UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
COPEAG - COORD. DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENG. AGRÍCOLA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CRIOCONSERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO

MARIA DO SOCORRO ROCHA

Biblioteca UFCG
SMBC_CDSA
CAMPUS DE SUMÉ
Reg. 12548/13

CAMPINA GRANDE
PARAÍBA

UFCG/BIBLIOTECA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

DISSERTAÇÃO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLAS

CRIOCONSERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO

Dis
631(043.3)
R672

MARIA DO SOCORRO ROCHA

UFCG / BIBLIOTECA
DOAÇÃO

Campina Grande, Paraíba
NOVEMBRO, 2004

UFCG / BIBLIOTECA
DOAÇÃO
DEAg

MARIA DO SOCORRO ROCHA

CRIOCONSERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre

Área de concentração: Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas

Orientadores: Prof. Dr. Mário E.R. Moreira Cavalcanti Mata - EAg/CCT/UFCG
Drª. Julita Maria Frota Chagas Carvalho - Embrapa/CNPA

Campina Grande, Paraíba
NOVEMBRO, 2004

R 672 c Rocha, Maria do Socorro
Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido/Maria do Socorro Rocha, Campina Grande, PB:UFCG/CCT, 2004.
112p. il.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Campina Grande.
1. Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas
2. Algodão - cultura
3. Crioconservação
CDU:633.51

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

MARIA DO SOCORRO ROCHA

CRIOCONSERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO

BANCA EXAMINADORA	PARECER
Dr. Mário Eduardo R.M.Cavalcanti-Orientador	APROVADA
Dra. Julita Maria Frota C. Carvalho-Orientadora	APROVADA
Dra. Maria Elita Martins Duarte-Examinadora	APROVADA
Dr. Humberto Silva-Examinador	APROVADA

NOVEMBRO - 2004

COPEAG - COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA
Av. Aprígio Veloso, 882, Campus I, UFCG, Bloco CM, 1º. Andar, Caixa Postal 10.087, CEP 58.109-970, CAMPINA GRANDE, PB, BRASIL, Fone (0xx83) 310-1055, Fax (0xx83) 310-1185, E-mail: copeag@deag.ufcg.edu.br,
http://www.deag.ufcg.edu.br/~copeag

A todos aqueles que sempre acreditaram e apostaram em meu potencial, especialmente minha família, marido, amigos e todas as pessoas que admiro e amo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, incentivadores constantes, por me terem ajudado a conquistar mais esta vitória. A Kilson, de forma especial, por ser o maior incentivador em todas as minhas batalhas mas, sobretudo, por se manter sempre ao meu lado, demonstrando o grande homem com quem compartilho minha vida.

À Universidade Federal de Campina Grande, por minha formação profissional.

De modo especial aos meus orientadores: Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata e Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho pela orientação e esclarecimentos indispensáveis das dúvidas pertinentes , em particular pela alegria de viver.

Às professoras: Dra. Maria Elita Duarte Braga, Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueiredo e Dra. Josivanda Palmeira Gomes de Gouveia, pela preciosa contribuição.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida, por todo incentivo e colaboração.

À Embrapa Algodão, pelo fornecimento das sementes utilizadas no presente trabalho e pela disponibilidade de suas instalações e funcionários, durante as várias fases do experimento.

Ao Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Algodão, representado pela pessoa de Mário Brito. À Secretaria do DEAg/UFCG, na pessoa de Rivanilda Diniz Sobreiro de Almeida, pela colaboração sempre constante.

Ao pesquisador M.Sc., José Wellington dos Santos, pelo processamento e esclarecimentos referentes à na análise estatística.

Aos demais funcionários da Embrapa Algodão, ora não mencionados, mas não menos importantes na realização deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e alunos que fazem parte do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade de Campina Grande.

Aos colegas de turma: Acácio, Ailton, Ednalva, Milena, Nilena, Silvana, Robert, Joaquim, Sheilla, Diniz, Patrícia e Nubênia pelos, vários momentos de companheirismo entre nós compartilhados no decorrer do curso.

Aos colegas de laboratório: Dione Márcia de Souza, Cristiane, Juliane, Valeska e Rosemberg, pela convivência. Enfim, a todas as pessoas que contribuíram, de forma direta, ou indireta, para a concretização deste trabalho. **Agradeço**

ABREVIATURAS

2,4D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: 6-(y,y-dimetilalilamino) purina

AIA: Ácido 3-indolacético

ANA: Ácido α-naftalen-acético

BAP: 6-bencilaminopurina

CIN: 6-furfurilaminopurina ou cinetina

DNA: Ácido desoxirribonucléico

GL: Grau de liberdade

IBA: Ácido-indolbutírico

KIN: 6-furturilaminopurina o kinetina

MFT: Mãe-de-Família També

NB: Número de brotos

ns. Não significativa

CB: Comprimento de plântula

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962)

RNA: Ácido ribonucléico

TDZ: (thidiazuron), (N-fenil – N´-1,2,3- tiadiazol-5,1 – uréia)

SUMÁRIO

RESUMO v
SUMMARY vii

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO iii
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO iv
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO II iv
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I vii

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO I – CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO 2

1 INTRODUÇÃO 3

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6

2.1 Teor de água 6
2.2 Qualidade fisiológica das sementes 7
2.3 Vigor 10
2.4 Germoplasma 12
2.5 Crioconservação 13

3 MATERIAL E MÉTODOS 18
3.1 Determinação do teor de água limite para crioconservação (TALC) 17

3.1.1 Secagem das sementes 18

3.1.2 Umedecimento das sementes 19
3.2 Análise da qualidade fisiológica 21

3.2.1 Crioconservação das sementes 21

3.2.2 Teste de germinação 21

3.2.3 Teste de vigor 22

3.3 Análise estatística 22

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **24**

4.1 Determinação do teor de água limite para crioconservação-TALC 24

4.2 Crioconservação das sementes imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e vapor (-170°C) 41

5 CONCLUSÕES **56**

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **57**

INDUÇÃO DE SUPERBROTAMENBTO E REGENERAÇÃO DE PLANTAS IN VITRO, NAS CULTIVARES DE ALGODÃO COLORIDO **67**

1 INTRODUÇÃO CAPITULO II **68**

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **70**

2.1. Cultuvo *in vitro* 70

2.1.2 Reguladores de crescimento 73

2.1.3 Citocininas 74

2.1.7 Indução à organogênese 76

3 MATERIAL E MÉTODOS **83**

3.1.2 Indução à organogênese 86

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **87**

4.1 Explante do nó cotiledonário 87

5 CONCLUSÕES **98**

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS **99**

7 APÊNDICES **108**

LISTA DE FIGURAS DO CAPITULO I

FIGURAS Pág.

1 Dessecador utilizado na secagem das sementes de algodão..... 17

2 Recipiente hermético contendo semente de algodão..... 17

3 A) Botijão criobiológico, utilizado em processo criogênico. B) Botijão com canister padrão feito em aço inoxidável..... 18

4 Equações que representam a variação do vigor (Comprimento de plântula) função do teor de água para as cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco, quando armazenadas nas temperaturas de 23°C e –196°C por 5 dias..... 35

5 Uma só equação que representa as quatro cultivares com as suas dispersão germinação em função do teor de água, quando armazenadas nas temperaturas de 23°C e -196°C por 5 dias 36

6 Equações que representam a variação do vigor (comprimento de plântula) em função do teor de água para as cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó e BRS-187-8H, quando armazenadas nas temperaturas de 23°C e -196°C por 5 dias..... 37

7 Equações que representam a variação do vigor (peso da matéria seca) em função do teor de água para as cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco, quando armazenadas nas temperaturas de 23°C e -196°C por 5 dias..... 39

8 Uma só equação que representa as quatro cultivares com a sua dispersão da sua do vigor do peso matéria seca germinação em função do teor de água, quando armazenadas nas temperaturas de 23°C e -196°C por 5 dias 40

9 Equações que representam a variação as germinações das sementes quando armazenadas nas temperaturas de -170°C e -196°C..... 53

10 Equação que representam comprimento de plântula das sementes em função armazenadas por diferentes períodos nas cultivares armazenadas a -170°C 196°C..... 54

11 Equação que representam peso da matéria seca das sementes

armazenadas por diferentes períodos para as quatro cultivares nas temperaturas de -170°C e -196°C por 5 dias..... 55

LISTA DE FIGURAS DO CAPITULO II

FIGURAS Pág.

1 Produção de plantas matrizes em meio MS nos ensaios de indução á organogênese..... 83

2 Brotos em meio MS suplementado com BAP (2,0mg.L^{-1}) isolado ou associado a KIN (1,0mg.L^{-1})..... 92

3 Brotos em meio MS suplementado com PAB (2,5mg.L^{-1}) estimulou maior altura de brotos: com BAP(2,0mg.L^{-1}) associado com KIN (1,0mg.L^{-1})..... 95

4 Formação de calo nos meios MS suplementado com TDZ (1,0; 2,0 e 3, 0mg.L^{-1}) associado a KIN (2,0; 2,5; 3,0mg.L^{-1})..... 97

5 Presença de calo no meio com TDZ (Thidiazuron, 0,25mg.L^{-1})..... 98

LISTA DE TABELAS DO CAPITULO I

TABELAS Pág.

1 Valores de germinação das quatro cultivares de algodoeiro de pluma colorida e branca tradicional, com seis teores de água, as duas temperaturas..... 25

2 Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) da germinação e vigor (peso da matéria seca - PMS e comprimento de plântula - CP) de sementes de algodoeiro submetidas ao armazenamento, em diferentes condições durante 5 dias..... 26

3 Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-Verde, para a interação teor de água, e temperaturas de conservação, por 5 dias..... 27

4 Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-200-Marrom para a interação teor de água, nas duas temperaturas de conservação, por cinco dias..... 27

5 Valores médios de germinação das sementes de algodão 6M-Mocó-Branco para a interação teor de água, e temperaturas de conservação por cinco dias..... 28

6 Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-187-8H-Branco para a interação teor de água e temperaturas de conservação, por cinco dias..... 28

7 Valores médios de vigor de comprimento de plântula das sementes de algodão da cultivar BRS-Verde, com os seis teor de água, em duas temperaturas após 5 dias de conservação..... 29

8 Valores médios de vigor de comprimento de plântula das sementes de algodão da cultivar BRS-200-Marrom, com os seis teor de água, a duas temperaturas, após 5 dias de conservação..... 30

9 Valores médios de vigor de comprimento de plântula das sementes de algodão da cultivar 6M-Mocó-Branco, com os seis teor de água, a duas temperaturas, após 5 dias de conservação..... 30

10 Valores médios de vigor de comprimento de plântula das sementes de algodão da cultivar BRS-187-8H-Branco, com os seis teor de água, a duas temperaturas, aos 5 dias de conservação..... 31

11 Valores médios de vigor de peso da matéria seca das sementes de algodão da cultivar BRS-Verde, com os seis teor de água, a duas temperaturas aos 5 dias de conservação..... 31

12 Valores médios de vigor de peso da matéria seca das sementes de algodão da cultivar BRS-200-Marrom com os seis teores de água, a duas temperaturas aos 5 dias de conservação..... 32

13 Valores médios de vigor de peso da matéria seca das sementes de algodão da cultivar 6M-Mocó-Branco, com os seis teor de água, em duas temperaturas aos 5 dias de conservação..... 32

14 Valores médios de vigor de peso da matéria seca das sementes de algodão da cultivar BRS-187-8H-Branco, com os seis teor de água, em duas temperaturas..... 33

15 Valores da germinação e vigor (comprimento de plântula e peso da matéria seca) das quatro cultivares de algodoeiro de pluma colorida e branca tradicional, submetidas a duas temperaturas, no vapor (-170°C) e imersas em nitrogênio líquido a (-196°C)..... 41

UFCG - BIBLIOTECA

16 Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) da germinação e vigor (peso da matéria seco - PMS e comprimento de plântula - CP) de sementes dos algodoeiros de pluma colorida e tradicional, submetidas a crioconservação, em diferentes períodos..... 42

17 Valores médios de germinação BRS-Verde cultivar do algodoeiro de pluma colorida submetida a duas temperaturas aos 5 dias de conservação..... 43

18 Valores médios de germinação de sementes de diferentes cultivar BRS-200-Marrom do algodoeiro de pluma colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 43

19 Valores médios de germinação de sementes da cultivar 6M-Mocó-Branco do algodoeiro de plumas colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 44

20 Valores médios de germinação de sementes da cultivar BRS-187-8H-Branco do algodoeiro de plumas coloridas submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 44

21 Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar BRS-Verde do algodoeiro de plumas coloridas submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 45

22 Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar BRS-200-Marrom do algodoeiro de plumas coloridas submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 45

23 Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar 6M-Mocó-Branco do algodoeiro de plumas coloridas submetidas a duas temperaturas durante 90 dias de armazenamento..... 46

24 Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar BRS-187-8H-Branco do algodoeiro de pluma colorida submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 46

25 Valores médios do vigor do peso da matéria seca da cultivar BRS-Verde do algodoeiro de pluma colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 47

26 Valores médios do vigor do peso da matéria seca da cultivar BRS-200-Marrom do algodoeiro de pluma colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 47

UFCG - BIBLIOTECA

27 Valores médios do vigor do peso da matéria seca da cultivar 6M-Mocó-Branco do algodoeiro de pluma colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 48

28 Valores médios do vigor do peso da matéria seca da cultivar BRS-187-8H-Branco do algodoeiro de plumas colorida submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento..... 48

29 Valores médios da germinação das quatro cultivares durante quatro períodos de armazenagem..... 49

30 Valores médios do comprimento de plântula das quatro cultivares durante quatro períodos..... 49

31' Valores médios peso da matéria seca das quatro cultivares durante quatro períodos de armazenagem..... 50

32 Valores médios de germinação de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro armazenadas 90 dias, em vapor de nitrogênio e em N_2L..... 51

33 Valores médios do vigor de comprimento de plântula de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro, armazenadas 90 dias, em vapor de nitrogênio e em N_2L..... 51

34 Valores médios do peso da matéria seca de plântulas, obtidos em 90 dias de armazenagem, originadas de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro, armazenada em diferentes condições..... 52

LISTA DE TABELAS DO CAPITULO II

TABELAS Pág.

1 Composição de sais minerais, componentes orgânicos e vitaminas dos meios básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)..... 84

2 Combinação da citocinina adicionadas ao meio básico MS..... 85

3 Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) do número de brotos (NB) e altura de plântula (AB) de explantes de algodoeiro de pluma colorida e tradicional, cultivados em meios de MS com diferentes concentrações hormonais..... 87

4 Valores médios do número de brotos emitidos de nós cotiledonários de quatro cultivares de algodoeiro cultivadas em meio MS com diferentes concentrações hormonais..... 91

5 Valores médios de altura de brotos originados de explantes das quatro cultivares de algodoeiro cultivado em meios MS, com diferentes concentrações de fitohormônios..... 94

RESUMO

A conservação e manipulação dos recursos genéticos vegetais de espécies de valor econômico são de fundamental importância para a conservação em banco de germoplasma. Este trabalho teve como objetivo; a) avaliar a crioconservação de sementes de algodão das cultivares BRS-Verde, BRS-200, BRS-187-8H e 6M-Mocó e b) estudar a indução ao superbrotamento dos nós cotiledonares de plântulas do algodoeiro cultivados *in vitro,* para as mesmas cultivares supracitadas. Neste trabalho propôs-se inicialmente determinar do teor de água limite para crioconservação (TALC). Para esta determinação as sementes foram imersas ao nitrogênio líquido (-196°C) por cinco dias e após esse período elas forma descongelados e submetidas ao teste de germinação e vigor. Utilizou as armazenagem das sementes a 23°C por 5 dias como testemunha. O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial representado por (quatro cultivares x duas temperaturas x seis teor de água). Na crioconservação utilizou-se um lote de sementes com teor de água limite previamente determinado para as diferentes cultivares, a partir do qual se procedeu ao seu armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e no vapor do nitrogênio (-170°C), durante 5, 30, 60 e 90 dias. O delineamento experimental utilizado nesta etapa foi o inteiramente casualizado em parcela sub-dividida no tempo, sendo a parcela representas pela interação (quatro cultivares x duas temperaturas de armazenamento) e a sub-parcela pelos quatro períodos de armazenamento. Em cada período de armazenamento, as sementes foram submetidas a testes de germinação e vigor. De acordo com os resultados obtidos póde-se concluir que: a) estudar a determinação do teor de água limite para crioconservação-TALC, durante 5 dias, o teor de água limite para a crioconservação das cultivares BRS-Verde, BRS-200, 6M-Mocó e BRS-187-8H considerando-se a germinação dessas cultivares está entre 6 e 8% (b.u.) e considerando-se o vigor das sementes o TALC é de 6% (b.u.); b) sementes de algodoeiro, das diferentes cultivares podem ser crioconservados em banco de germoplasma nas duas temperaturas, ou seja no vapor a -170°C ou imersa ao

UFCG - BIBLIOTECA

nitrogênio líquido a -196ºC; c) a crioconservação aumenta o percentual de germinação e vigor das sementes de algodão, devido a essa temperatura a promover uma quebra de dormência pela ação do frio. No Capítulo II propôs-se a indução de superbrotamento, empregando como explante dos nós cotiledonares, plântulas cultivadas *in vitro* durante 25 dias. Os explantes foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio básico MS, suplementado com citocininas BAP, KIN e TDZ, isolados ou associados em diferentes concentrações. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento regulada à temperatura de 28°C, fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro) e intensidade luminosa de 50µmol.m^2.s^1, durante 40 dias os quais foram avaliados por meio do delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 4x17 (quatro cultivares x dezessete meios), sendo então avaliadas quanto ao número de brotos emitidos e altura de brotos. De acordo com os resultados obtidos póde-se concluir que: O meio MS suplementados com BAP (2,0 mg.L^{-1}) isolado ou associado com KIN (1,0mg.L^{-1}), promoveu uma maior capacidade de regeneração e altura de brotos; b) o meio MS suplementados com BAP (2,5 mg.L^{-1}) estimulou maior altura de brotos;c)o meio MS suplementados com TDZ (1,0 mg.L^{-1} , 0,50 mg.L^{-1}e 0,25 mg.L^{-1}) afetou a capacidade de regeneração de brotos, obteve formação de calos.

Palavras chave: sementes, crioconservação, cultura de tecidos, múltiplos brotos.

RESUMO

A conservação e manipulação dos recursos genéticos vegetais de espécies de valor econômico, são de fundamental importância para a conservação em banco de germoplasma. Este trabalho teve como objetivo: a) avaliar a crioconservação de sementes de algodão das cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, BRS-187-8H-Branco e 6M-Mocó-Branco e b) estudar a indução ao superbrotamento dos nós cotiledonares de plântulas do algodoeiro cultivados *in vitro,* para as mesmas cultivares supracitadas. Inicialmente, determina-se do teor de água limite para crioconservação (TALC). Para esta determinação, as sementes foram imersas no nitrogênio líquido (-196ºC) durante cinco dias e após este período elas foram descongelados e submetidas ao teste de germinação e vigor. Utilizou-se a armazenagem das sementes a 23ºC por 5 dias, como testemunha. O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial representado por (quatro cultivares x duas temperaturas x seis teores de água). Na crioconservação utilizou-se um lote de sementes com teor de água limite previamente determinado para as diferentes cultivares, a partir do qual se procedeu ao seu armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e no vapor do nitrogênio (-170°C), durante 5, 30, 60 e 90 dias. O delineamento experimental usado nesta etapa foi o inteiramente casualizado, em parcela subdividida no tempo, sendo a parcela representada pela interação (quatro cultivares x duas temperaturas de armazenamento) e a subparcela pelos quatro períodos de armazenamento. Em cada período de armazenamento as sementes foram submetidas a testes de germinação e vigor. De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que: a) O teor de água limite para crioconservação-TALC, durante 5 dias, para a crioconservação das cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco, considerando-se a germinação dessas cultivares está entre 6 e 8% (b.u.) e, quanto os vigor das sementes, o TALC foi de 6% (b.u.); b) sementes de algodoeiro das diferentes cultivares podem ser crioconservadas em banco de germoplasma, nas duas temperaturas, ou seja, no vapor a -170°C ou imersa ao nitrogênio líquido a -196ºC; c) a crioconservação aumenta o percentual de germinação e vigor das sementes de algodão, em virtude dessa temperatura promover quebra de dormência, pela ação do frio. No Capítulo II propôs-se a indução de superbrotamento, empregando-se como explante nós cotiledonares de plântulas cultivadas *in vitro* durante 25 dias. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio básico MS, suplementado com citocininas BAP, KIN e TDZ, isolados ou associados a diferentes concentrações. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento regulada à temperatura de 28°C, fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro) e intensidade luminosa de 50µmol.m^2.s^1, durante 40 dias, os quais foram avaliados por meio do delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 4x17 (quatro cultivares x dezessete meios), sendo então avaliadas quanto ao número de brotos emitidos e altura do comprimento de brotos. De acordo com os resultados obtidos pôde-se concluir que: a) o meio MS suplementado com BAP (2,0mg.L^{-1}) isolado ou associado a KIN (1,0mg.L^{-1}),

UFCG - BIBLIOTECA

promoveu maior capacidade de regeneração e altura de brotos; b) o meio MS suplementado com BAP(2,5mg.L^{-1}) estimulou altura superior de brotos; c) o meio MS suplementado com TDZ (1,0mg.L^{-1}, 0,50mg.L^{-1} e 0,25mg.L^{-1}) afetou a capacidade de regeneração de brotos e a formação de calos.

