15% glicerol

Tratamentos	Germinação <i>in vitro</i> (%)	
	Após vitrificação sem criopreservação	Após vitrificação + criopreservação
1	80 Aa	0 B*
2	70 Ab	0 B
3	84 Aa	0 B
4	74 Ab	0 B
5	60 Ac	0 B
C.V. (%)	16,07	

Fonte: Autores (2020)

Em que: Letras maiúsculas e minúsculas não diferem entre si na linha e coluna, respectivamente, pelo teste de Student *Newman Keuls* a $p \leq 0,05$. *Médias na coluna não diferem entre si.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que é necessário testar um maior período de exposição dos embriões nas soluções de vitrificação, especialmente nas soluções que apresentaram melhores resultados de viabilidade e germinação (soluções: • 50% de glicerol; • 30% (p/v) glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose; e • 2 M glicerol seguidos de PVS). Adicionalmente, deve ser analisado um maior nível de desidratação dos embriões, o qual a espécie possa suportar, para que os mesmos possam ser expostos à criopreservação.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 398 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.
- CHARLOQ, L. Z. *et al.* Physiology changes of shelled rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) seed after 16 days storage with PEG 6000 30% coating to induce secondary dormancy. **Agronomy Journal**, Madison, v. 15, p. 11-18, 2016.
- CRUZ, A. T.; PEREIRA, J. C. S.; MENDONÇA, S. R. Stimulation of latex production in seringueira (*Hevea brasiliensis* L.) with ethrel doses. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 41, n. 5, p. 1-6, 2017.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- FARIA, C. V. N. *et al.* Criopreservação de sementes de *Physalis angulata* L. por meio da desidratação em sílica gel. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 27-33, 2016.
- FERRARI, E. A. P. *et al.* Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 172-177, 2016.
- FRIZZO, C. **Comportamento de eixos embrionários de *Araucaria angustifolia* Bertol (O. Kuntze) após a criopreservação, usando o método de encapsulamento-desidratação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, 2013.
- GOMES, D. R.; SPERANDIO, H. V.; CALDEIRA, M. V. W. Aspectos técnicos à implantação de viveiros de seringueira. *In*: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2012, São José dos Campos. **Anais** [...]. São José dos Campos: UNIVAP, 2012. 3 p.

- GOMES-COPELAND, K. K. P. *et al.* Assessing the viability of cryopreserved coconut zygotic embryos by electrolytic conductivity and potassium leaching. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 8-13, 2012.
- GONZALEZ, G. C. *et al.* Pigmentos fotossintéticos em clones de seringueira sob ataque de oídio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 499-506, 2013.
- HIRANO, T. *et al.* Wide applicability of cryopreservation with vitrification method for seed of som Cymbidium species. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 28, n. 1, p. 99-102, 2011.
- LOPES, K. P. *et al.* Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 437-496, 1962.
- NAKKANONG, K.; NUALSRI, C. Cryopreservation of *Hevea brasiliensis* zygotic embryos by vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 45, p. 333-339, 2018.
- NOAL, R. A. *et al.* Custo operacional de produção de mudas de seringueira: estudo de caso. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 32-40, 2013.
- PAES-TAKAHASHI, V. S. *et al.* Ocorrência de nematoides em viveiros de produção de mudas de seringueira no estado de São Paulo. **Nematropica**, Bradenton, v. 46, n. 2, p. 132-137, 2016.
- PEREIRA, J. P. **Conservação da viabilidade do poder germinativo de sementes de seringueira "Hevea brasiliensis Muell. ARG"**. [S. l.]: EMBRAPA-CNP Serigueira, 1978. (Comunicado técnico, n. 3).
- RSTUDIO. **Undelete and data recovery software**. Software livre de ambiente de desenvolvimento integrado para R para análises estatísticas. R version 3.4.1, versão obtida em 9 fev. 2019. Boston, 2019. Disponível em: <https://www.rstudio.com/>. Acesso em: 09 out. 2020.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, [s. l.], v. 12, p. 70-84, 2000.
- SHUIB, N. H. *et al.* Study on biochemical properties of *Hevea brasiliensis* seeds stored at three different temperatures. **Research Journal of Seed Science**, [s. l.], v. 11, p. 1-11, 2018.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.
- TERRA, M. I. D. *et al.* Growth dynamics of rubber tree clones in northwestern Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 1032-1037, 2016.
- VIEIRA, M. R. *et al.* Resistência a ácaros de clones de seringueira nas condições do noroeste paulista Mites resistance of rubber tree clones in the north western São Paulo State conditions. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p. 102-107, 2017.

Contribuição de Autoria

1 – Tereza Cristina de Carvalho

Engenheira Agrônoma, Pós-Dra., Professora

<https://orcid.org/0000-0001-9446-695X> • tcdcarva@gmail.com

Contribuição: Administração do projeto, Investigação, Análise Formal, Curadoria de dados, Escrita - revisão e edição, Escrita - primeira redação

2 – Ricardo Antônio Ayub

Engenheiro Agrônomo, Pós-Dr., Professor

<https://orcid.org/0000-0003-3240-8417> • rayub@uepg.br

Contribuição: Administração do projeto, Supervisão, Metodologia, Escrita - revisão e edição

3 – Elaine Cristine Piffer Gonçalves

Engenheira Agrônoma, Dra., Pesquisadora Científica

<https://orcid.org/0000-0001-5797-6264> • elainegoncalves@apta.sp.gov.br

Contribuição: Investigação, Análise Formal, Curadoria de dados

4 – Camila Audrey dos Reis

Bióloga, Ma.

<https://orcid.org/0000-0001-8427-6992> • camilaaudreyreis@gmail.com

Contribuição: Investigação, Análise Formal, Curadoria de dados

Como citar este artigo

Carvalho, T. C.; Ayub, R. A; Gonçalves, E. C. P.; Reis, C. A. Criopreservação de embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) contendo tecido de reserva. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 959-973, 2021. DOI 10.5902/1980509847436. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509847436>. Acesso em: xx mês-abreviado 2021.