Palavras chave: sementes, crioconservação, cultura de tecidos, múltiplos brotos

UFCG - BIBLIOTECA

SUMMARY

The conservation and manipulation of the resources genetic vegetables of species of economical value are of fundamental importance for the conservation in germ plasma bank. This work had as objective; a) to evaluate the conservation of cotton seeds of the you cultivate BRS-Verde, BRS-200, BRS-187-8H and 6M-Mocó and b) to study the induction to the super sprouts of the knots cotiledonáres of plantlet of the cotton cultivated *in vitro*, for the same ones cultivate above-mentioned. In this work he intended initially to determine of the tenor of water it limits for conservation (TALC). Para this determination the seeds were immersed to the liquid nitrogen (-196ºC) for five days and after that period them form thawed and submitted to the germination test and vigor. It used them storage of the seeds to 23ºC for 5 days as witness. The statistician employed delineamento was it entirely casualizado with factorial arrangement represented for (four cultivate x two temperatures x six tenor of water). In the conservation a lot of seeds was used with tenor of water it previously limits certain for the different ones you cultivate, starting from which was proceeded to your storage in liquid nitrogen (-196°C) and in the vapor of the nitrogen (-170°C), during 5, 30, 60 and 90 days. The experimental delineamento used in this stage it was it entirely actualized in portion sub-divided in the time, being the portion represents for the interaction (four cultivate x two storage temperatures) and the sub-portion for the four storage periods. In each storage period, the seeds were submitted to germination tests and vigor. In agreement with the results obtained to end that: the) to study the determination of the tenor of water limits for conservation -TALC, for 5 days, the tenor of water limits for the conservation of the you cultivate BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco and BRS-187-8H-Branco being considered the germination of those you cultivate it is between 6 and 8% (b.u.) and being considered the vigor of the seed TALC is of 6% (b.u.); b) cotton seeds, of the different ones cultivate they can be conservation in germ plasma bank in the two temperatures, or be in the vapor to -170°C or immersed to the liquid nitrogen to -196ºC; c) the conservation increases the percentile of germination and vigor of the cotton seeds, due to that temperature to promote a dormancy break for the action of the cold. In the Chapter II he intended the super sprouts induction, using as explants of the knots cotiledonares, plantlets cultivated in vitro for 25 days. The explantes were cultivated in rehearsal tubes containing the BAD basic way, supplemented with citocininas BAP and KIN and the auxina TDZ, isolated or associated in different concentrations. The rehearsal tubes containing the explantes was maintained in growth room regulated to the temperature of 28°C, photoperiod of 16/8h (dark/clearing) and luminous intensity of 50µmol.m2.s1, for 40 days which were entirely appraised through the delineamento actualized, with factorial arrangement of 4x17 (four cultivate x seventeen means), being then appraised with relationship to the number of emitted sprouts and height of the length of sprouts. In agreement with the results obtained póde-se to end that: a) to study the explantes with half BAP supplemented with citocinina isolated BAP, in the concentrations of 1,0mg.l^{-1} and 2,0mg.l^{-1} of BAP, that there was satisfactory super sprouts in you cultivate them BRS-200-Marrom and 6M-Mocó-Branco with an average of 2,6 sprouts for explants, granting

UFCG - BIBLIOTECA

significantly of the others cultivate; the index of sprouts with the citocinina BAP associated with KIN in you cultivate them BRS-Verde, BRS-200-Marrom and BRS-187-8H-Branco, in averages, of 2,6, granting of cultivating in the 6M-Mocó that was on average of 2,1; c) the length of the height of sprouts the way BAD supplies with 2,5mg.l-1 of BAP (T_4) and with 2,0 mg.l^{-1} of BAP and 1 mg.l^{-1} of KIN (T_6), it varied between 2,2 and 2,1, sprouts for explant in most of the you cultivate; d) height of the explantes was significant smaller when cultivated in means supplementations with BAP in inferior concentration to 1,0mg.l^{-1} and superior to 3,0mg.l^{-1}, as well cultivated with TDZ isolated or associated KIN; a) isolated TDZ in the concentrations (1,0mg.l^{-1}, 0,50mg.l^{-1} and 0,25mg.l^{-1}), or associated KIN allows the formation of calluses and not of super sprouts.

Keywords: seeds, crioconservação, culture of fabrics, multiple sprouts.

INTRODUÇÃO GERAL

Os algodoeiros herbáceo e arbóreo, de origem tropical, são explorados economicamente em países subtropicais. O algodão arbóreo colorido já era utilizado pelos incas, há 4.500 a.C. mas, também, por outros povos antigos das Américas, África e Austrália. A maioria das espécies primitivas de algodão possui fibras coloridas. No Brasil foram coletadas plantas de algodoeiros asselvajados, cultivados, das espécies *Gossypium barbadense* L. e *Gossypium hirsutum* L. raça marie galante, nas tonalidades branca e colorida (REDDY et al., 1987).

A crioconservação das sementes é uma técnica que utiliza temperatura muito baixa, de modo a reduzir ou inibir, o metabolismo, por completo; assim, as sementes armazenadas podem ser preservadas indefinidamente e, como conseqüência, o armazenamento criogênico, que seria uma teoria, será procedimento ideal para a conservação do patrimônio fitogenético das espécies, por longo período de tempo (CHIN, 1988).

As técnicas de armazenamento criogênico oferecem outras vantagens além da vida de armazenamento muito longa, dentre as quais se pode citar: baixo custo, menor mão-de-obra, baixa manutenção e não dependência de eletricidade.

A biotecnologia é uma ferramenta eficiente para induzir mutações, obter híbridos somáticos e regenerar novos genótipos a partir de células, além de êxito existente na propagação de plântulas (CHIN, 1988).

Uma grande vantagem da cultura de tecidos é possibilitar que esta permita, ao melhorista de plantas, explorar melhor a variabilidade genética. A utilização em programas de melhoramento da variação somoclonal e da mutação induzida *in vitro,* pode facilitar a obtenção de indivíduos com melhor vantagem adaptativa a vários estresses bióticos e abióticos (LIN, 1992).

Objetivou-se determinar, no Capitulo I, o teor de água limite para crioconservação (TALC) e avaliar a qualidade fisiológica das sementes de quatro cultivares de algodoeiro, para que possibilite a preservação das sementes de algodão utilizando-se técnicas de crioconservação e, no Capítulo II, a micropropagação ou cultivo "*in vitro*" de explantes através de fitohormônio para indução de brotos.

CAPÍTULO I

CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO

UFCG - BIBLIOTECA

1. INTRODUÇÃO

Os algodoeiros de pluma colorida e tradicional, são considerados uma das plantas mais cultivadas pelo homem, tendo em vista sua fibra ser consumida em todo o mundo. Como subprodutos de sua lavoura são aproveitados, ainda, o óleo, a farinha, a torta, o línter e a casca, todos extraídos da semente ou caroço.

A cultura do algodão tem importância socioeconômica relevante para o Nordeste brasileiro, especialmente para a região semi-árida e, de maneira particular, para o estado da Paraíba. Um dos fatores mais significativos para o êxito de seu cultivo é, sem dúvida, a utilização de sementes de algodão com elevada qualidade física e genética. O emprego das sementes melhoradas contribui expressivamente para o aumento do rendimento do algodoeiro e para a melhoria das características tecnológicas da fibra (GOMES, 1992). Esses parâmetros fazem desta cultura um sucesso nacional e internacional, baseados em constantes pesquisas cujas sementes são melhoradas com o auxílio dos bancos genéticos.

O germoplasma vegetal, e sua conservação são hoje, considerados de alta prioridade em diversos países. Durante anos, considerou-se o solo, a água e o ar como recursos naturais essenciais. Recentemente, adicionou-se o germoplasma como o quarto recurso natural essencial (FREITAS, 1992). Conclui-se então, que Bancos Ativos de Germoplasma (BAGS) constituem um dos principais patrimônios de uma empresa ou instituição agropecuária, por serem a fonte de genes que alimentam os programas de melhoramento das diferentes culturas vegetais.

Tais coleções devem possuir acessos bem caracterizados, permitindo ao produtor conhecer a real variabilidade e potencialidade dos genótipos que atenderão, posteriormente, aos vários segmentos demandados pela pesquisa (AGUIAR, 1993).

São inúmeros os programas de desenvolvimento tecnológico em andamento, conduzido pelo Centro Nacional do Algodão da EMBRAPA, cujo objetivo é desenvolver novas variedades de algodão colorido com vista obtenção de a novas cores e tonalidades.

Para este desenvolvimento genético torna-se necessário lançar mão de um banco de germoplasma na quais sementes com determinadas características genéticas serão fixadas nas plantas, dando origem de outras cultivares com deferentes características. Portanto, para conservar sementes em um banco genético faz-se necessário que determinadas condições de temperatura e umidade relativa do ar sejam mantidas, sob pena das sementes perderem sua viabilidade em pouco tempo (VEIRA, 1994).

No Brasil, as sementes de algodão em bancos de germoplasma, são rotineiramente submetidas ao armazenamento na temperatura de 10 °C e umidade relativa do ar de 40%, durante vários meses, sendo este banco de germoplasma renovado consecutivamente, na medida em que as sementes baixam sua qualidade fisiológica para níveis não aceitáveis (ALMEIDA, 2000). Este processo, segundo CAVALCANTI MATA (2001), embora tenda preservar as espécies que estão sendo conservadas no banco de germoplasma, não evita porém, a erosão genética das espécies; além disso, o custo de instalação dos os sistemas convencionais de conservação em câmaras frias têm um custo de instalação bastante elevado, envolvendo estruturas prediais básicas, isolamento térmico, barreiras de vapor e equipamentos de refrigeração: tal aparato exige assistência técnica especializada em regime constante, com custo de manutenção.

Com finalidade de evitar a erosão genética das espécies e de conservar as sementes por períodos considerados indefinidos, tem-se empregado, a tecnologia criogênica, que consiste em submeter as sementes a temperaturas muito baixas, ou seja, ao nitrogênio líquido a -196 °C ou no vapor do nitrogênio –170 °C.

Apesar das desvantagens em termos de custo inicial de instalação, em um sistema de conservação criogênica o controle periódico da viabilidade das sementes conservadas não se faz necessário; neste sentido, tal vantagem se reflete em economia de recursos materiais e humanos necessários para renovação do banco.

De acordo com KHARTA (1985) a criogenia tem sido um dos mais promissores métodos de conservação *ex situ*, desde que dada a devida atenção às características fisiológicas do material a ser conservado.

MARTINS NETO (1994) ressalta que, com a melhoria do grau tecnológico do agricultor, há maior exigência por parte deste em adquirir sementes de melhor qualidade e as empresas produtoras procuram atingi-la, ano após ano, preservando suas características genéticas, física e fisiológica; portanto, esta situação mostra cada vez mais a necessidade de se realizar estudos sobre a crioconservação das sementes por longos períodos de tempo.

Nesta linha de pensamento, objetivou-se, com o presente trabalho como determinar o teor de água limite para crioconservação (TALC), das sementes de quatro cultivares de algodoeiro BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco e avaliar a qualidade fisiológica dessas cultivares, pelo tempo de 90 dias, quando submetidas ao processo de crioconservação, nas temperaturas de -196 °C e -170 °C.

UFCG - BIBLIOTECA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Teor de água

O teor de água é um dos fatores que governam a conservação dos grãos e sementes armazenadas, devido à sua importância do ponto de vista comercial, chegando a alterar substancialmente é significativa para o valor do produto negociável, cuja determinação desde a colheita até a última etapa do armazenamento PUZZI, (1996). De acordo com AGUIAR et al. (1993) o teor de água é também essencial para se determinar as condições adequadas de armazenamento, um vez que este é função direta da temperatura, da umidade relativa do ar e do tipo de acondicionamento das sementes.

Como as sementes são higroscópicas, tendem a sofrer variações em seu teor de água, durante o armazenamento, até atingirem o equilíbrio higroscópico com a umidade relativa do ar no ambiente de armazenagem (GURJÃO, 1995). Desta forma, a redução da umidade relativa do ar e da temperatura contribui para a preservação da qualidade da semente, mantendo o embrião em sua mais baixa atividade metabólica (AGUIAR et al., 1993).

VIGGIANO (1987), afirma ser imprescindível se conhecer a quantidade de água contida nas sementes logo após a maturação fisiológica e, posteriormente, na colheita, secagem, armazenamento e comercialização. Na secagem, o teor de água inicial determina a maior ou menor velocidade do processo (TOUCHELL, 1994).

Resultando a necessidade de se conhecer o teor de água das sementes ALMEIDA et. al. (1997), apresentam as seguintes considerações: na colheita, o teor de água determina o ponto de maturação da semente e, conseqüentemente, o ponto de colheita, isto é, se a semente estiver com alto teor de água, não deve ser limpa antes de ser secada até um teor de água ideal, para que as sementes passam receber a ação mecânica da debulha; este procedimento evita danos mecânicos às sementes, causados pelas máquinas; no armazenamento altos teores de água deterioram as sementes, provocando a perda do seu vigor do poder germinativo; na embalagem: se houver teor de água inadequado haverá,

também, sem dúvida, prejuízo da conservação das sementes em qualquer tipo de embalagem, principalmente nas herméticas, e no controle de insetos e microrganismos patogênicos: altos teores de água favorecem o desenvolvimento de insetos e microrganismos.

Desta maneira evidencia-se, segundo PUZZI, (1996), que a manutenção da viabilidade da semente está intimamente associada ao seu teor de água. Sementes sujeitam as variações no seu teor de água deterioram-se acima do teor recomendado para sua conservação, mais rapidamente em relação às que permanecem constantemente com o mesmo teor de água (DELOUCHE, 1968; POPINIGIS, 1985; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Assim, VICENTE (1994), diz haver relação entre as perdas na lavoura e o teor de água e que as perdas são menores na medida em que os grãos colhidos com teor de água mais elevado permanecem menos tempo na lavoura e, portanto, menos sujeitos ao ataque de insetos e fungos.

UFCG - BIBLIOTECA

POPINIGIS (1985) afirma que o conhecimento do teor de água das sementes durante a maturação é de vital importância no planejamento da colheita. e que o tempo necessário para que o teor de água das sementes diminua de 80% para um nível entre 14 e 20%, varia de acordo com as espécies. Segundo dados obtidos por DELOUCHE (1968), em algodão o período para que o teor de água diminua de 80% b.u. (maturação fisiológica) para 15-20% b.u. (maturação comercial) é de aproximadamente 50 dias, enquanto a soja leva, após sua maturação fisiológica, 70 dias para reduzir o teor de água a 20% b.u.

2.2 Qualidade fisiológica das sementes

A qualidade de semente é o somatório de todos os atributos genéticos, físico, fisiológicos e sanitários, que afetam a sua capacidade em originar planta de alta produtividade.

ALMEIDA et al.(1999), relatam que o primeiro atributo da qualidade fisiológica a ser considerado em um lote de sementes é a porcentagem de germinação, que representa a capacidade da semente em originar uma plântula

normal; assim, toda semente destinada ao plantio deverá ser beneficiada e conservada durante o período de armazenamento, até o momento de sua utilização, para garantir a preservação da germinação e do vigor.

As pesquisas realizadas por (LIMA et al., 1999; CALVALCANTI MATA et al., 1999 e SOUSA et al.,1999) revelaram que a germinação e o vigor são influenciados pelo armazenamento, ocorrendo perda mais acentuada ao longo do período de armazenagem.

VIEIRA e CARVALHO (1994) afirmam que altura ou comprimento da planta visa determinar o vigor relativo de um lote de sementes que produzem plantas com maiores valores de comprimento médio da parte.

A qualidade fisiológica está relacionada à capacidade da semente desempenhar funções vitais, como germinação, vigor e longevidade. Os efeitos sobre a qualidade fisiológica geralmente são traduzidos pelo decréscimo na porcentagem de germinação, no aumento de plântulas anormais e pela redução do vigor da plântula (PUZZI, 1996).

A germinação é um processo que se caracteriza pelas atividades desenvolvidas na semente pelo embrião. O ciclo dessas transformações se inicia com o plantio e se finda quando a planta emerge. A germinação é, ainda, entendida por (AZEVÊDO, 2000), como um fenômeno pelo qual, sob condições ideais, o eixo embrionário dá prosseguimento ao seu desenvolvimento, que tem sido interrompido por ocasião da maturidade fisiológica.

Segundo (POPINIGIS, 1985), os processos fisiológicos do crescimento do embrião exigem atividades metabólicas aceleradas e a fase inicial de germinação consiste na ativação desses processos pelo aumento do teor de água e da atividade respiratória da semente.

Para que o processo de germinação ocorra, determinadas condições devem ser satisfeitas: a semente deve ser viável, estar livre do processo de dormência e as condições ambientais (água, temperatura, luz e oxigênio) devem serem favoráveis (POPINIGIS, 1985; MARCOS FILHO, 1986; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; e BRASIL, 1992).

Em suas maturações fisiológicas das sementes em estudos por SKAI, 1975, informa que a habilidade uma semente de manter a capacidade germinativa depende, antes de tudo, da estrutura da camada envolvente, da casca e da natureza da substância nela contida. As sementes oleaginosas não resistem tanto quanto aquelas em cujo albúmen predomina o amido.

Toda semente destinada ao plantio deve ser cuidadosamente beneficiada e conservada durante o período de armazenamento, até o momento de sua utilização, para garantir a preservação da qualidade fisiológica (DELOUCHE e POTTS, 1968; PELEGRINI, 1982). Sobre o assunto, POPINIGIS (1985), adverte que a qualidade da semente não melhora durante o armazenamento, razão por que, ao ser colocada no armazém, a qualidade inicial é ator fundamental na conservação da germinação e do vigor.

MARTINS NETO (1994) determinou que o teste padrão de germinação é a análise mais comum e freqüente para a determinação da qualidade fisiológica de sementes, cujo procedimento é padronizado, a que o torna a mais importante informação para fins de comercialização de sementes, mas apesar desse teste ser universalmente usado e aceito como teste de qualidade das sementes, muitos pesquisadores, entre eles (ROOS 1981 e POPONIGIS 1985), relatam que referido teste se tem mostrado insatisfatório para avaliar a qualidade fisiológica das sementes, enquanto (DELOUCHE 1968) atribuem a inadequação a das causas principais: ao teste de germinação, que é refinado e realizado de maneira a se obter o máximo de germinação, fornecendo às sementes as condições ideais de temperatura e de teor de água, contribuindo para que as sementes fracas, não vigorosas, participem do percentual final de germinação; e pelo fato de, dificilmente, existir igualdade entre os valores de germinação obtidos em laboratório e as plântulas emersas em campo, pois no campo as condições normalmente são adversas, em maior ou menor teor de água.

BRASIL (1992) relata que estudos sobre a germinação e os métodos de análise em laboratórios, efetuados sob condições controladas, são conduzidos no sentido de se obter uma germinação mais completa dos diversos tipos de

UFCG - BIBLIOTECA

semente; entretanto, algumas espécies apresentam o fenômeno da dormência, não permitindo uma expressão completa de sua germinação potencial.

ALMEIDA (1997) armazenando sementes de algodão sob diferentes condições controladas de temperatura (20, 30 e 40°C) e umidades relativas (26, 29, 50, 72 e 91%), pelo tempo de 150 dias, verificou perda de germinação em todas as condições durante o período de armazenamento e, também, que a redução mais acentuada se direcionou para a maior umidade relativa (91%) sendo as temperaturas de 20 e 30°C e umidades relativas entre 50 e 70%, condições em que as viabilidades das sementes apresentam, em valor absoluto, a menor redução de germinação, alem do que, para todas as faixas de umidade relativas estudadas, quanto menor a temperatura, menor também a queda de germinação e vigor das sementes.

GOMES (1992) quando armazenou sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. *r. latifolium* Hutch) acondicionadas em três tipos de embalagem e conservadas em câmara seca (10°C e 35%UR) ou sob condições ambientais de Campina Grande, PB, verificou que a germinação e o vigor diminuíram com o aumento de teor de água dessas sementes.

Estudando o efeito do processo de secagem, o teor de água e tipos de conservação de sementes nabo forrageira (CROCHEMORE et al., 1994) verificaram que a qualidade fisiológica dessas sementes durante o armazenamento, foi mais afetada quando aumentou o teor de água.

PATRIATA (1996) avaliando a qualidade fisiológica das sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. *r. latifolium Hutch*) armazenadas em função de diferente teor de água, constatou que a germinação e o vigor dessas sementes decresceram significativamente ao longo dos 280 dias do armazenamento.

UFCG - BIBLIOTECA

2.3 Vigor

Reconhece-seque, embora o conceito de vigor tenha sido estabelecido há alguns anos, nenhuma definição até hoje proposta foi universalmente aceita

existindo, portanto, variados conceitos (MARCOS FILHO 1997; ALMEIDA 1987 e POPINIGIS 1985).

De acordo com (MOURA 1997) vigor é a capacidade que possui uma semente para se desenvolver e formar plântula normal, mesmo em condições que não satisfatoriamente ideais, como as que ocorrem comumente no campo.

Considera-se vigor a soma total das propriedades da semente, que determinam o nível potencial de atividade e o seu desempenho ou lote de semente, durante a germinação e emergência da plântula. As sementes que apresentam bom desempenho são chamadas "vigorosas", enquanto as que mostram fraco desempenho, são as "sementes de baixo vigor" PERRY (1977).

DELOUCHE (1968) afirmou que vigor e deterioração estão intimamente ligados, pois o ponto de máximo vigor da semente é o de mínima deterioração sendo que deterioração inclui toda e qualquer mudança degenerativa e irreversível na qualidade, após a semente ter atingido o nível máximo de qualidade.

LIN (1982) ressalta que o vigor das sementes varia com a espécie e, dentro de uma mesma espécie, algumas cultivares são mais ou menos vigorosas que outras. Lotes diferentes de sementes de uma mesma cultivar poderão ter níveis de vigor diferentes.

As regras para análise de sementes BRASIL (1992) referem-se aos testes de vigor baseados na avaliação das plântulas, realizados em laboratório sob condições controladas ou em condições de campo. Os testes de laboratório são instalados, em sua maioria, nas mesmas condições e metodologia do teste padrão de germinação.

O vigor deve ser analisado sob dois aspectos: quanto á susceptibilidade em condições desfavoráveis de campo e velocidade de germinação e crescimento das plantas. Igualmente, deduz-se que os testes de vigor podem ser classificados em diretos e indiretos, em que os diretos simulam, em laboratório, as condições desfavoráveis de campo, mas apresentam, como desvantagens, as grandes variações entre os resultados obtidos em diversos laboratórios ou em um mesmo

laboratório por outro lado, a padronização é dificultada pela necessidade de simular condições adversas diferentes para a mesma cultura, enquanto os indiretos medem certos atributos fisiológicos da semente. Os autores afirmam, ainda, que esses testes possibilitam o controle de variáveis, permitindo que se reproduzam os resultados; a desvantagem reside na impossibilidade de se avaliar simultaneamente todos os fatores de vigor, particularmente injúrias e anomalias morfológicas (DELOUCHE e CALDWELL 1960).

Para a (ISTA, 1981): "vigor de semente é a soma daquelas propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho de uma semente ou de um lote de sementes durante a germinação e a emergência de plântulas" e, para (AOSA, 1983) "vigor de sementes compreende as propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla faixa de condições ambientais".

UFCG - BIBLIOTECA

2.4. Germoplasma

A erosão genética causada pela destruição de habitats, pela seleção natural e pelos agentes bióticos, vem aumentando o interesse pela conservação de germoplasma vegetal. O aumento da ameaça à diversidade das plantas está associado à perda dos habitats pela expansão das atividades da agricultura e pecuária, à exploração predatória e à exigência de mais terras para a moradia, indústria e estradas (SANTOS, 2000).

O germoplasma é o elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade genética entre e dentro da espécie, com fins de utilização para a pesquisa da biotecnologia (TOWILL, 1984).

Atualmente, germoplasma vegetal está atraindo a atenção dos governantes de muitos países. A conservação e a caracterização de germoplasma são, hoje, um trabalho de alta prioridade nesses países. Durante anos, considerou-se o solo, a água e o ar como recursos naturais essenciais. Recentemente, adicionou-se o germoplasma como o quarto recurso natural essencial (YAMADA, 1993).

O germoplasma contém os genes que dirigem o desenvolvimento de qualquer ser vivo e constituem a base física da herança biológica. É da combinação de genes que surgem as diversidades genéticas que, por sua vez, têm sido a base do melhoramento de culturas no passado, presente e futuro (YAMADA, 1993).

Essas coleções devem possuir acessos bem caracterizados, permitindo ao pesquisador conhecer a real variabilidade e potencialidade dos genótipos que, posteriormente, atenderão aos vários segmentos demandados pela pesquisa (SANTOS et al., 2000).

Com o objetivo de se oferecer um apoio adequado à demanda atual e futura por germoplasma, as atividades de recursos genéticos devem ser direcionadas para manter disponível o máximo da diversidade genética apresentada pelos conjuntos gênicos, embora seja necessário que, para atender às solicitações de germoplasma, alguns acessos sejam previamente submetidos a procedimentos de multiplicação (MOURA, 1997; MOORE, 1972 DINIZ ,1999; DUTRA, 1997; PREVEIRO, 1998; EIRA, 2004). Esses autores consideram que a conservação da variação genética dos acessos mantidos fora do seu ambiente natural em coleções de germoplasma "*ex situ*", representa um permanente desafio para evitar alterações genéticas na amostra populacional submetida a paralisação ou "congelamento" do processo evolutivo, que atuava sobre a população no momento da amostragem.

UFCG - BIBLIOTECA

2.5. Crioconservação

A crioconservação é um método eficiente e prático para a conservação dos recursos filogenéticos. MEDEIROS e CAVALLARI (1992) definem crioconservação como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre - 170 e - 196 °C) em que, sob essa temperatura, todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente proporcionando, conseqüentemente, preservação indefinida. Outros autores acrescentam que a crioconservação está sendo um método potencialmente estudado para reduzir a taxa de deterioração aumentando, assim, o tempo de armazenamento das

sementes, assegurando a preservação das fontes genéticas da planta, além de reduzir os custos e a perda da viabilidade (STANWOOD e BASS, 1981; STANWOOD e ROSS, 1979; STANWOOD, 1985). Pesquisas indicam que a conservação pode ser usada para espécies de sementes de importância agronômica (STANWOOD, 1980, 1985, 1987).

De acordo com o Internacional Board for Plant Genetic Resources – IBPGR (1991) a crioconservação é uma tecnologia indicada para as espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes, germoplasma raras ou mesmo ameaçadas de extinção.

A conservação dos recursos fitogenéticos se transforma no instrumento maior na preservação de espécies ameaçadas de extinção e espécies de plantas silvestres. IRIONDO et al. (1992) analisaram a influência da conservação em nitrogênio líquido em diversas espécies de plantas silvestres, com teores de água e tempo de exposições diferentes, e os resultados não indicaram diferenças significativas na maioria das espécies em relação ao percentual de germinação, seja nas amostras de sementes com teores de água diferentes ou, nas amostras de sementes com diferente tempo de exposição ao nitrogênio líquido.

A técnica de crioconservação, além de armazenar sementes por tempo indeterminado, sem perda da viabilidade, é de grande potencial no armazenamento de sementes ortodoxas e sementes recalcitrantes (STANWOOD, 1985) e de embriões de sementes recalcitrantes (PENCE, 1991).

Sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All. Engl.) foram crioconservadas após dessecamento em câmara de secagem a 25 °C e 10 - 15% UR, durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas; após a secagem, as sementes de cada amostra foram acondicionadas em embalagens herméticas e imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 15 dias. Os testes de germinação não indicaram redução quando crioconservadas a 6% de teor de água (MEDEIROS, 1992).

Segundo (ROBERTS, 1973; TOLETO, 1977), existem ainda as sementes recalcitrantes, que perdem a viabilidade quando são desidratadas, dificultando sua conservação. Sementes de chá são recalcitrantes e muito difíceis de serem armazenadas em nitrogênio líquido, devido ao seu alto teor de água; elas também

UFCG/BIBLIOTECA

são sensíveis à secagem e os percentuais de germinação diminuem rapidamente quando secadas a valores abaixo de 50% b.u. Os autores observaram, também, que as sementes, quando secadas até o teor de 20% b.u., não sobreviveram ao serem imersas em nitrogênio líquido; entretanto, constataram sobrevivência quando as sementes foram cortadas no seu eixo embrionário, secadas entre 15 e 30% b.u. e imersas em nitrogênio líquido. Sementes de café (*Coffea liberica* Bull ex Hiem) podem ser crioconservadas com sucesso depois de atingirem o teor de água de 16,7% b.u. apresentando 53,3% de sobrevivência, enquanto que embriões têm de sobrevivem 83 - 86% depois de crioconservados a um teor de água entre 15 - 20% b.u. Sementes de café com endocarpo sobreviveram melhor que aquelas sem endocarpo. Sementes de feijão (*Vigna sesquipedalis* L.), entretanto, mostraram características normais às sementes ortodoxas e ambos, sementes e embriões cortados, sobreviveram em torno de 90% a crioconservação, com teor de água de aproximadamente 9% no intervalo de 6,7 a 10,5% b.u. respectivamente GERMANO (1997).

Sementes de *Populus deltoides* foram analisadas por (PENCE, 1991; KARUNKI, 1991; GONZOLEZ-BENTO, 1995) para verificar a possibilidade de secagem em fluxo laminar e armazenamento a temperaturas de 4 °C, -20 °C e em nitrogênio líquido. A capacidade de germinação foi mantida quando armazenada a -20 °C, porém a capacidade diminuiu entre 40 e 70% quando as sementes foram armazenadas a 4 °C; tais resultados sugerem que o armazenamento a -20 °C ou em nitrogênio líquido poderia ser usado para armazenamento em banco de germoplasma de sementes de *Populus.*

GONZÁLEZ BENITO et al., (1998) estudaram a viabilidade de sementes crioconservadas de algodão *Gossypium hisutum* L. (CNPA 4M, CNPA 5M, CNPA Precoce 2 e Coker 312), como método de conservação do patrimônio genético, na em que sementes foram submetidas a dessecação e/ou imersão em nitrogênio líquido. A germinação não foi afetada por nenhum dos tratamentos nas cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 2, mas aumentada depois de imersão em nitrogênio líquido.

UFCG - BIBLIOTECA

Com o efeito da crioconservação sobre 10 espécies de leguminosas de interesse econômico, por ALMEIDA et al. (2000) concluiu-se que, antes de se generalizar o uso da crioconservação em sementes de leguminosas, deve-se avaliar, nas diferentes espécies e cultivares, o efeito de possíveis alterações anatômicas sobre a viabilidade e o vigor das sementes e que para a crioconservação em sementes de leguminosas é oportuno avaliar também, as diferentes espécies e cultivares, o efeito de prováveis alterações anatômicas sobre a viabilidade e o vigor das sementes, visto que a crioconservação se apresenta como boa alternativa para a conservação das sementes de *Lahyrus cicera*, L. *sativus*, *Lens culinartis*, *Lupinus olbus*, *Phaseolus vulgaros*, *Pisum sativum* , *Viça articulatas*, *V. faba*, *V. monanthos* e *V. sativa*.

Relatam que STANWOOD e ROSS, (1979), submetendo sementes de hortaliças e de flores à emersão em nitrogênio líquido durante 7, 30 e 180 dias, verificaram ausência de efeito prejudicial a germinação e ao vigor das sementes, e apontaram o nitrogênio líquido como meio promissor para conservação de sementes a longo prazo.

UFCG - BIBLIOTECA

3- Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, Campus I, em Campina Grande, PB, em conjunto com o Laboratório de Sementes do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPA/Embrapa).

Utilizaram-se sementes deslintadas das cultivares de algodoeiro BRS-Verde (V_1), BRS-200-Marrom (V_2), BRS-187-8H-Branco (V_3) e 6M-Mocó-Branco (V_4). As sementes de algodão foram deslintados quimicamente, utilizando-se 7 kg de semente por litro de ácido sulfúrico, durante 5 minutos, seguido de uma lavagem em água corrente, neutralização com soda cáustica a 3% e secagem natural, de acordo com PATRIOTA (1996).

UFCG - BIBLIOTECA

3.1 Determinação do teor de água limite para crioconservação (TALC)

Para determinação do teor de água das sementes utilizou-se o método padrão da estufa a 105 ± 3°C, por 24 horas e, para esta determinação quatro subamostras de 50g de sementes por tratamento, para caracterização de uma amostra média. As sementes foram pesadas e acondicionadas em recipientes metálicos e colocadas em estufa, onde permaneceram durante 24h; depois desse período, os recipientes foram tampados, retirados da estufa resfriados em um dessecador durante 15 minutos e submetidas a nova pesagem. A percentagem do teor de água foi calculada com base no seu peso, segundo as regras para análise de sementes (BRASIL, 1992).

$$TA\ (\%bu) = \frac{Pi - Pf}{Pi} \cdot 100\% =$$

em que:

Pi = peso inicial da amostra (gramas)

Pf = peso final da amostra (gramas)

%TA (b.u).= teor de água, base úmida

Para obtenção de sementes com diferentes caracterizações do teor de água, as sementes foram submetidas ao processo de hidratação ou secagem, até se alcançar os teores de água estabelecidos para a determinação do teor de água limite TALC de (4, 6, 8, 10, 12 e 14%b.u). A perda ou ganho de água pelas sementes foi determinado por meio da fórmula recomendada pelas regras para análise de sementes (BRASIL, 1992).

$$Pf = Pi \times \frac{100 - TAi}{100 - TAf}$$

em que:

Pf = peso final da mostra (grama)

Pi = peso inicial da amostra (grama)

TAi = teor de água inicial das sementes (%b.u.)

TAf = Teor de água desejada das sementes (%b.u)

3.1.1 Secagem das sementes

Para a secagem das sementes, as amostras foram colocadas em um secador que continha o agente dessecante, sílica gel, e pesadas a cada 24 horas, até que atingissem os pesos referentes aos teores de água desejados; para este fim utilizou-se uma balança eletrônica, modelo Mettler PC 440, com precisão de 0,001g.

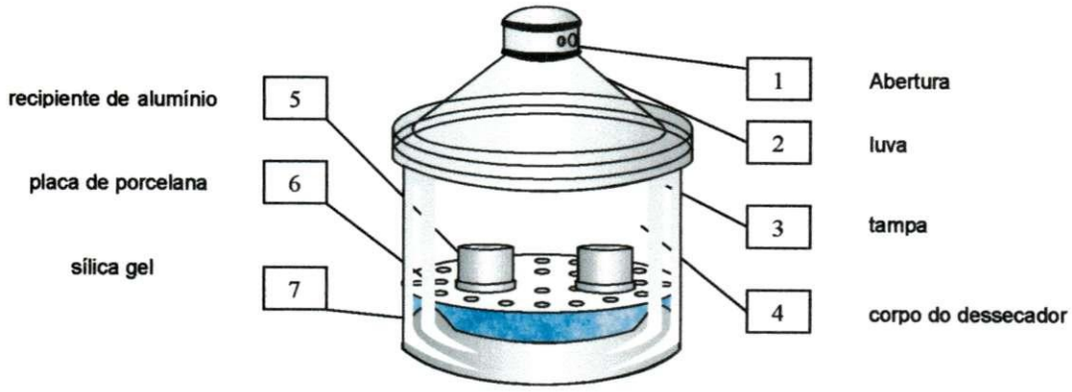


FIGURA 1. Dessecador utilizado na secagem das sementes de algodão

3.1.2 Umedecimento das sementes

Para umedecimento das sementes, colocaram-se as amostras em pequenas cestas de arame, suspensas por um anel de PVC, no interior de recipientes de vidro, hermeticamente fechados, contendo água destilada; posteriormente, os recipientes foram colocadas em uma câmara B.O.D regulada a 10ºC. Essas cestas com as amostras foram pesadas a cada 24 horas, utilizando-se uma balança eletrônica modelo Mettler PC 440, com precisão de 0,001g, até que atingissem os pesos referentes aos teores de água desejados.

UFCG - BIBLIOTECA

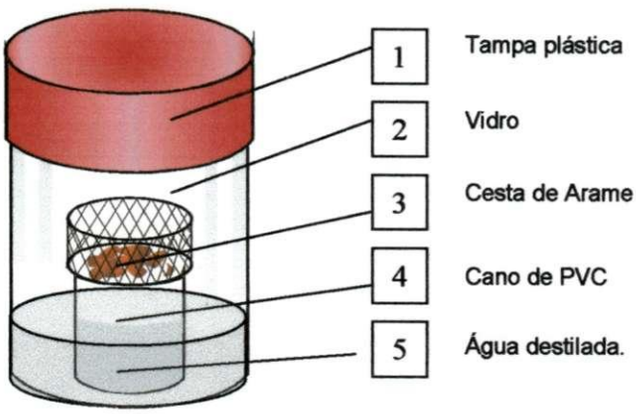


FIGURA 2. Recipiente hermético utilizado para umedecimento das sementes de algodão

Em seguida, sementes com os teores de água desejados foram colocadas dentro de canister e mantidas em botijões criobiológicos (Figura 1) durante 05 dias.

UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 3. A) Botijão criobiológico, utilizado em processo criogênico;B) Botijão com canister padrão, em aço inoxidável

O botijão criobiológico utilizado se constitui na verdade de dois recipientes, um dentro do outro, unidos por um gargalo de fibra de vidro especial, para baixas temperaturas e alto vácuo. Os espaços entre os recipientes contêm materiais isolantes submetidos a alto vácuo. O isolamento térmico confere, ao botijão, a capacidade de manter o nitrogênio no estado líquido (-196°C), baixas perdas por evaporação viabilizando-se assim, a estocagem e o transporte de material biológico vivo, por longos períodos, de forma econômica.

Após 5 dias de crioconservadas, as sementes foram submetidas ao descongelamento, a temperatura ambiente de 23 °C, durante 12 horas; logo em

seguida, realizaram-se os testes de germinação e vigor, através das as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Feitas as avaliações desses testes, determinou-se o melhor teor de água em que as sementes poderiam ser crioconservadas, ou seja, o teor de água limite para crioconservação (TALC).

3.2 Análise da qualidade fisiológica

3.2.1 Crioconservação das sementes

As sementes de algodoeiro, após estabelecido o melhor teor de água limite foram destinados para crioconservação em nitrogênio líquido fora, a -196°C, e no vapor de nitrogênio a -170°C, por 5, 30, 60 e 90 dias; depois de decorridos esses períodos, as sementes foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas ao teste padrão de germinação e ao de vigor; para este foram utilizados dois parâmetros: a) o peso da matéria seca e b) o comprimento de plântula.

3.2.2 Teste de germinação

Após crioconservadas e descongeladas de acordo com cada tratamento, as sementes de algodoeiro foram submetidas ao teste de germinação; para tanto, quatro repetições de 50 sementes por tratamento foram distribuídas sobre duas folhas de papel *germitest* e cobertas por uma terceira folha, ambas umedecidas com volume de água, na proporção de duas vezes e meia o peso do papel. Os rolos foram acondicionados em germinador, marca De Leo, regulado para manter a temperatura de 23°C, durante todo o teste, e a) avaliações efetuadas, a partir do quarto dia, até o décimo segundo dia após a semeadura. O percentual de

germinação foi determinado conforme prescrição das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

3.2.3 Teste de vigor

Os testes de vigor foram realizados através do teste padrão de germinação, comprimento de plântula e de peso de matéria seca.

Fez-se a determinação de peso seco das plântulas considerado normal de cada repetição retirando-as do substrato e colocando-as em sacos de papel que, separadas por tratamento e repetições, foram postas para secar em estufa a 80±3°C, por 24 horas; depois deste período, foram retiradas da estufa e colocadas para resfriar em dessecador, durante 15 minutos e, logo após, pesadas em balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g. O peso seco foi calculado através da fórmula proposta por VIEIRA e CARVALHO (1994).

A avaliação do comprimento de plântula normal foi realizada no quarto dia após instalação do teste de germinação, cujos resultados foram expressos em centímetros (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

3.3 Análise estatística

Para a determinação do teor de água limite para crioconservação (TALC) o delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualisado, com arranjo

fatorial representado por quatro cultivares x duas temperaturas de crioconservação x seis teores de água, empregando-se quatro repetições por tratamento. Procedeu-se á análise de variância e comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey. Desdobraram-se os graus de liberdade do fator temperatura em parâmetros de regressão polinomial.

Para a crioconservação empregou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo, com quatro repetições, sendo a parcela representada pela interação (quatro cultivares x duas temperaturas de armazenamento) e a subparcela pelos quatro períodos de armazenamento. As variáveis que caracterizavam a qualidade fisiológica das sementes foram submetidas a análise de variância com as médias dos fatores qualitativos comparados pelo teste de Tukey. Realizou-se o desdobramento dos graus de liberdade do fator quantitativo, e/ou sua interação, em parâmetros de regressão polinomial, utilizando-se o software para análise estatística SAEG (1993).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor de água limite para crioconservação – TALC

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da germinação e vigor para as quatro cultivares (BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco), com teores de água de 4, 6, 8, 10, 12 e 14%b.u, quando submetidas a temperatura ambiente a 23°C e a temperatura criogênica a -196°C, durante 5 dias,com a finalidade de determinar o teor de água limite para sua crioconservação (TALC). De acordo com a Tabela 2 observar-se que não houve diferenças significativas entre as cultivares, exceto para o teste de vigor - comprimento de plântulas, mas, entre o teor de água estudados e as temperaturas de conservação por 5 dias, constataram-se diferenças significativas.

Na Tabela 2 tem-se ainda, efeitos significativos para a interação dupla, sendo que, para a germinação das sementes, o efeito significativo se dá na interação tempo x teor de água e, para o vigor, os efeitos significativos ocorrem para todas as interações duplas, exceto para o vigor expresso em peso da matéria seca, na interação temperatura x cultivares.

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 1. Valores de germinação e vigor das quatro cultivares de algodoeiro de pluma colorida e branca tradicional, com seis teor de água, a duas temperaturas

Germinação (%) durante 5 dias								
Teor de Água	**BRS-VERDE**		**BRS-200-Marrom**		**6M-MOCÓ-Branco**		**BRS-187-8H-Branco**	
	23°C	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**
4	90,00	97,75	91,00	91,50	93,00	95,25	92,25	97,75
6	95,00	98,75	96,00	96,25	95,50	98,75	96,50	96,25
8	97,00	93,25	97,00	93,75	92,75	91,75	97,00	93,25
10	89,25	90,25	86,50	90,55	86,75	81,00	89,25	90,25
12	75,75	66,25	75,75	66,25	71,25	65,25	73,50	69,00
14	56,00	43,50	58,00	50,00	50,75	42,25	63,50	55,25

Vigor - comprimento de plântulas (cm)								
Teor de Água	**BRS-Verde**		**BRS-200-Marrom**		**6M-MOCÓ-Branco**		**BRS-187-8H-Branco**	
	23°C	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**
4	20,50	20,50	19,65	20,50	20,25	20,50	18,22	20,55
6	18,72	11,97	18,97	16,20	19,00	20,77	17,72	14,47
8	16,72	12,22	11,87	15,85	11,22	13,72	13,22	16,47
10	14,45	12,22	13,25	12,05	10,85	11,55	14,25	16,25
12	12,50	10,87	10,47	9,42	9,90	5,42	16,72	8,77
14	6,72	6,00	5,12	2,45	3,57	3,32	4,12	2,82

Vigor – peso da matéria seca (g)								
Teor de Água	**BRS-Verde**		**BRS-200-Marrom**		**6M-MOCÓ-Branco**		**BRS-187-8H-Branco**	
	23°C	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**	**23°C**	**-196°C**
4	11,97	12,30	10,90	12,25	12,45	10,25	12,25	10,27
6	11,97	11,72	13,72	13,72	13,72	13,72	12,95	13,72
8	12,15	10,72	13,80	10,82	12,00	9,25	12,52	12,22
10	12,22	12,75	10,47	10,22	13,22	10,25	10,47	12,22
12	10,87	9,62	12,62	9,12	10,65	10,62	12,62	8,62
14	9,75	6,00	8,75	2,75	10,05	5,75	9,00	3,35

TABELA 2 . Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) da germinação e vigor (peso da matéria seca - PMS e comprimento de plântula-CP) de sementes de algodoeiro submetidas ao armazenamento, em diferentes condições, durante cinco dias

Fonte		Quadrado Médio		
		Germinação	Vigor	
De variação	GL		CP	PMS
Cultivares (C)	3	70,72^{ns}	9,46**	0,68^{ns}
Teor de água (Ta)	5	10937,07**	480,85**	143,47**
Temperaturas (T)	1	523,39**	34,58**	125,79**
T x C	3	31,42^{ns}	15,17**	2,25^{ns}
Ta x C	**15**	26,73^{ns}	8,99**	5,71**
T x Ta	**5**	187,99**	16,87**	27,57**
T X Ta X C	15	49,26^{ns}	5,91**	4,60**
Resíduo	144	27,70	1,50	1,92
CV%		6,40	11,34	12,72

** F Significativo a nível de 1% de probabilidade
^{NS}F Não significativo
Observando-se as diferenças estatísticas (P< 0,01)

Observa-se, nas Tabelas 3 a 6, que a germinação das sementes não diferiram significativamente entre si, quando estas foram crioconservadas com teor de água entre 4 e 10% b.u. para as quatro cultivares de sementes de algodão, e sementes com esses teores de água também não diferem significativamente entre si quando armazenadas a 23°C ou -196°C, por cinco dias. Verificou-se, neste trabalho, que sementes com teor de água de 12 e 14% b.u., quando armazenadas a temperaturas de 23°C iniciam o processo de aumento da taxa de respiração das sementes que provoca diminuição de sua germinação. Para esses mesmos teores de água as sementes crioconservadas a -196°C sofrem ação negativa, provocando perdas significativas de sua germinação e, em alguns casos essa perda é superior à das sementes armazenadas a 23°C, indicando haver uma ação negativa do frio a essa temperatura. Comportamento semelhante também foi observado por BATISTA et al. (2000) e ALMEIDA et al. (2000) que trabalharam com 10 leguminosas crioconservadas com teores de água entre 6 e 7% (b.u.).

Vários autores entre eles CROCHEMORE (1993); FELISMINO (1998); CORTETT (1999); CARVALHO e NAKAGAOWA (2000) e BRUNO et al. (2000) já constataram a relevante importância do teor de água na preservação da germinação e do vigor das sementes, fato que está diretamente relacionado com as condições de armazenamento.

TABELA 3. Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-Verde para a interação teor de água e temperaturas de conservação, por 5dias

Germinação (%) **BRS-Verde**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	90,00	a	B	97,75	a	A
6	95,00	a	A	98,75	a	A
8	97,00	a	A	93,25	a	A
10	89,25	a	A	90,25	a	A
12	75,75	b	A	66,25	b	B
14	56,00	c	A	43,50	c	B

$DMS_{colunas}$=10,6 DMS_{linhas}=7,2

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 4. Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-200-Marrom para a interação teor de água e temperaturas de conservação, por 5 dias

Germinação (%) **BRS-200-Marrom**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	91,00	a	A	91,50	a	A
6	96,50	a	A	96,25	a	A
8	97,00	a	A	93,25	a	A
10	86,50	a	A	90,55	a	A
12	75,75	b	A	66,25	b	B
14	58,00	c	A	50,00	c	B

$DMS_{colunas}$=10,6 DMS_{linhas}=7,2

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 5. Valores médios de germinação das sementes de algodão 6M-Mocó-Branco para a interação teor de água e temperaturas de conservação, por cinco dias e temperaturas de conservação por 5 dias

Germinação (%) 6M-Mocó-Branco		
Teor de Água	**23°C**	**-196°C**
4	93,00 a A	95,25 a A
6	95,50 a A	98,75 a A
8	92,75 a A	91,75 a A
10	86,75 a A	81,00 b A
12	71,25 b A	65,25 c A
14	50,75 c A	42,25 d B
$DMS_{colunas}$=10,6 DMS_{linhas}=7,2		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 6. Valores médios de germinação das sementes de algodão BRS-187-8H-Branco para a interação teor de água e temperaturas de conservação, por cinco dias

Germinação (%) **BRS-187-8H-Branco**		
Teor de Água	**23°C**	**-196°C**
4	92,25 a B	97,50 a A
6	96,50 a A	96,25 a A
8	97,00 a A	93,25 a A
10	89,25 a A	90,25 a A
12	75,75 b A	68,75 b B
14	63,50 c A	33,75 c B
$DMS_{colunas}$=10,6 DMS_{linhas}=7,2		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com relação ao vigor das sementes de algodão das diferentes cultivares, expresso em comprimento de plântula e em peso da matéria seca das sementes observa-se, nas Tabelas 7 a 14 que, de maneira geral, nas sementes das diversas variedades o maior comprimento das plântulas e peso da matéria seca das sementes se situam em sementes com teor de água entre 4 e 8% b.u. e, em alguns casos, quando se comparam as sementes armazenadas a temperatura ambiente com as sementes crioconservadas a -196°C, por cinco dias, essas sementes diferem significativamente a determinado teor de água e, para outro teor de água, essa diferença não é significativa.

Como na germinação os melhores percentuais foram encontrados entre 6 e 8% b.u. fez-se opção, portanto, em considerar que o teor de água ideal para a crioconservação das sementes de algodão branco e algodão colorido seria de 6%b.u, pois as sementes com este teor de água se comportaram bem, tanto na germinação como no vigor.

TABELA 7- Valores médios de vigor, de comprimento de plântula, das sementes de algodão da cultivar BRS-Verde, com os seis teores de água, em duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Comprimento de plântula (cm) **BRS-Verde**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	20,50	a	A	20,50	a	A
6	18,72	ab	A	11,97	b	B
8	16,72	bc	A	12,22	b	B
10	14,45	cd	A	12,22	b	B
12	12,50	d	A	10,87	b	B
14	6,72	e	A	6,00	c	A
DMS $_{colunas}$=2,9	**DMS $_{linhas}$= 2,0**					

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 8. Valores médios de vigor medido por comprimento de plântula, das sementes de algodão da cultivar BRS-200-Marrom, com os seis teores de água, a duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Comprimento de plântula (cm) **BRS-200-Marrom**		
Teor de Água	**23ºC**	**-196ºC**
4	19,65 a A	20,50 a A
6	18,97 a A	16,20 b B
8	11,87 b B	15,85 b A
10	13,25 b A	12,05 c A
12	10,47 b A	9,42 c A
14	5,12 c A	2,45 d B
DMS $_{colunas}$=2,9 DMS $_{linhas}$= 2,0		

Médias seguidas, pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 9. Valores médios de vigor comprimento de plântula, das sementes de algodão da cultivar 6M-Mocó-Branco, com os seis teor de água, a duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Comprimento de plântula (cm) **6M-Mocó-Branco**		
Teor de Água	**23ºC**	**-196ºC**
4	20,70 a A	20,50 a A
6	19,00 a A	20,77 a A
8	11,22 b B	13,72 b A
10	10,85 b A	11,55 b A
12	9,90 b A	5,42 c B
14	3,57 c A	3,32 c A
DMS $_{colunas}$=2,9 DMS $_{linhas}$= 2,0		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 10- Valores médios de vigor medido por comprimento de plântula, das sementes de algodão da cultivar BRS-187-8H-Branco, com os seis teores de água, em duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Comprimento de plântula (cm) **BRS-187-8H-Branco**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	18,22	a	B	20,55	a	A
6	17,72	a	A	14,47	b	B
8	13,22	c	B	16,47	b	A
10	14,25	bc	A	16,25	b	A
12	16,72	ab	A	8,77	c	B
14	4,12	d	A	2,82	d	A

DMS $_{colunas}$=2,9 DMS $_{linhas}$= 2,0

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 11- Valores médios de vigor, medido pelo peso da matéria seca, de cultivar BRS-Verde com os seis teor de água, em duas temperaturas

Peso da matéria seca (g) **BRS-Verde**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	11,97	a	A	12,30	a	A
6	11,97	a	A	11,72	a	A
8	12,15	a	A	10,72	a	A
10	12,22	a	A	12,75	a	A
12	10,87	a	A	9,62	a	A
14	9,75	a	A	6,00	b	A

DMS $_{colunas}$=2,7 DMS $_{linhas}$= 1,9

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 12- Valores médios de vigor medido pelo peso da matéria seca, de cultivar BRS-200 de algodoeiro, com os seis teor de água, em duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Peso da matéria seca (g) **BRS-200-marrom**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	10,90	bc	A	12,25	ab	A
6	13,72	a	A	10,82	a	B
8	10,47	a	A	10,22	bc	A
10	10,47	bc	A	10,22	bc	A
12	12,62	a b	A	9,12	c	B
14	8,75	c	A	2,75	d	B
DMS $_{colunas}$=2,7	**DMS $_{linhas}$= 1,9**					

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 13- Valores médios de vigor, medido pelo peso da matéria seca, da cultivar 6M-Mocó-Branco de algodoeiro, os seis teores de água, em duas temperaturas, após cinco dias

Peso da matéria seca (g) **6M- Mocó-Branco**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	12,00	abc	B	9,27	b	A
6	10,62	a	A	10,72	a	A
8	12,00	abc	A	9,25	b	B
10	13,22	ab	A	10,25	b	A
12	10,65	bc	A	10,62	b	A
14	10,05	c	A	5,75	c	B
DMS $_{colunas}$=2,7	**DMS $_{linhas}$= 1,9**					

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 14. Valores médios de vigor, medido pelo peso da matéria seca, da cultivar BRS-187-8H-Branco e algodoeiro, os seis teor de água, em duas temperaturas, após 5 dias de conservação

Peso da matéria seca (g) **BRS-187-8H-Branco**						
Teor de Água	**23°C**			**-196°C**		
4	12,25	a	A	10,27	bc	B
6	12,95	a	A	13,72	a	A
8	12,52	a	A	12,22	ab	A
10	10,47	a	A	12,22	ab	A
12	12,62	ab	A	8,62	c	B
14	9,00	b	A	3,35	d	B

DMS $_{colunas}$=2,7 DMS $_{linhas}$= 1,9

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

Na Figura 4 encontram-se as equações que representam as variações dos percentuais de germinação das sementes para os diferentes teor de água, das cultivares BRS-187-8H-Branco, BRS-200-Marrom, BRS-Verde, quando armazenadas a 23°C e -196°C por 5 dias.

Nessas Figuras se observa que, para as quatro cultivares armazenadas tanto a 23°C como a -196°C, o comportamento da germinação em função do teor de água é muito semelhante e os valores de germinação e o teor de água de 12% praticamente se superpõem, observando-se pequena dispersão entre as cultivares, a partir desse teor de água, fatoque permite sugerir que uma só equação possa representar a variação da germinação em função do teor de água para as quatro cultivares. Neste sentido, a Figura 5 foi construído a partir dos, pontos experimentais são plotados com sua dispersão e uma só equação é apresentada para a variação da germinação, enquanto função do teor de água para as quatro cultivares.

Constata-se, nas Figuras 4 e 5 que os coeficientes de determinação das equações se encontram no valor de 0,99, ou seja a equação representa satisfatoriamente os dados experimentais.

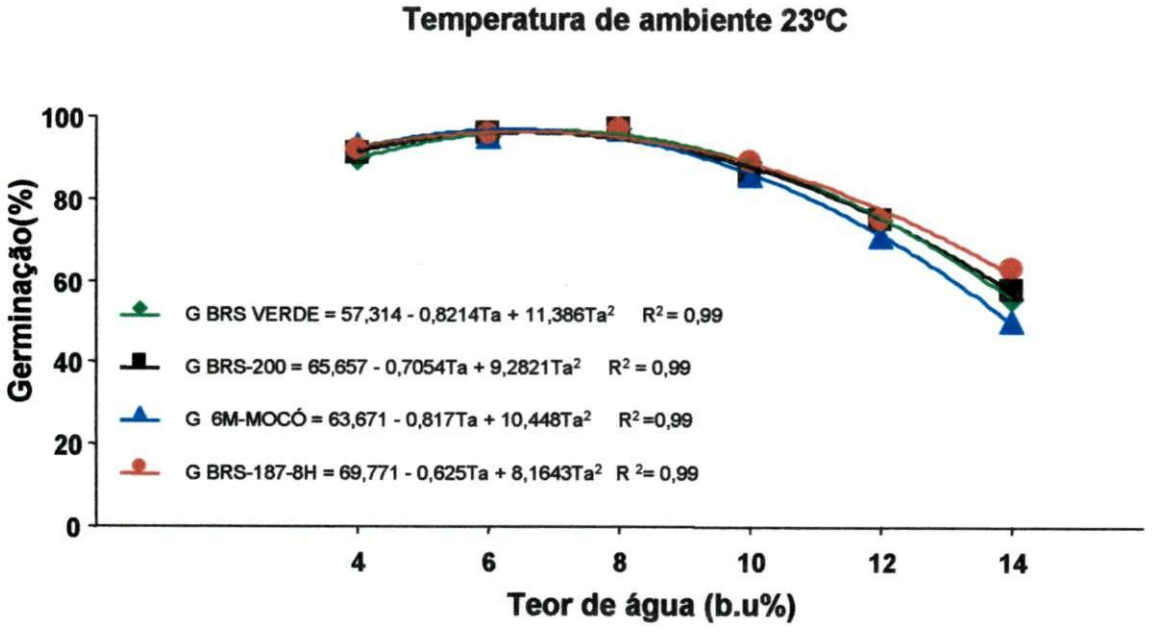
Neste trabalho fica evidente que existem comportamentos muito semelhantes entre as quatro cultivares de algodão, evidenciando-se que, quanto

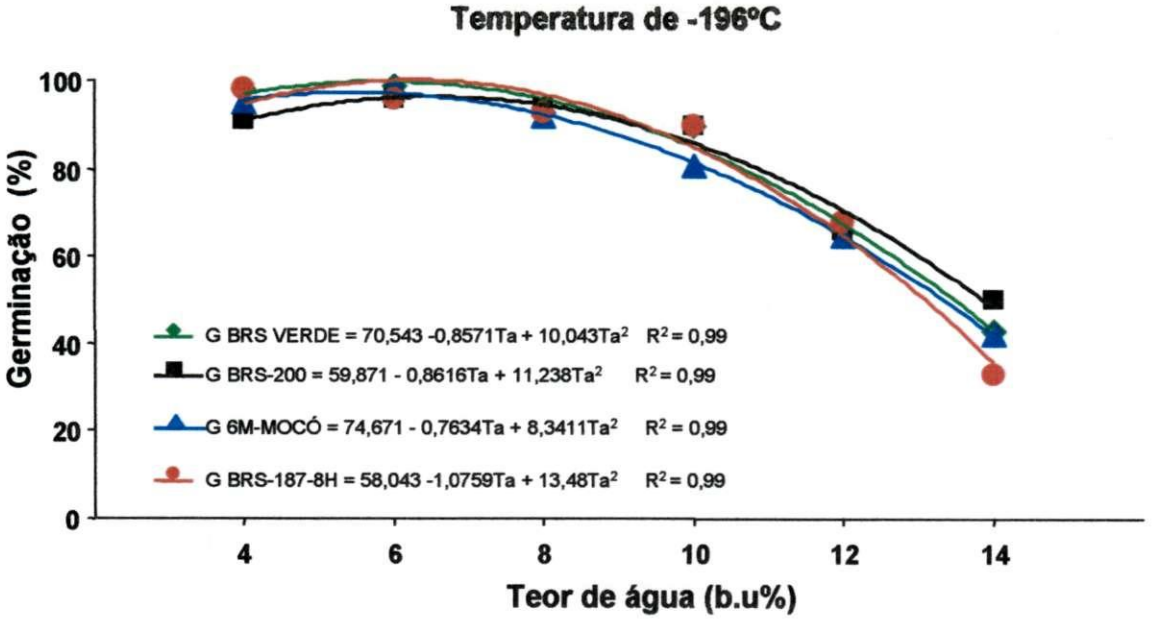
maior a quantidade do teor de água nas sementes, menor a sua germinação, para temperatura criogênica. Este fato com semente de alface, é afetado, visto que estas foram danificadas quando crioarmazenadas com mais de 18% de água em b.u., fato observado por (ROOS e STANWOOD, 1981). Igualmente se passou também com a crioconservação de sementes de *Sesamum indicum* com 12% de água (STANWOOD, 1987). Numa taxa de congelamento de 200 °C min^{-1}, a danificação das sementes de *Sesamum* se registra a um conteúdo de água inferior a 6% b.u, concluindo-se, portanto que a taxa de resfriamento pode interagir com o conteúdo de água da semente, afetando a será sobrevivência.

CHANDEL *et al.*, (1995) crioconservando sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) e jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) notaram que o melhor teor de água para a crioconservação foi de 14%b.u. e que, acima desse valor, as sementes perdem sua capacidade germinativa.

Neste trabalho valores de germinação em ambas ascondições de armazenamento, ocorreram em sementes de algodoeiro com teores de água de 4 a 10% b.u. (Figura 4). Sementes com teores de água acima de 10% já apresentaram alguma perda da sua viabilidade, principalmente quando armazenadas sob condições de nitrogênio líquido (-196°C). Isso indica que, para determinados tipos de semente, existe um teor de água ideal para crioconservações. Cujos resultados indicam, para esta faixa de teor de água, que a crioconservação pode ser um método adequado para a preservação das sementes das cultivares de algodoeiro.

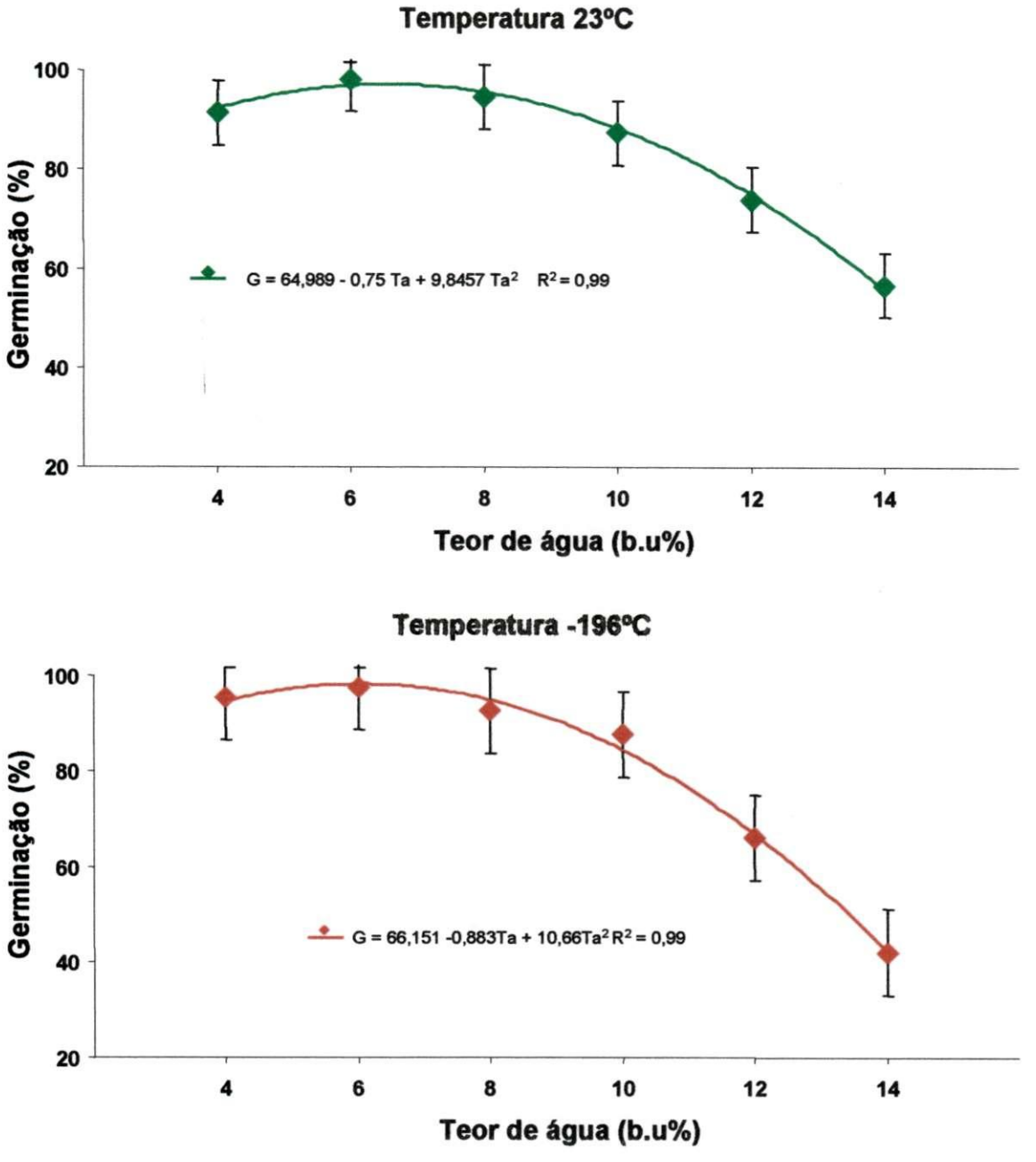
Os resultados aqui obtidos vêm reforçar, a exemplo de outros experimentos, que menores teores de água garantem a manutenção da qualidade das sementes durante o armazenamento em nitrogênio líquido (FREITAS et al., 1992; TRIPATHY et al., 1996; GERMANO, 1992).





UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 4. Equações que representam a germinação em função do teor de água, para a cultivares BRS-Verde, BRS-200 6M-Mocó e BRS-187-8H, quando armazenadas às temperaturas de 23ºC e –196ºC, por 5 dias



UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 5. Uma só equação que representa as quatro cultivares com as dispersões da sua germinação em função do teor de água, quando armazenadas nas temperaturas de 23ºC e -196ºC, por 5 dias

O vigor expresso pelo comprimento de plântula em função do teor de água tem comportamento semelhante ao da germinação; no entanto, para cada cultivar

existe uma dispersão entre os valores diferentes. Esta curva também se reflete no coeficiente de determinação, que passa a ser de 0,69 a 0,99.

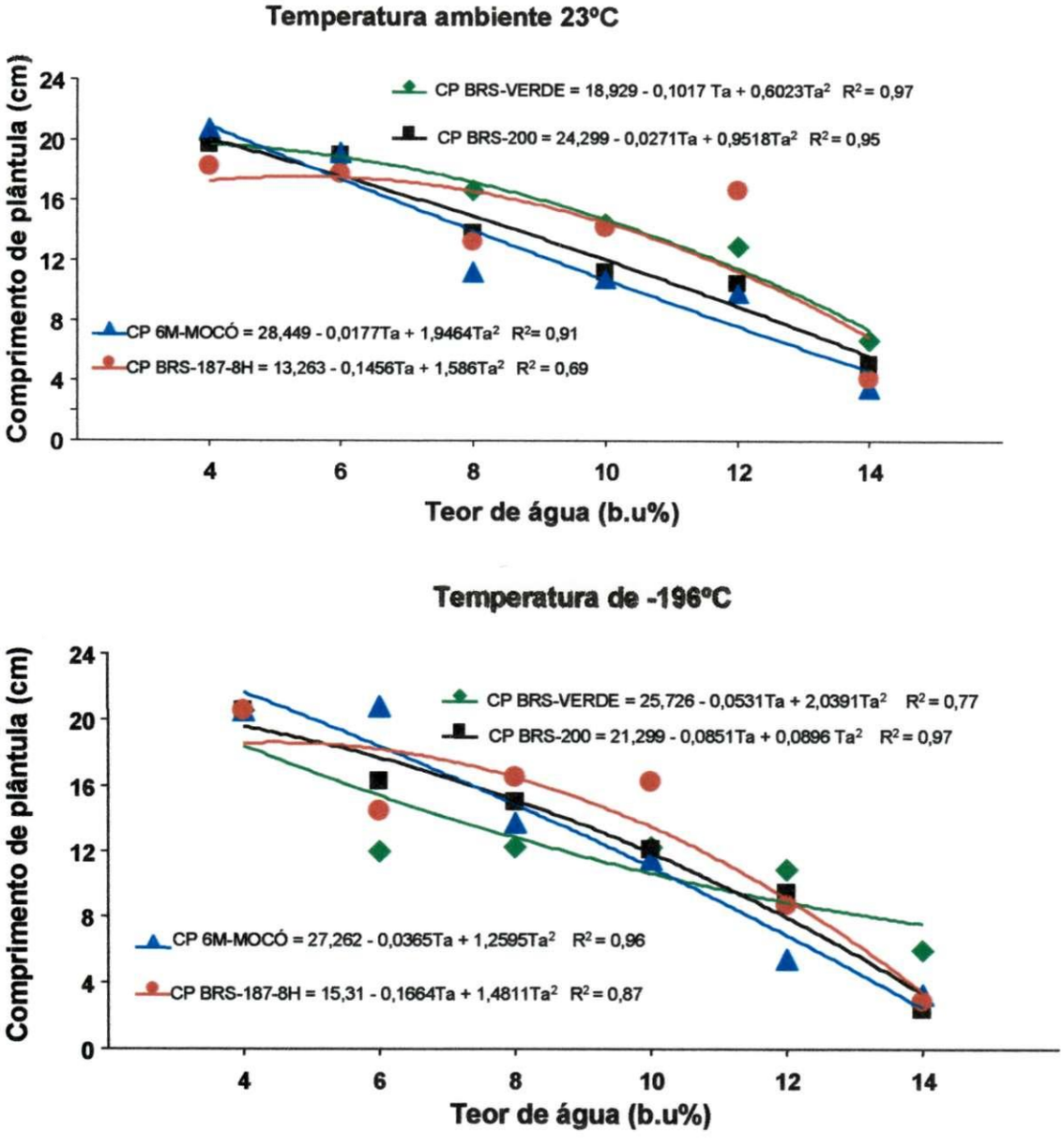
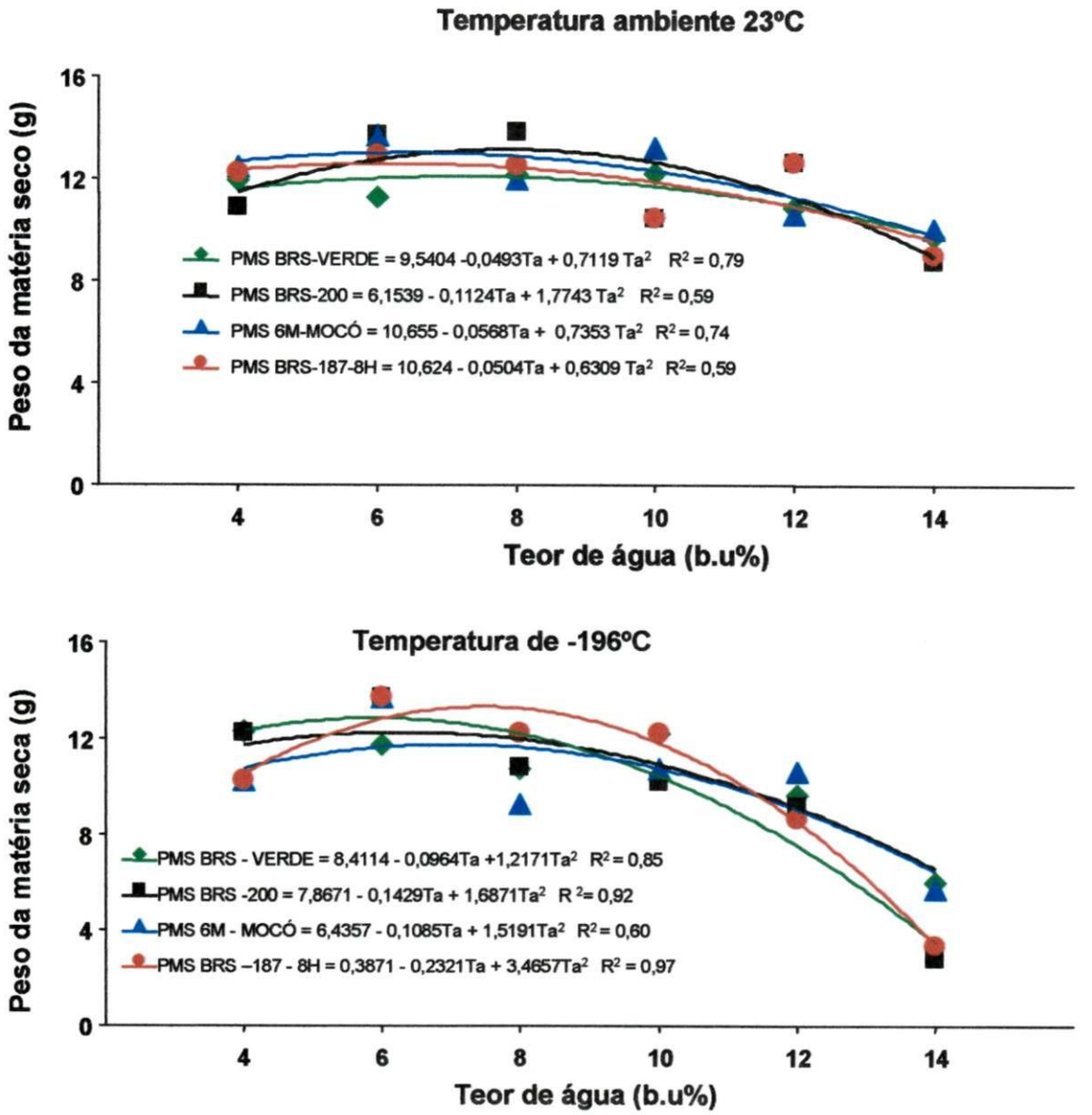


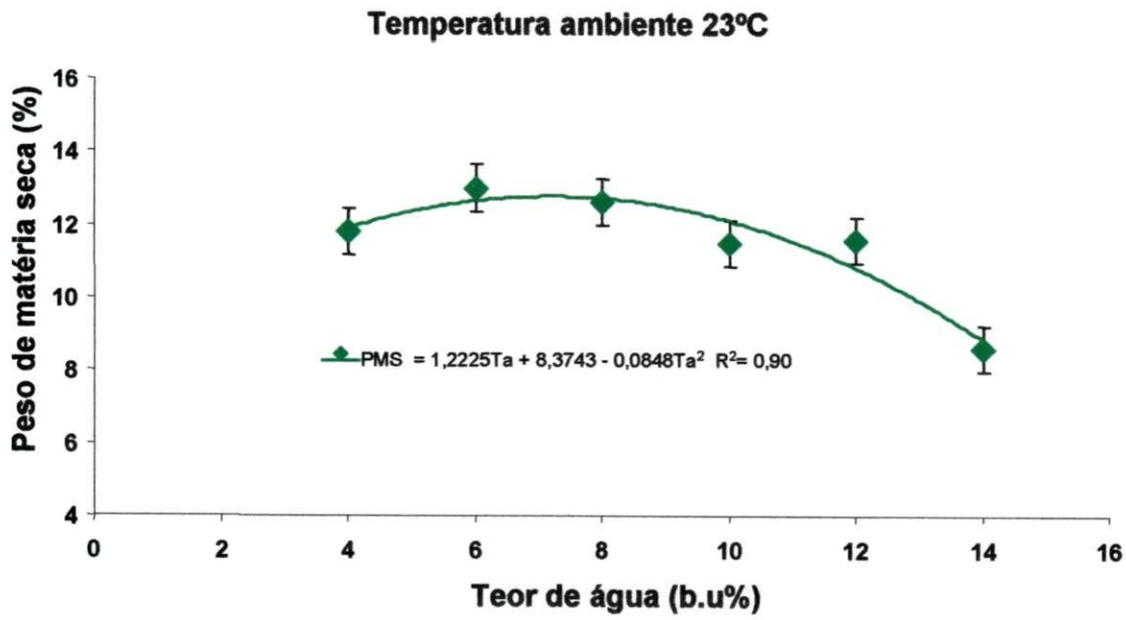
FIGURA 6. Equações que representam a variação do vigor (comprimento de plântula) em função do teor de água, para as cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco, quando armazenadas a temperaturas de 23°C e –196°C, por 5 dias

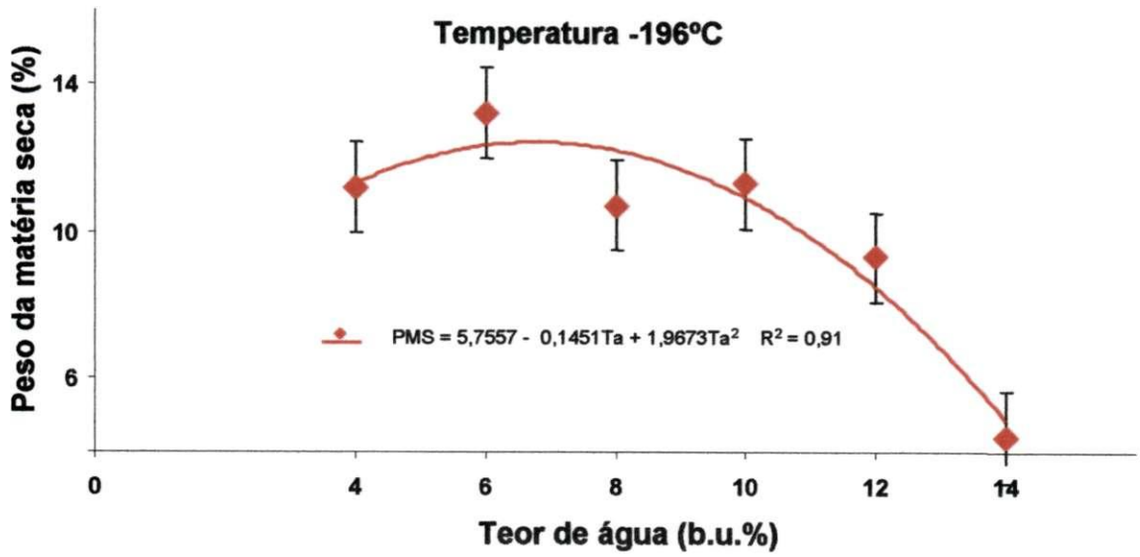
O vigor, expresso pelo peso da matéria seca em função do teor de água tem comportamento semelhante ao da germinação, porem para cada cultivar existe uma dispersão entre os valores, que não permite dizer que o vigor pode ser representado por uma única equação. Essa dispersão também se reflete no coeficiente de determinação que passa a ser inferior a 0,99, contudo, quando o vigor é expresso em peso da matéria seca, os valores das cultivares passam a estar mais próximos entre si, ou seja, as equações referentes a cada cultivar, podem também ser representadas por uma única equação. Desta forma, as Figuras 7 e 8 representam o acima descrito e, observado-as com maior atenção, constata-se que o maior vigor se encontra, geralmente, quando as sementes foram conservadas com 6% b.u. embora elas não defiram significativamente das sementes armazenadas a 23°C e -196°C com teor de água de 4 e 8 % b.u.



UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 7. Equações que representam a variação do vigor (peso da matéria seca) em função do teor de água, para as cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H-Branco, quando armazenadas a temperaturas de 23°C e -196°C, por 5 dias





UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 8. Uma só equação que representa as quatro cultivares com a sua dispersão do peso da matéria seca em função do teor de água, quando armazenadas nas temperaturas de 23ºC e -196ºC, por 5 dias

4.2 Crioconservação das sementes imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e vapor (-170°C)

TABELA 15. Valores da germinação e vigor (comprimento de plântula e peso da matéria seca) das quatro cultivares de algodoeiro de plumas coloridas e branca tradicional, submetidas a duas temperaturas, no vapor (-170°C) e imersas no nitrogênio líquido a (-196°C)

Germinação (%)								
Períodos	**BRS-Verde**		**BRS-200-Marrom**		**6M-Mocó-Branco**		**BRS-187-8H-Branco**	
	-170°C	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**
5	64,25	67,00	57,75	69,00	76,25	90,75	61,25	72.75
30	61,25	74,25	69,50	67,25	69,50	80,50	54.50	68,25
60	95,50	91,50	92,50	94,75	71,25	89,75	93,50	98,75
90	94,75	97,50	86,25	84,75	77,50	97,50	94.75	94,00

Vigor - comprimento de plântulas (cm)								
Períodos	**BRS-Verde**		**BRS-200 Marrom**		**6M-Mocó Branco**		**BRS-187-8H Branco**	
	-170°C	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°(**	**-196°C**
5	7,50	4,75	8,75	7,00	8,75	13,25	7,25	11,00
30	7,50	6,75	6,75	6,50	8,00	10,25	8,25	7,50
60	11,75	13,00	7,00	12,00	9,25	12,00	12,00	13,00
90	13,00	15,00	13,00	12,00	13,00	14,00	14,50	15,00

Vigor - peso da matéria seca (g)								
Períodos	**BRS-Verde**		**BRS-200 Marrom**		**6M-Mocó Branco**		**BRS-187-8H Branco**	
	-170°C	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**	**-170°C**	**-196°C**
5	7,00	6,50	8,50	5,50	8,75	12,00	6,25	8,50
30	7,75	6,00	7,50	5,25	7,50	9,25	6,50	6,25
60	11,75	11,00	4,75	10,0	7,50	10,00	8,75	10,75
90	11,25	12,60	9,50	9,25	9,50	11,50	10,75	11,00

Os resultados da germinação e vigor (comprimento de plântula e peso da matéria seca) das sementes de algodão com teor de água de 6% b.u. quando

UFCG/BIBLIOTECA

submetidas a crioconcervação a temperaturas de –170°C (vapor do nitrogênio) e –196°C (imersas no nitrogênio liquido) e quatro períodos de armazenagem, encontram-se na Tabela 15 e, na Tabela 16, o resumo da análise de variância na qual constatam efeitos significativos para a maioria dos fatores estudados. Não se verificam, nesta tabela, efeitos significativos para a interação dupla entre temperatura x período de armazenamento, em todas as variáveis estudadas, (germinação e vigor), assim como para a interação tripla entre temperatura x período de armazenamento x cultivar, para as variáveis germinação e vigor expresso por peso de matéria seca.

TABELA 16. Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) da germinação e vigor (peso da matéria seco - PMS e comprimento de plântula - CP) de sementes dos algodoeiros de pluma colorida e tradicional, submetidas a crioconservação, em diferentes períodos

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios		
		Germinação	Vigor	
			PMS	CP
Cultivares (C)	3	93,33**	0,68^{ns}	9,46**
Temperatura(T)	1	1755,28**	143,47**	480,85**
T XV	3	310,86*	125,79**	34,58**
Erro (a)	24	272,50	2,25	15,17
Período (P)	3	5149,72**	82,90**	229,57**
P X C	9	479,04**	137,23**	12,36^{ns}
T X P	3	45,71^{ns}	12,79^{ns}	11,19^{ns}
T X P X C	9	87,91^{ns}	7,19^{ns}	9,66**
Residuo	72	104,25	4,77	4,19
CV%		12,76	15,04	19,98

** F Significativo nivel de 1% de probabilidade
* F Significativo nivel de 5% de probabilidade
^{NS}F não Significativo
Observando-se as diferenças estatísticas (P< 0,01)
Observando-se as diferenças estatísticas (P< 0,05)

O comportamento da germinação das sementes de algodão durante o armazenamento é demonstrado nas Tabelas 17 a 20, constatando-se que tendência de ocorrer maior germinação com o aumento do período de armazenamento. Este comportamento, por outro lado pode estar relacionado à

superação da dormência pós-colheita daquelas sementes, aliado ao efeito do nitrogênio líquido, o qual contribui para tal superação. GONZÁLEZ BENITO et al. (1998) estudando a viabilidade de sementes crioarmazenadas de algodão *Gossypium hirsutum* L. (CNPA 4M, CNPA 5M, CNPA Precoce 2 e Coker 312), verificaram aumento da germinação das sementes das cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 2, após imersão em nitrogênio líquido. Fato semelhante ocorreu com BATISTA (2000), que obteve, para duas variedades de *Sesamum indicum,* maior porcentagem de germinação depois de 60 dias das sementes imersas em nitrogênio líquido.

TABELA 17. Valores médios de germinação BRS-Verde cultivar de algodoeiro de pluma colorida, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenagem

Germinação (%) **BRS-Verde**		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	64,25 b A	67,00 b A
30	61,25 b A	74,25 b A
60	95,50 a A	89,00 a b A
90	94,75 a A	97,50 a A
$DMS_{colunas}$=22,44 DMS_{linhas}=16,99		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 18- Valores médios de germinação das sementes de algodoeiro, BRS-200-Marrom, submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Germinação (%) BRS-200-Marrom		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	57,75 c A	69,00 b A
30	69,50 bc A	67,25 b A
60	92,50 a A	94,75 a A
90	86,25 ab A	84,75 a b A
$DMS_{colunas}$=22,44 DMS_{linhas}=16,99		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 19. Valores médios de germinação das sementes de algodoeiro, 6M-Mocó-Branco, submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Germinação (%) 6M-Mocó-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	76,25 a A	90,75 a A
30	69,50 a A	80,50 a A
60	71,25 a B	89,75 a A
90	77,50 a B	98,25 a A
$DMS_{colunas}$=22,44 DMS_{linhas}=16,99		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 20. Valores médios de germinação das sementes de algodoeiro, BRS-187-8H-Branco, submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Germinação (%) BRS-187-8H-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	61,25 b A	72,75 b A
30	54,50 b A	68,25 b A
60	93,50 a A	98,75 a A
90	94,75 a A	94,00 a A
$DMS_{colunas}$=22,44 DMS_{linhas}=16,99		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

No que diz respeito ao comportamento da germinação das sementes de algodoeiro em função da temperatura de armazenagem, verifica-se,Tabelas 21 a 24, que não houve diferenças entre as temperaturas de armazenamento. Para todas as cultivares, exceção se fez para a cultivar BRS-Verde, onde a semente crioconservada a -196°C é significativamente superior à armazenada a -170°C;. fato semelhante ocorreu com STANWOOD e SOWA (1995), que armazenaram sementes de 14 variedades de cebola (*Alíium cep* L.) a temperaturas de - 5 -18 e - 196°C, e avaliaram os efeitos de germinação durante o período de 10 anos, cujas resultados indicaram que a germinação média das sementes armazenadas a -18 e

-196°C, não diminuiu significativamente ao longo do tempo, ficando em torno de 92%, enquanto a germinação de sementes armazenadas a -5°C caiu de 94 para 69%.

TABELA 21. Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar BRS-Verde de algodoeiro, submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Comprimento de plântulas (cm) BRS-Verde						
Períodos	**-170°C**			**-196°C**		
5	7,50	b	A	4,75	b	A
30	7,50	b	A	6,75	b	A
60	11,75	a	A	13,00	a	A
90	13,00	a	A	15,00	a	A

$DMS_{colunas}$=4,19 DMS_{linhas}=3,17

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 22- Valores médios do vigor medido por comprimento de plântula da cultivar BRS-200-Marrom de algodoeiro, submetido a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Comprimento de plântulas (cm) BRS-200-Marrom						
Períodos	**-170°C**			**-196°C**		
5	8,75	b	A	7,00	b	A
30	6,75	b	A	6,50	b	A
60	7,00	b	B	12,00	a	A
90	13,00	a	A	12,00	a	A

$DMS_{colunas}$=4,19 DMS_{linhas}=3,17

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 23. Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar 6M-Mocó-Branco de algodoeiro, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Comprimento de plântulas (cm) 6M-Mocó-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	8,75 b B	13,25 a A
30	8,00 b A	10,25 a A
60	9,25 ab A	12,00 a A
90	13,00 a A	14,00 a A
$DMS_{colunas}$=4,19 DMS_{linhas}=3,17		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 24. Valores médios do vigor de comprimento de plântula da cultivar BRS-187-8H-Branco de algodoeiro, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Comprimento de plântulas (cm) BRS-187-8H-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	7,25 b B	11,00 ab A
30	8,25 b A	7,50 b A
60	12,00 ab A	13,00 a A
90	14,50 a A	15,00 a A
$DMS_{colunas}$=4,19 DMS_{linhas}=3,17		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O vigor caracterizado pelo peso da matéria seca de plântulas nas Tabelas 25 a 29 teve um comportamento semelhante ao verificado na germinação, conforme Tabelas 19 a 23, com aumento do vigor das sementes das distintas cultivares, com o passar do período de armazenamento. Este fato está relacionado também com a quebra de dormência das sementes, provocada pelo frio.

TABELA 25. Valores médios do vigor medido pelo peso da matéria seca, da cultivar BRS-Verde de algodoeiro, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Peso da matéria seca (g) BRS-Verde		
Períodos	**-170ºC**	**-196ºC**
5	7,00 c A	6,50 b A
30	7,75 bc A	6,00 b A
60	11,75 a A	11,00 a A
90	11,25 ab A	12,60 a A
$DMS_{colunas}$=3,37 DMS_{linhas}=1,78		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 26. Valores médios do vigor medido por peso da matéria seca da cultivar BRS-200-Marrom de algodoeiro, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Peso da matéria seca (g) BRS-200-Marrom		
Período	**-170ºC**	**-196ºC**
5	8,50 ab A	5,50 bc A
30	7,50 ab A	5,25 c A
60	4,75 b B	10,00 a A
90	9,50 a A	9,25 ab A
$DMS_{colunas}$=4,81 DMS_{linhas}=3,60		

Médias seguidas, pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 27. Valores médios do vigor medido pelo peso da matéria seca da cultivar 6M-Mocó-Branco de algodoeiro, submetida a duas temperaturas, durante 90 dias armazenamento

Peso da matéria seca (g) 6M-Mocó-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	7,25 a B	12,00 a A
30	7,50 a A	9,25 a A
60	7,50 a A	10,00 a A
90	9,50 a A	11,50 a A
$DMS_{colunas}$=5,12 DMS_{linhas}=3,83		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 28. Valores médios do vigor do peso da matéria seca da cultivar BRS-187-8H-Branco de algodoeiro, submetidas a duas temperaturas, durante 90 dias de armazenamento

Peso da matéria seca (g) BRS-187- 8H-Branco		
Períodos	**-170°C**	**-196°C**
5	6,25 b A	8,50 ab A
30	6,50 b A	6,25 b A
60	8,75 ab A	10,75 a A
90	10,75 a A	11,00 a A
$DMS_{colunas}$=4,09 DMS_{linhas}=2,35		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhasnão diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A germinação e o vigor, comprimento de plântulas e o peso da matéria seca do algodoeiro originadas de sementes armazenadas em quatro períodos nas Tabelas 29 a 31, apresentam diferenças entre as demais cultivares, no primeiro período de armazenamento (cinco dias); contudo, com o passar dos períodos de armazenamento tendem a aumentar sua germinação e seus vigores de comprimento de plântula e peso da matéria seca, no período de 60 a 90 dias. Este comportamento evidencia que algumas cultivares (BRS-Verde e BRS-200-

Marrom) parecem apresentar sementes com maior dormência pós-colheita. No que diz respeito às sementes das quatro cultivares constatou-se tendência no aumento do vigor das sementes, com o aumento do período de armazenamento.

TABELA 29. Valores médios da germinação das quatro cultivares durante quatro períodos de armazenagem

	Germinação (%)			
Períodos	**BRS-Verde**	**BRS-200-Marrom**	**6M-Mocó Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
5	65,62 b B	63,37 b B	83,50 a A	67,00 b B
30	67,37 b A	68,37 b A	75,00 a A	61,37 b A
60	92,71a A	93,62a A	80,50 a A	96,12 a A
90	96,33a A	85,50a A	87,87 a A	94,37 a A
$DMS_{colunas}$=22,44 DMS_{linhas}=16,99				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 30. Valores médios do comprimento de plântula das quatro cultivares durante quatro períodos de armazenagem

	Comprimento de plântula			
Períodos	**BRS-Verde**	**BRS-200 - Marrom**	**6M-Mocó-Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
5	6,12 bC	7,87 bc BC	11,00 ab A	9,12 b B
30	7,12 a A	6,62 c A	9,12 b A	7,87 b B
60	12,00 a A	9,5 b A	10,62 b A	12,12 a A
90	14,11 a A	12,50 a A	13,50 a A	14,37 a A
$DMS_{colunas}$=4,14DMS_{linhas}=3,17				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 31. Valores médios peso da matéria seca das quatro cultivares em quatro períodos de armazenagem

	Peso da matéria seca			
Períodos	**BRS-Verde**	**BRS-200 - Marrom**	**6M-Mocó-Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
5	6,75 b B	7,37 ab B	10,37 a A	7,37 bc B
30	6,87 b A	6,37 b A	8,37 a A	6,37 c A
60	11,42 a A	9,5 a B	8,75 a AB	9,7 ab AB
90	12,00 a A	9,37 ab A	10,50 a A	10,87a A
$DMS_{colunas}$=4,14 DMS_{linhas}= 3,13				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As Tabelas 32 a 34, mostram os valores médios da germinação e os valores médios em todos os períodos de vigor, representado por comprimento de plântula e peso da matéria seca, das sementes de algodoeiro armazenadas em diferentes condições. Não houve diferenças no vigor das sementes das varias cultivares, quando armazenadas no vapor do nitrogênio, mas quando armazenadas em temperatura de nitrogênio líquido, houve destaque das as sementes da cultivar BRS-Verde, se destacaram, apesar de não diferir das cultivares 6M-Mocó-Branco , BRS-Verde e BRS-187-8H-Branco. Este fato também foi constatados por PENCE (1991), que determinou a viabilidade em sementes silvestres da região de Ohio, crioconservadas em nitrogênio liquido. Foram feitos um total de 527 testes em 237 espécies, tendo-se observando que 79% dos testes não apresentaram efeito prejudicial em relação à sua germinação e vigor, VIEIRA e CARVALHO (1994) notaramque comprimento de plântula e peso da matéria seca de planta visam determinar o vigor relativo de um lote de sementes, avaliando-se o peso médio da matéria seca da parte aérea das plantas, com base no princípio de que sementes que produzem plantas com o maior peso médio da matéria seca de parte aérea da planta, em sua fase inicial de desenvolvimento, sob condições de campo, são consideradas vigorosas.

UFCG - BIBLIOTECA

TABELA 32. Valores médios de germinação de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro, armazenadas 90 dias, em vapor de nitrogênio e em N_2L

	Germinação (%)			
Temperaturas	**BRS-Verde**	**BRS-200-Marrom**	**6M-Mocó-Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
Vapor	78,93 aA	73,62 bA	76,00 a A	76,00 a A
N_2L	82,50 aAB	89,81 a A	83,43 a AB	78,93 a B
$DMS_{colunas}$=22,4 DMS_{linhas}=16,9				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 33. Valores médios do vigor de comprimento de pântulas de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro, armazenadas 90 dias, em vapor de nitrogênio e em N_2L

	Comprimento de plântula (cm)			
Temperaturas	**BRS-Verde**	**BRS-200-Marrom**	**6M-Mocó-Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
Vapor	9,93 a A	8,87 a A	9,75 b A	10,18 a A
N_2L	9,87 a BC	9,37 a C	12,37a A	11,56 a A B
$DMS_{colunas}$=4,14DMS_{linhas}=3,17				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

UFCG - BIBLIOTECA

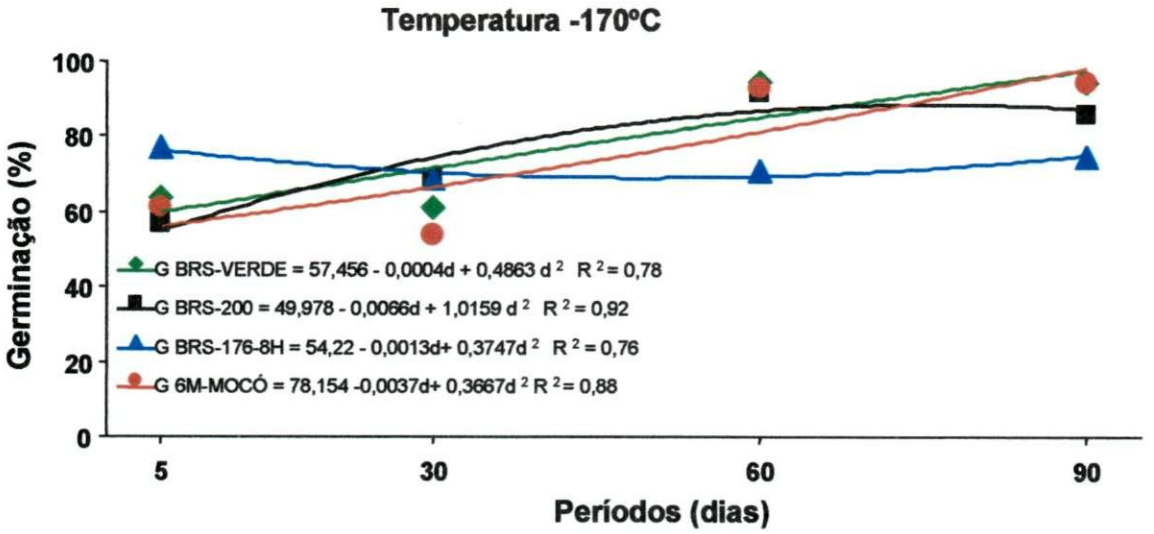
TABELA 34. Valores médios do peso da matéria seca de plântulas, obtidos em 90 dias de armazenagem, originadas de sementes de diferentes cultivares do algodoeiro, armazenadas em diferentes condições

	Peso da matéria seca (g)			
Temperaturas	**BRS-Verde**	**BRS-200-Marrom**	**6M-Mocó-Branco**	**BRS-187-8H-Branco**
Vapor	9,43 a A	7,56 a A	8,31 b A	8,06 a A
N_2L	9,12 a AB	7,50 a B	10,68 a A	9,12 a AB
$DMS_{colunas}$=4,14 DMS_{linhas}= 3,13				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tem-se, nas Figuras 9,10 e 11 as equações que representam, respectivamente, a variação dos percentuais de germinação e vigor (grama de matéria seca) das sementes de algodão, para as quatro cultivares quando armazenadas durante quatro períodos de tempo, a temperaturas criogênicas de -170ºC e -196ºC, representadosde 2ª ordem com coeficiente de terminação que varia entre 0,59 a 0,99; nestas fica evidente que não existem comportamentos diferentes entre as duas temperaturas para germinação e vigor, evidenciando-se que referidas sementes podem ser crioconservadas em bancos de germoplasma que continuam fisiologicamente viáveis e vigorosas durante 90 dias.

De acordo com CAVALCANTI MATA (2001), quando as sementes podem ser consideradas viáveis para a crioconservação, elas passam a ter potencial de conservação considerado por tempo indefinido essa temperatura criogênica.



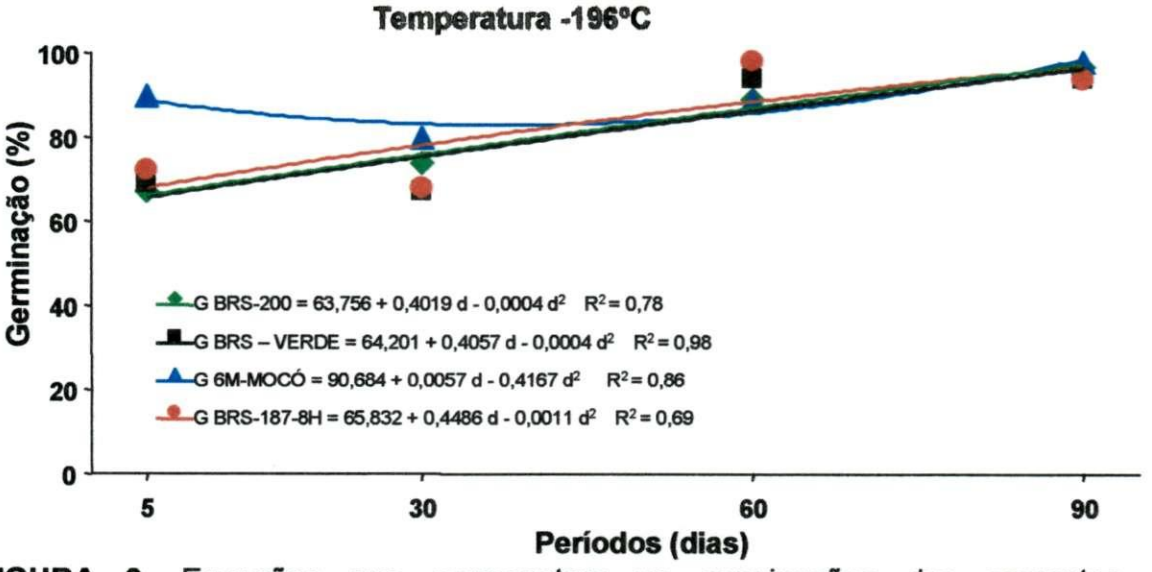
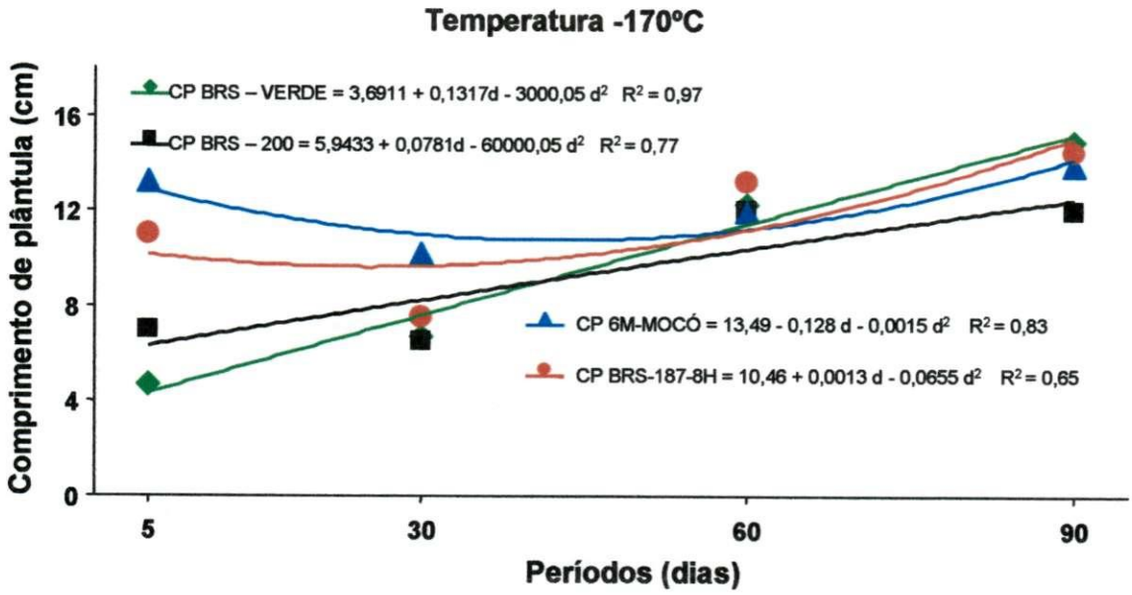


FIGURA 9. Equações que representam as germinações das sementes armazenadas por diferentes períodos, nas quatro cultivares, quando armazenadas a temperaturas de -170ºC e -196ºC



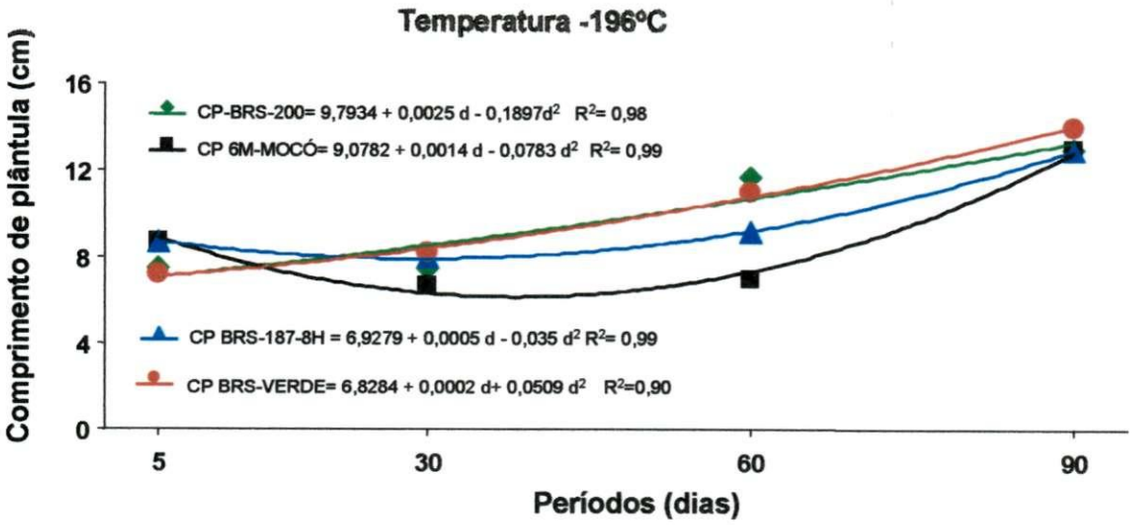
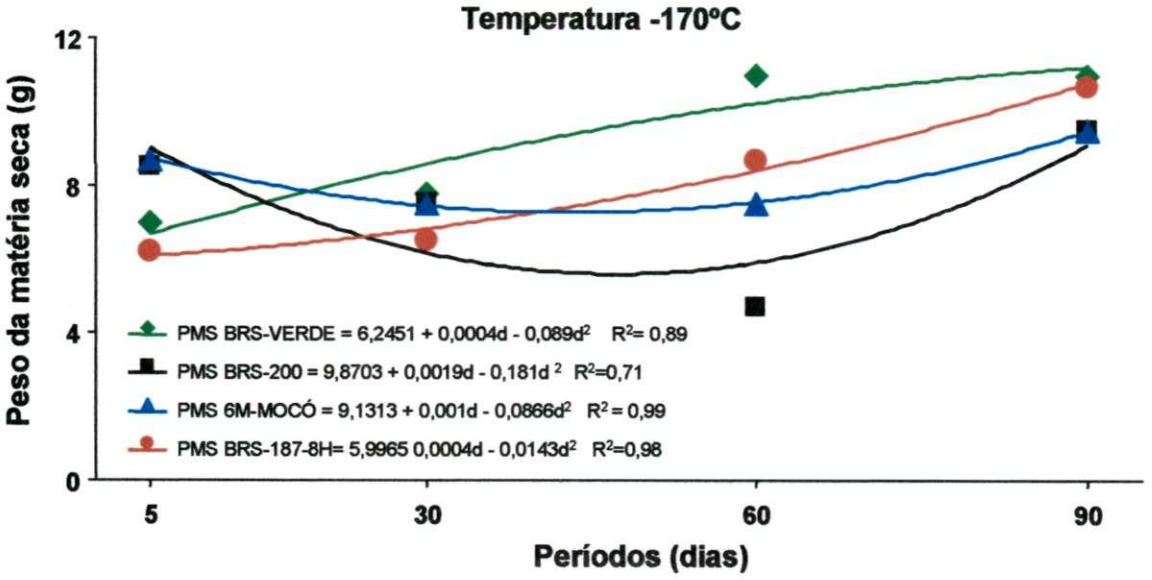


FIGURA 10. Equação que representam comprimento de plântula das sementes armazenadas por diferentes períodos nas cultivares, atemperaturas de -170°C e -196°C



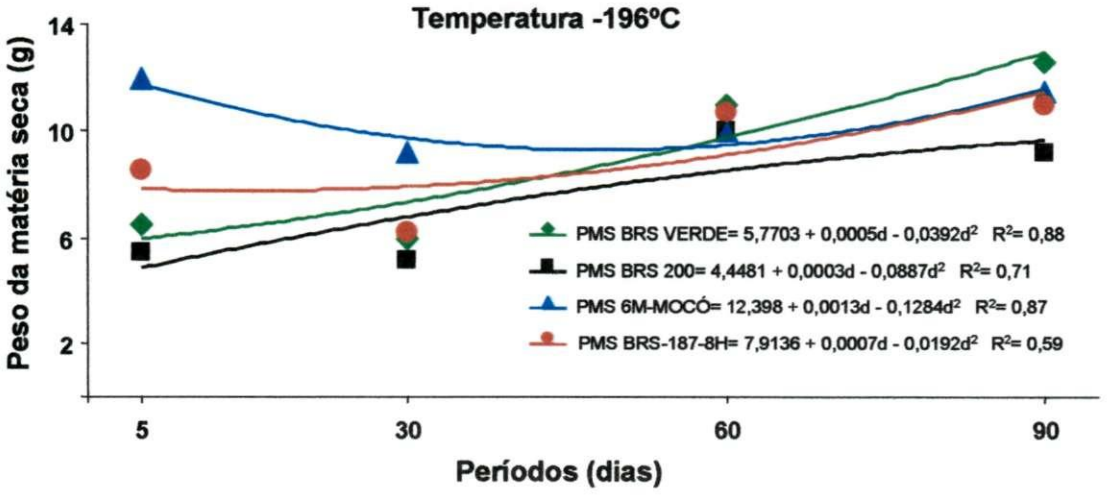


FIGURA 11. Equações que representam peso da matéria seca das sementes armazenadas por diferentes períodos nas quatro cultivares, a temperaturas de -170ºC e -196ºC

5. CONCLUSÕES

- Ao se estudar a determinação do teor de água limite para crioconservação-TALC, durante 5 dias, conclui-se que o teor de água limite para a crioconservação das cultivares BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó e BRS-187-8H-Branco, considerando-se a germinação e vigor dessas cultivares está, entre 6 e 8% (b.u.).

- A crioconservação das sementes de algodoeiro, das diferentes cultivares pode ser conservada tanto no vapor a -170°C quando imersa em ao nitrogênio líquido a -196°C, visto que sua qualidade fisiológica é mantida durante os 90 dias.

- A conservação criogênica aumenta o percentual de germinação e o vigor das sementes de algodão, em razão dessa temperatura promover quebra de dormência, pela ação do frio.

6. BIBLIOGRAFICA

AGUIAR, I.B.; PINA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais e tropicais, Brasília**: ABRATES, 350p, 1993.

ALMEIDA, F. de A.C.; FONSECA, K.S.; GOUVEIA, J.P.G. de. Influência da embalagem e do local de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de gergelim. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 195 - 201, 1999.

ALMEIDA, F. de A.C.; MATOS, V.R.; CASTRO, J.R. de; DUTRA, A.S. Avaliação da qualidade e conservação de sementes em nível de produtor. In: ALMEIDA, F. de A.C.; HARA, T.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. (ed.). **Armazenamento de grãos e sementes nas propriedades rurais.** Campina Grande: UFPB/SBEA, 201p., 1997.

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de. Efecto de la críoconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 67 - 71, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. AOSA, 1983. 93p. (Contribution, 32).

AZERÊDO, G.A. de. **Influência de beneficiamento, embalagem e ambiente na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cv. BR-1armazenadas**. 2000. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Departamento de Agronomia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2000.

UFCG - BIBLIOTECA

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. 2000. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRUNO, R. de L.A.; AZERÊDO, G.A. de ; QUEIROGA, V. de P.; ARAÚJO, E.; DINIZ, E. Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. BR-1 durante o armazenamento. **Revista de Oleaginosas de Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.3, p.141-152, 2000.

CARVALHO, N.M. e NAKAGAWA,J. **Semente: Ciência, tecnologia, e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 2000. p.141-152.

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Crioconservação dos recursos fitogenéticos de espécies florestais, medicinais e de interesse econômico do semi-árido do Nordeste do Brasil.** Campina Grande, 2001 68p. (Projeto de Pesquisa).

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D.; FIGUEREDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J. de M. Perda da qualidade fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) armazenadas sob condições controladas. **Revista Brasileira de Armazenamento,** Viçosa, v. 24, n. 1, p. 10 – 25, 1999.

CHIN, H.F. **Recalcitrant seeds** – a status report. Rome: IBPGR, 1988, 28p.

CORLETT, F. M. F. **Qualidade fisiológica e microflora de sementes de algodão herbáceo com e sem linter da cultivar CNPA7H em três microrregiões do**

Estado da Paraíba. 1999. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1999.

CROCHEMORE, M.L. e PIZA, S.M. de T. Germinação e sanidade de sementes de nabo forrageiro conservadas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29,n.5, p.677-680,1994.

DELOUCHE, J.C. Physiology of seed storage, **Research Conference American Seed Trade.** Association. v.23, p.83-90. 1968.

DELOUCHE, J.C.; CALDWELL, W.P. Seed vigor and vigor test, **Pro. Assoc. off Deed Anal.,** v. 50, n.1, p.124;129, 1960.

DINIZ, P.S.C. **Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de crioconservação.** 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1999.

DUTRA, A. S. E.; CASTRO, J.R. Qualidade da semente de algodão herbáceo, em função do grau de umidade e condições de armazenamento na sua conservação In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 1. 1997, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: EMBRAPA-CNPA, p.591, 1997.

EIRA, T.S.M.; REIS, R.B.R. **Recursos genéticos e biotecnologia- branco de semente de café em criopreservação**: Experiência inédito do Brasil, chttp//htm/artigo lista cfm>acesso:13 de setembro de 2004.

FELISMINO, D.C. **Eficiência relativa de produtos químicos e naturais sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* acondicionadas em dois tipos de embalagens em ambiente**

não controlado. Areia,PB, 1998. 51p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Paraíba.

FREITAS, G.B.; SILVA, R.F.; ARAÚJO, E.F.; REIS, F.P. Influência da condição de armazenamento na qualidade de sementes de milho. **Revista brasileira de armazenamento**, Viçosa, v.17, n1/2, p.21-26, 1992.

GERMANO, M.L. de S.A.R. **Emprego de produtor natural no tratamento de sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp.) acondicionadas em três embalagens e em microrregiões da Paraíba,** 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Departamento de Agronomia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1997.

GOMES, J.P. **Comportamento da germinação e do vigor de sementes de algodão herbáceo em diferentes tipos de embalagem tratamento e condições de conservação durante a sua armazenagem**. 1992. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1992.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 17 – 20, 1998.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; IRIONDO, J.M.; PITA, J.M.; PEREZ-GARCIA, F. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens* F. **Hortscience**, Alexandria, v. 75, p.1 - 4, 1995.

GURJÃO, K.C.O. **Qualidade fisiológica, nutricional e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), produzidas no semi-árido nordestino**.

Campina Grande,PB, p.88, 1995 (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Paraíba.

IPBE, INTERNATIONAL BOARD FOR PANTA GENETIC RESOURCER. **The design of seed storage facilities for genetic conservation,** Rome, 1991. 97 p.

IRIONDO, J.M.; PEREZ, C.; PEREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. **Seed Science and Technology,** Zurich, v. 20, n. 1, p. 165 - 171, 1992.

ISTA, INTERNATIONAL SEED TETINO ASSOCIATION. **Handbook of vigor test methods**. Zurich, Switzerland ISTA, 1981, 72p.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. (ed.). **Cryopresevation of plant cells and organs.** Boca Rotan: CRS Press. 1985. p. 115 - 134.

KARUNUKI, Y.; YOSHIDA, S. Crypreservation of tea seeds and the excised embryonic axes on liquid nitrogen. Proceedings of the international symposium on tea science, chibouk, Japan. **Annals**...ISTS, 1991.

LIMA, H.F.; BRUNO, R. de L.A.; BRUNO, G.B.; BANDEIRA, I.S. de A. Avaliação de produtos alternativos no controle de pragas na qualidade fisiológica de sementes de feijão armazenadas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 40 – 53, 1999.

LIN, S.S. Efeito do vigor da semente no desempenho da planta de soja (*Glycine max* (L.) Merril) no campo. **Agronomia Sulriograndense. Porto Alegre**, v.18. n.1 p.37;46, 1982.

MARCOS FILHO. J.; CICERO, S,M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, 230p, 1987.

MARTINS NETO, D.A. Germinação de sementes de pau-de-balsa (*Cochroma pyramidade* (Cav. Urb.) – Bombacácea). **Revista Brasileira de Semente**, Londrina: ARATES, v. 16, n.2, p.159-162, 1994.

MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.). Brasília, DF, **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 73 – 75, 1992.

MOORE, R.P.; ROBERTS, E.H. Effects of mechanical injuries on viability. **Viability of seeds**. Syracuse: University Press, 1972, p.94-113.

MORAES, A.M.; **Cultivo *in vitro* e crioarmazenagem de sementes de mamona (*Ricius communis* L.)**. 2001. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2001.

MOURA, M.A.L.C.; ANTONIO A.C.; LUIZ CARLOS, G.M. Efeito da embalagem e do armazenamento no amadurecimento do caqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n.11, p. 1105-1109, 1997.

PATRIOTA, T.R.A. **Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium Hutch*) armazenadas em função de diferentes tratamentos e teores de umidade.** 1996. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1996.

PELEGRINI, M.F. **Armazenamento de semente**. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v.8, n91, p.56-60, 1982.

PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds if Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technology,** Zurich, v. 19, n. 2, p. 235 – 251, 1991.

PERRY, D.A. Report of the vigor test committee international seed testing association, In: Congress of the international seed testing association. 17, 1977, North Caroline. **Anais...** Caroline: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, p.18, 1977.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura, AGIPLAN, 1985. 289p.

PREVEIRO, C.A.; RAZERA, L.F.; GROTH, D. Influência do grau de umidade e tipo de embalagem na conservação de sementes de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.33, n.2, p.57-68, 1998.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campina: Instituto Campineiro de ensino agrícola, p, 603, 1996.

REDDY, K.R.K.; RAO, G.P.; BAHADUR, B. *In vitro* morphogenesis from seedling explants and callus cultures of castor (*Ricinus communis* L.). **Phytomorphology**, New Delhi – Índia, v. 37, n. 4, p. 337 – 340, 1987.

ROBERTS, E.H.; FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. Problems of long- tem storage of seed and pollen for genetic resource conservation. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. Cambridge, 1973, p.269-295.

ROOS, E.E.; McDONALD. Jr, M.B.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**. Madison CSSA. p.1, 1986.

ROOS, E.E.; STANWOOD, P.C. Effects of low temperature, cooling rate and moisture content on seed germination of lettuce. **Journal of the american society for horticultural science,** Mount Vernon, n. 106, p. 30 – 34, 1981.

SAEG-**Sistema para análise estatística em genética**, Fundação Arthur Bernardes, UFV, MG, v.5.0, 1993.

SANTO, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**. Londrina, PR, v.12, n. (especial) p.70-84, 2000.

SKAI, A.; NOSHIRO, M. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. In: **Crop genetic resources for today and tomorrow**. International Biological Program Handbook. Cambridge University. v.2. p.317-326, 1975.

SOUSA, J.G.A.; QUEIROGA, V. de P.; RIBEIRO, O.R.; GOMES, J.P.; ALMEIDA, F. de A.C. Influência dos fatores colheita, beneficiamento e armazenamento na germinação das sementes de algodão herbáceo. **Agropecuária técnica,** Areia, v. 20, n. 1, p. 35 - 41, 1999.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: K.K. KARTHA. (ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan - Florida: CRC Press, 1985. p. 199 – 225.

STANWOOD, P.C. Survival of sesame seeds at the temperature (–196°C) of liquid nitrogen. **Crop science**, Madison - WI, v. 27, p. 327 - 331, 1987.

STANWOOD, P.C. Tolerance of crops seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (196°C). **Journal of seed technology**, Florida, v. 5, n. 1, p. 26 - 31, 1980.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed science and technology,** Zurich, n. 9, p. 423 - 437, 1981.

STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **Hortscience**, Alexandria, v. 14, n. 5, p. 628 - 630, 1979.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo. Agronômica Ceres, p.217, 1977.

TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. **Kings park and botanic garden**. West Perth. Australia, v.74, p.541-546, 1994.

TOWILL, L.E. Survival of ultra-lee temperatures of shoot-tips Selenium Tiberius Group indigent, phrasal stenotomum and other tuber-bearing selenium species .**Cryo-Latters**. v.5, p.319-326, 1984.

TRIPATHI, S.K.; PATRA, A.K.; SAMUI, R.C.; NANDA, M.K. Effect of storage containers on storability of groundnut seeds and their performance in the field. **Indian Journal of plant physiology**, Morhanpur, v.1, n.3, p.180-184, 1996.

VICENTE, A.M.; RUBIO, J.G.P.; REGIDOR, F.S. **Regrigeracion, congelacion y envasado de los alimentos**. Madrid: AMV Ediciones – Mundi, 1994. 276p.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes.** São Paulo - SP: Editora Afiliada, 1994, 164p.

VIGGIANO, J.; MEDINA, R.S.L. Conservação de sementes de feijão-vagem com três teores de umidade, acondicionadas em dois tipos de embalagens e mantidas sob duas condições de armazenamento, durante sessenta meses, CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5, Gramado, RS, **ABRATES**, 1987, p.25.

YAMADA, T. Cryapreservation of forage crops. In: Cryopreservation of plant genetic resources projects **JICA,** n°6, Japan, 1993.

UFCG - BIBLIOTECA

CAPÍTULO II

INDUÇÃO DE SUPERBROTAMENTO E REGENERAÇÃO DE PLANTA *IN VITRO*, NAS CULTIVARES DE ALGODÃO COLORIDO

1. INTRODUÇÃO

No semi-árido nordestino o algodoeiro é considerado uma das plantas mais cultivadas pelo homem, tendo em vista sua fibra. Como subprodutos de sua lavoura são aproveitados, ainda o óleo, a farinha da torta, o línter e a casca, todos extraídos da semente ou caroço. Esta oleaginosa tem sido explorada tradicionalmente, por pequenos e médios produtores, constituindo-se numa grande e importante alternativa agrícola para a economia da região, como ótima geradora de emprego e de matéria-prima indispensáveis ao desenvolvimento da região e do País (SILVA et al., 2000).

A cultura de tecido consiste, na realidade, no cultivo de órgão, tecido ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico, com técnica grande vantagem de se trabalhar apenas com células de plantas desejáveis. Esses explantes, ao serem colocados em tubos de ensaio, se multiplicam com rapidez, formando milhões de plantas, todas iguais a planta-mãe, ou com modificações em uma ou mais de suas características como, maior produtividade, maior tolerância à seca, maior resistência à pragas e doenças e à deficiência mineral do solo (REDDY et al ., 1991).

A micropropagação *in vitro* oferece condições para obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em um menor espaço de tempo do que o melhoramento convencional. Em orquídeas, por exemplo, embora sejam plantas herbáceas, uma boa muda ("divisão") não se obtém em menos de dois anos, enquanto que neste mesmo período, através da cultura *in vitro* de ápices meristemáticos, centenas ou milhares de clones podem ser produzidos (KERBAUY, 2000).

ANDRADE et al.(2000), realizando estudos sobre a micropropagação em Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) e utilizando-se dos explantes internodal, segmentos cotiledonares, nodal e apical, e dos hormônios NAA, BAP e KIN, com o total de nove meios, apresentando concentrações e combinações diferentes destes hormônios, observaram que nos explantes internodal e cotiledonar em meios com combinações de NAA+BAP ou KIN ocorreram formações de calo, mas sem nenhuma formação de brotos nesses explantes. Nos explantes nodal e apical

UFCG/BIBLIOTECA

nas combinações de NAA com KIN e BAP ocorreram poucas formações de brotos, visto que os explantes necrosavam e morriam, mas ao se utilizar o BAP, isolado, se boa regeneração, apresentando apenas um broto por explante e, em concentração de 4,5, proporcionou maior tamanho das brotações.

ARAÚJO et al.(2003), em sua pesquisa com micropropagação da babosa *(Aloe vera),* em que foi utilizado, como explante, o meristema apical provindo de plantas matrizes selecionadas e, como hormônios, o NAA e o BAP, as concentrações de 4,03mM e 6,7mM respectivamente, obtiveram excelente resultado em relação á multiplicação clonal, tornando possível a formação de diversas mudas, em curto espaço de tempo.

ERIG et al.(2002), estudando a multiplicação *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus* l.), concluíram que o melhor meio para formação de brotos, também para o explantes meristema apical, era aquele suplementado apenas com o hormônio BAP, promovendo aumento na taxa de multiplicação da amoreira preta até a concentração de 5,1mM. Para este trabalho testaram-se meios com presença de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, constatando-se que esta presença acarretou piores resultados. Da mesma forma, para micropropagação da porta-enxerto de videira 420-A, segundo DZAZIO et al.,(2002), a maior quantidade de brotos por explante foi encontrada nos meios com presença de BAP. A multiplicidade de brotos é característica deste regulador, que induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (MARTINELLI et al.,1985).

UFCG - BIBLIOTECA

Em estudos com o superbrotamento do algodão *in vitro* CARVALHO et al.(2000) obtiveram bom resultado ao utilizarem o hormônio BAP, isolado ou combinado com o hormônio KIN.

O presente trabalho teve como objetivo a indução a organogênese, para a obtenção de superbrotamento de plântulas, dos explantes de quatro cultivares (BRS-Verde, BRS-200-Marrom, BRS-187-8H-Branco e 6M-Mocó-Branco), de algodão, utilizando-se os reguladores de crescimento, as citocíninas BAP, KIN e TDZ, para indução de brotos das gemas dormentes dos nós cotiledonares.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Cultivo *in vitro*

A importância da técnica de cultivo *in vitro* tem sido mostra em vários trabalhos: alguns autores a usam para o estudo da capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro,* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos, por causa da sua grande aplicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas (RICHARDS e RUPERT 1980; ZENKLETE 1980). É reconhecida pelos pesquisadores da área vegetal a totipotência das células das plantas. Isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. A generalização do dogma da totipotencialidade, todavia, não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo-se muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática. Mesmo aceitando-se em princípio este dogma, é bem conhecido o fato de certos tecidos serem mais favoráveis à regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos do que outros. As diferenças celulares seriam estabelecidas e mantidas pelas influências mútuas das células e dos tecidos entre si (ambiente celular interno), é também conhecida a existência de células com características metabólicas e potencial de desenvolvimento relativamente estáveis. Estas características iniciais podem persistir até quando estas células são cultivadas em um mesmo meio de cultura. Embora esteja estabelecido que as substâncias reguladoras de crescimento podem induzir uma considerável gama de respostas nos diferentes tecidos de uma planta, pouca atenção tem sido dada á ocorrência de diferenças na competência das chamadas células-alvo (WAREING, 1985).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias á formação de meristemas caulinares e/ou radiculares. O longo intervalo de tempo entre a aplicação de citocinina/auxina e o início da síntese de DNA sugere que esse processo seja regulado indiretamente. A exemplo de vários sistemas animais, em um bom número de plantas, a síntese de DNA é precedida de

mudanças no metabolismo de proteínas RNA. Em células parenquimáticas de raízes de ervilha, a síntese de RNA precedia a de DNA por 24-36 horas (SHININGER, 1978). De acordo com CHRISTIANSON E WARNICK (1988), a formação de gemas em explantes foliares de *Convolvulus arvensis* incluiria uma série de fases bem-definidas, onde foi possível separar com êxito os processos da indução de competência e determinação celular. A diferenciação inicial dos explantes resultava na formação de calos com células ou grupos de células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulatórios do meio de cultura para a formação de gemas. A transferência destas células agora competentes para meios indutores de gemas tornava-se determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento. As células, a partir daí, diferenciavam-se em primórdios de gemas, mesmo se transferidas para meios não indutores; tal comportamento reflete de forma intensa a ocorrência de uma estabilidade do estado determinado. Além disso, nesse modelo experimental, a diferenciação das células determinadas levaria a formação de primórdios de gemas ou raízes, cuja estabilidade estrutural e funcional pode ser mantida durante a vida da planta (KERBAUY et al.,1986).

A micropropagação tem sido usada para multiplicação de muitas espécies de plantas, mas sua utilização está limitada de maneira mais ampla, pela alta freqüência de danos e/ou perda de plantas, quando estas são transferidas para condições *ex vitro* (POSPÍSILOVÁ et al., 1999). Durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais: em ambientes fechados, sem trocas gasosas, com alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e utilizando açúcares do meio como fontes de carbono e energia (PREECE e SUTTER, 1991; SCIUTTI e MORINI, 1993; POSPÍSILOVÁ et al., 1999). Tais condições podem determinar a formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais, dificultando a aclimatização. As anormalidades geradas pela cultura *in vitro* são alterações na cutícula, cera epicuticular, não funcionalidade do aparato estomático e, conseqüentemente, perda expressiva de água das células e diminuição do processo fotossintético (MARÍN et al., 1987 e 1988; PREECE e SUTTER, 1991; DESJARDINS, 1995; POSPÍSILOVÁ et al., 1999 e 2000).

UFCG - BIBLIOTECA

Em muitas espécies, as folhas formadas *in vitro* não são capazes de manter o equilíbrio hídrico ocorrendo, assim, estresse hídrico e redução no crescimento (PREECE e SUTTER, 1991); além disso, pode ocasionar, também excessiva transpiração da parte aérea, em especial nas folhas, com absorção ineficiente e deficiente transferência de água entre as raízes e brotos; no entanto, o processo de aclimatização no gênero *Prunus* tem apresentado bons resultados com índice de sobrevivência variável de 84-93% (BORKOWSKA, 1985; CAMPANA et al., 1994; RADICE et al., 1999). Por outro lado, MARÍN et al. (1988) demonstraram que plantas micropropagadas de *Prunus cerasus* L. apresentavam xilema radicular contínuo e funcional. RUZIC et al.(1984) também verificaram,na micropropagação do porta-enxerto GF677, que a concentração de 2,0mg.L^{-1} de IBA (ácido-indolbutírico) demonstrou-se excessiva, promovendo a formação de calos na fase de enraizamento, enquanto. CAMPANA et al.(1994) observaram que para o porta-enxerto de *Prunus* Damas GF1869, enraizado *in vitro*, a sobrevivência das plantas foi afetada significativamente com a utilização de 5,0mg.L^{-1} de IBA. Para estes autores, a abundante formação de calos reduziu, de forma significativa as conexões vasculares das raízes formadas na base das microestacas; além disso, raízes foram ineficientes para suportar os requerimentos de evapotranspiração nas condições *ex vitro*. Para várias espécies, a utilização de altas concentrações de auxinas resulta na formação de calos e raízes anormais, afetando a sobrevivência dos explantes durante a aclimatização (WELANDER, 1983; AL-MAARRI et al., 1994; YEPES e ALDWINCKLE, 1994), *ex vitro* e *in vivo*. As folhas das plantas *in vitro* apresentaram diferenciação no mesofilo, quando comparadas com as folhas de plantas *in vivo*, indicaram redução do tecido paliçádico e lacunoso assim como redução da camada de cera da cutícula. Após oito semanas de aclimatização *ex vitro*, as folhas das plantas mostraram morfologia similar das folhas das plantas *in vitro*, porém com algumas características de plantas *in vivo*.

UFCG - BIBLIOTECA

2.1.2 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são importantes para o desenvolvimento vegetal, que vêm sendo considerados uma substância promissora para a preservação de fontes vegetais, e para a propagação comercial de plantas medicinais. A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, em virtude do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). As concentrações hormonais de BAP (2,0 $mg.L^{-1}$) e KIN (1,0$mg.L^{-1}$), utilizados na produção de brotos, obtiveram com grande sucesso nas cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum*) são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento, na maioria dos sistemas na micropropagação (CARVALHO, 2000). Para a planta crescer, ela necessita de luz a partir do sol, dióxido de carbono a partir do ar, água e minerais, inclusive nitrogênio, oriundo do solo. Os hormônios vegetais são substâncias orgânicas que desempenham função significativa na regulação do crescimento; alguns são produzidos em um tecido e transportados para outro tecido, onde produzem respostas fisiológicas específicas, enquanto outros atuam dentro deste tecido. Os hormônios são ativos em quantidades muito pequenas. No sistema caulinar de um ananaseiro (*Ananás comosus* L) para o uso prático da micropropagação é necessário se otimizar as condições de cultura para espécie ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam para a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in vitro,* estão os fitorreguladores, em especial as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP), 6-y,y-dimetilamino ou kinetina (KIN) thidiazuron, N-fenil-N-,2,3-tiadiazol-5,1- e uréia (TDZ); (LEONTIEV-ORLOV et al.,2000; PÉREZ-TOMERO et al., 2000).

2.1.3 Citocininas

OVERBEEK descobriu que a água de coco (*Cocos nucifera*), que é o endosperma líquido, continha um potente fator de crescimento, diferente de qualquer outro conhecido naquela época. Este fator, ou fatores, acelerava muito o desenvolvimento de embriões nas plantas e promovia o crescimento de tecido e células isoladas *in vitro*. A descoberta de Van Overbeek exerceu dois efeitos: estimulou o estudo de tecidos vegetais isolados e lançou a pesquisa de outros reguladores de crescimento vegetal (EICHHORN, 1994).

O meio básico para a cultura de tecidos de células vegetais contém açúcar, vitaminas e vários sais. No início da década de 50, SKOOG et al.(1962) mostraram que o segmento de caule de uma planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cresceu, de início, naquele meio de cultura, mas este crescimento foi lento e depois parou. Aparentemente, algum estímulo de crescimento presente, originalmente nos caules de tabaco, foi consumido. A adição de AIA ao meio de cultura, não causou qualquer efeito; entretanto, quando se adicionou água de coco ao meio de cultura, as células começaram a se dividir e o crescimento do caule de tabaco foi retomado.

SKOOG et al.(1962), iniciaram uma busca intensa para identificar o fator de crescimento existente na água de coco. Após muitos anos, obtiveram êxito ao produzir um fator de crescimento mil vezes purificado que, de maneira lamentável, não era isolado. A cinetina, que sem dúvida não ocorre de maneira natural em plantas, tem estrutura relativamente simples e os bioquímicos foram capazes de sintetizar numerosos compostos relacionados aos que se comportavam como citocininas.

As citocininas têm sido isoladas a partir de diferentes espécies de plantas, nas quais são encontradas principalmente em tecidos em divisão ativa, incluindo sementes, frutos, folhas e pontas de raízes e, também, em exsudados de seiva. Citocininas têm sido identificadas, ainda, em duas plantas vasculares sem sementes: *Equisetum arvense e Dryopteris crassirhizoma*. As citocininas são

básicas para métodos de cultura de tecidos, e extremamente importantes para a biotecnologia. O tratamento de gemas laterais com citocininas freqüentemente causa o seu crescimento, mesmo na presença de auxinas modificando, assim, a dominância apical. A benzilaminopurina (BAP) sempre é muito eficaz na multiplicação de explantes e indução de gemas adventícias, além de ser mais barata que outras citocininas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As citocininas como a 6-benzilaminopurina (BAP) promovem a formação de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, ao passo que a 6-furfurilaminopurina ou cinetina (CIN) e o 6-y,y-dimetilalaminopurina (2iP) permitem o crescimento normal sem brotações múltiplas (HU e WANG, 1983). De forma geral, as citocininas promovem produção de partes aéreas mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós e a problemas na fase de enraizamento (LANE, 1979; LESHEM et al., 1988). Outros efeitos residuais atribuídos ás citocininas são observados nas plantas após o transplantio. Menor capacidade de sobrevivência, quebra da dominância apical, deformação de frutos e manutenção de um hábito arbustivo, são algumas dessas características (DEBERGH e MAENE 1981).

CHHAPPEL e MAUNEY (1967) cultivaram meristemas de *Gossypium hirsutum*, embora também não observaram crescimento normal, produzindo então, o desenvolvimento de primórdios foliares.

BAJAJ e GILL (1986) cultivando apicais colinares (1cm) e meristemas (1mm) de *Gossypium arboreum, Gossypium hirsutum* e interespecíficos híbrido em meio MS suplementado com as combinações diferentes de AIA, ANA, kinetina e BAP, observaram que os meristemas no MS + 0,5mg.L^{-1} de AIA+ que 2,0mg,L^{-1} de kinetina formaram calo. As gemas apicais se prolongaram, o que formou gemas axilares, sendo obtidos os melhores resultados com 2,0mg.L^{-1} de kinetina.

O thidiazuron (TDZ) foi originalmente desenvolvido para ser utilizado como desfolhante do algodoeiro (*Gossypium hirstum* L.); esta substância tem mostrado efeito semelhante ao das citocininas, quando aplicado em concentrações muito reduzidas 0,01mg.L^{-1}, (MALIK e SAXENA 1992).

Na maioria dos casos, o TDZ apresenta resultados superiores em relação às outras citocininas, na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. Segundo Malik e Saxena (1992), entre as várias citocininas ou compostos com atividade tipo citocinina testados, o TDZ foi o mais afetivo da indução de formação de brotos em cultura de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.).

Muitos trabalhos têm sido realizados com diversas dosagens de TDZ em várias plantas (KODJA et al., 1998; SUTTER et al.,1997; WATAD et al., 1996; SUDARSONO e GOLDY, 1991). Cid et al. (1997) não viram diferença significativa de TDZ nas dosagens 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0M, para número de brotos em *Miconia* sp.

SUJATHA e REDDY (1998) obtiveram maior número de brotos de *Ricinus communin* L. utilizando TDZ nas dosagens de 1,0 e 0,01mg.L^{-1}, a partir de embriões axilares. Da mesma forma, MOHAMED et al. (1993), trabalhando com brotações de inflorescência de cebola e utilizando TDZ nas concentrações de 0 a 0,1M, observaram maior número de brotações nas menores 0,01mg.L^{-1} concentrações; no entanto, HAN et al. (1997) notaram que o TDZ acima de 0,01mg.L^{-1}, não se mostrou efetivo na multiplicação de brotos de *Ficus benjamina* Wall, resultados esses confirmados por NAYAK et al. (1997), em orquídea e ainda por YOO et al. (1996) em *Hibiscus sp.*

UFCG - BIBLIOTECA

2.1.4 Indução à organogênese

O cultivo de células vegetais teve início nos anos 30, mas logrou maior impulso nos anos 70, com crescente interesse não apenas na aplicação a nível comercial (micropropagação) mas, também, para auxiliar nos programas de melhoramento genético. As técnicas de cultura de tecidos são utilizadas no desenvolvimento de diferentes cultivares superiores de plantas, em uma ou outra etapa do melhoramento, não necessariamente no desenvolvimento direto de novas cultivares, e podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento, em suas diferentes fases. Da mesma forma, as técnicas da

engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação requer que se possa cultivar, *in vitro*, protoplastos, células e tecidos de plantas que se vão transformar e que, com as células transformadas, se possa regenerar plantas; além disso, a freqüência de transformação pode ser significativamente aumentada através da indução de organogênese na região do meristema apical, isto é, através da indução de uma multibrotação (ARAGÃO et al., 1998).

A técnica do cultivo de tecido se baseia sobretudo no aproveitamento da totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1999). Todos os meios de cultivo *in vitro* são constituídos de macro e micronutrientes, uma fonte de carbono, vitaminas, fontes férricas e, na maioria dos casos, reguladores de crescimento, no caso do algodão CNPA Precose verificou-se, o efeito da origem das gemas, fonte de carbono e agente solidificante sobre a micropropagação da cultivar, onde os explantes obtidos a partir de gemas laterais apresentaram maior dificuldade para rezogênese que os explante de gema apical (CARVALHO, 1997). A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários autores (KAMAT e RAO, 1978) e incrementada nos últimos anos, devido a vários fatores, entre eles dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando a coleta de plantas saudáveis (KE et al. 1985). Essas técnicas de cultura de tecidos são utilizadas no desenvolvimento de diversas cultivares superiores de plantas, incluindo-se as cultivares de algodão, não necessariamente no desenvolvimento direto de novas cultivares e podem oferecer outras alternativas aos programas de melhoramento, em suas diferentes fases (CARVALHO, 1999). A micropropagação de plantas tem proporcionado uma maneira de multiplicação rápida de genótipos selecionados, favorecendo a comercialização de mudas de várias espécies, principalmente frutíferas, florestas e ornamentais (BONNETT e TORREY 1965)

UFCG - BIBLIOTECA

No Brasil, até alguns anos atrás, plantas e flores só se propagavam a partir de estacas, mudas, bulbos e sementes. Nos últimos anos, porém, a micropropagação vem ganhando espaço bastante significativo entre os produtores, que evitavam adquirir mudas de laboratórios devido, sobretudo, ao elevado custo unitário. Com a crescente competitividade de mercado, que vem exigindo cada vez mais plantas padronizadas, com ciclo homogêneo e isentas de doenças, a micropropagação vem conquistando espaço bastante grande, principalmente na propagação de espécies, com melhores valores de mercado (HUSTADO, 1987).

A micropropagação *in vitro* é um tipo de reprodução vegetativa ou assexuada de grande importância para fixação do conteúdo genético das plantas, visto que possibilita a formação de clones. Um clone pode ser definido como um conjunto de indivíduos geneticamente uniformes, derivado de uma única planta e que se propaga por meios vegetativos, como estacas, garfos e gemas, entre outros (HUSTADO e MERINO, 1987).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis. Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. O verdadeiro desafio, portanto, está no material vegetal em si e na sua manipulação antes de se isolar o explante inicial e em todos os passos, até o transplantio da planta produzida (SELBY e HARVEY 1985)

Gemas adventícias são aquelas originadas em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta, cuja formação ocorre de maneira direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vitro*, mas que, em geral, não se expressa. Esses tecidos incluem câmbio vascular, base de pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmentos de raízes, entre outros. Organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. A partir de células não organizadas do

UFCG/BIBLIOTECA

calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. As multiplicações sucessivas podem ocorrer pela subdivisão do calo e manutenção de um sistema adventício ou alterando o processo para a proliferação axilar sem a passagem por calo; seja qual for a maneira, as partes aéreas produzidas são individualizadas e transplantadas (KOCHBA e SAFRAN 1972).

A organogênese direta, isto é, a regeneração de plantas a partir de tecidos não meristemáticos sem passagem pela fase de calo, é possível em alguns casos. Grande capacidade de regeneração direta de partes aéreas pode ser obtida, por exemplo, em discos foliares de violeta africana em meios MS, mesmo na ausência de fitorreguladores. A organogênese direta é facilmente induzida em entrenós e segmentos de gavinha de maracujá (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*) em meio MS na presença de BAP, e as gemas regeneradas podem ser utilizadas em seguida, para, a multiplicação de plantas. A fidelidade genética e, nesses casos, bastante alta devido, sem dúvida, ao fato de que as gemas adventícias se originam de uma ou duas camadas de células apenas ou, em alguns casos, a partir de uma única célula da epiderme, como no caso do Tupipa (WHIGHT e ALDERSON 1980).

Com base no meio de WHITE (1963) e por teste de suplementação com extrato de folha de fumo, MURASHIGE e SKOOG definiram, em 1962, um meio básico para cultura de tecidos vegetais (conhecido como meio MS em sua homenagem). O desenvolvimento de plantas pode ser realizado de duas maneiras: vegetativamente (clonagem), e de forma generativa (através de sementes). A multiplicação de plantas *in vitro* para formação de órgão é realizada com células caracterizadas por sua capacidade de regeneração. A capacidade de regeneração é determinada pelo genótipo, pelas condições ambientais (adição de nutrientes, reguladores de crescimento e condições físicas) e pelo desenvolvimento de planta. Assim, diversos pesquisadores obtiveram êxito no desenvolvimento de plantas através da organogênese.

ARELLO (1991), obteve através de técnicas de cultura de tecido, elevado número de plantas sadias e livres de doenças, em quatro cultivares de *Gérbera jamesonii* (*Appel Bloesen, Marleen, Clementine e Pimpernel*). Os explantes foram cultivados em meios "MS" modificado e suplementado com todas as combinações

possíveis de BAP-6-benzilaminopurina (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0mg.L^{-1}); AIA-0,5mg.L^{-1}) e KIN-Kinetina (0,0 e 2,0mg.L^{-1}). Com estas concentrações obtiveram plantas.

CASTRO (1995), conseguiu segmentos nodais com cultivares de batata-doce (*Ipomoeba batatas* L.), cujos ápices caulinares foram inoculados em meio "MS" suplementado com ANA+BAP+KIN+AG3 e ANA+BAP+AG3. As cultivares RC-1.8, MFT (Mãe-de-Família També) TR3-473 e Arroba, produziram plântulas de alturas similares, porém com diferentes taxas de regeneração. A micropropagação dessas plântulas por meio de segmentos nodais inoculadas em meio MS contendo 1,0 mg.L^{-1} de AG3, não mostrou diferenças entre as cultivares.

FIGUEIREDO (1991), observou que explantes foliares e caulinares de *Datura insignis* Barb Rodr, foram cultivados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. De acordo com as respostas morfogênicas obtidas, os ensaios se mostraram propícios à calogênese e à multiplicação de gemas. Os meios com concentrações de BAP (1,0mg.L^{-1}) mais elevadas promoveram a indução e a produção de calos nos dois explantes (foliares e caulinares), enquanto a rizogênese foi favorecida em meios com baixas concentrações de BAP (0,1mg.L^{-1}. O desenvolvimento de gemas axilares a partir de segmentos nodais foi observado em meios com baixas 0,1mg.L^{-1}concentrações de ANA.

CUNHA et al. (1996) desenvolveram inúmeras pesquisas sobre a produção e o melhoramento de Kiwi (*Actinidia deliciosa*), utilizando a cultura de tecidos, com a necessidade de atender à crescente demanda por mudas desta cultura. Testaram-se as variedades Hayward e Allisar na indução à organogênese, em que os resultados indicam que a região da base da folha, próxima ao pecíolo, foi a que apresentou a maior taxa de formação e crescimento de calos, enquanto a obtenção de gemas foi possível, mas em menor quantidade de (1,0mg.L^{-1}) devido, logicamente, à elevada concentração 4,0mg.L^{-1}de auxina, promovendo maior formação de calos nas gemas axilares.

PINTO et al. (1989) objetivaram a proliferação *in vitro* de gemas axilares da porta-enxerto trifoliata (*Poncirus trifoliata* L.) através da cultura de segmentos

nodais e internodais, obtidos de planta adulta. Todas as combinações possíveis de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftateno-acetico) foram testadas nas concentrações de 0,0: 0,1 e 1,0mg.L^{-1} e cinetina a 0,0: 0,1 e 0,5mg.L^{-1} adicionadas ao meio MS com 4% de sacarose. A melhor proliferação de brotos em segmentos nodais foi conseguida em presença de 1mg.L^{-1} de BAP + 0,1mg.L^{-1} de ANA. A cinetina usada em todos os tratamentos não apresentou efeito algum e não ocorreu proliferação nos segmentos internodais.

SILVA et al. (2000) estudando o estabelecimento de um protocolo eficiente via organogênese, para a obtenção de plantas de mandioca (*Manihot esculenta .Cranzt.*) da variedade "Trouxinha", utilizaram técnicas de indução de calos em folhas jovens, que foram inoculadas em meio básico MS, suplementado com 5; 10; 15; e 20;mg.L^{-1} de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacetico), ou 1; 2; 4 e 6mg.L^{-1} de ANA (ácido-do-naftalenoacetico), mas constataram organogênese indireta de brotos; por sua vez, os calos com ausência de hormônios e os tratamentos com 1mg.L^{-1} de ANA, indicaram apenas organogênese.

LOH et al. (1989) estudaram partes diferentes de mudas de goiaba (*Psidum guajava* L.) e segmentos nodais de plantas enxertadas, como explantes em cultura *in vitro*. Uma porcentagem (75 - 100%) de regeneração dos brotos foi obtida com explante de hipocótilo e segmentos nodais cultivados em meios MS, com ou sem BAP. O teor ótimo (2,0mg.L^{-1}) de BAP apresentou brotos em segmentos nodais em apenas 1 ano de cultivo.

BHANSALI e ARYA (1979) cultivaram segmentos de talo de lima doce (*Citrus limettioides*) em meio básico MS. A formação de embrióides aconteceu após 60 dias, contendo no meio um nível baixo de auxinas (0,1 e 0,2mg.L^{-1}) e um nível alto de citocininas (0,25 a 2,0mg.L^{-1}). O desenvolvimento de brotos aumentou quando o meio foi complementado com extrato de malte (5,0mg.L^{-1}). No mesmo estudo indução da organogênese constatou-se que a ausência de auxina reduziu o número de brotos e folhas verde, e foi completamente inibida na presença de 2,4D.

NAIR et al. (1984) estudaram a formação múltipla de brotos induzidos em folhas de *Annona squamosa Linn,* quando inoculadas em meio básico MS,

suplementado com BAP e KIN. Em combinação com o meio, as várias citocininas, produziram calo nos explantes, nas quais se observa, também, que os fatores ambientais afetavam a indução de brotos, cujo número máximo de brotos foi alcançado em temperatura de 27°C e intensidade luminosa de 100luz. Os autores observaram, ainda, que se desenvolveram raízes quando os brotos eram tratados individualmente, em meio com auxina. O potencial para organogênese é extenso dentro do gênero *Pyrus*, tornando-se oportuna sendo necessária à otimização de um protocolo de regeneração para diferentes cultivares, pois existe uma variação de resposta dentro deste gênero (NAYAK et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia, no Centro Nacional de Pesquisa do Algodão - CNPA, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, em Campina Grande, PB. Utilizaram-se sementes de algodoeiro das cultivares: BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó, e BRS-189-8H, produzidas no ano agrícola de 2003/2004, no município de Missão Velha, Estado do Ceará.

As sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito, a 1% de cloro ativo mais 1 gota de polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20, em agitação, durante 20 minutos e em seguida de lavagem tripla em água deionizada esterilizada em condições estéreis da câmara de fluxo laminar; posteriormente, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio básico de MURASHIGE e SKOOG (1962) meio MS, devidamente vedados e mantidos em sala de crescimento regulada a temperatura de 28°C, fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro) e intensidade luminosa de 30μmol.m^{-2}.s^{-1}, onde permaneceram durante 25 dias para obtenção das plantas matrizes (Figura 1); apos este procedimento foram retirado os explantes das plantas matrizes e cultivo dos em meio MS suplementado com reguladores de crescimento, em diferentes combinações e dosagens (Tabela 2).

UFCG - BIBLIOTECA

Foto: Maria Rocha

FIGURA 1. Produção de plantas matrizes em meio MS para serem utilizadas nos ensaios de indução do superbrotamento (organogênese)

Para facilitar a preparação do meio MS, os nutrientes são agrupados em diferentes soluções concentradas, sais minerais compostas orgânicos e vitaminas (Tabela 1).

Na preparação de 1L do meio MS, utilizam-se as quantidades das soluções das concentrações indicadas abaixo:

- Solução A –100mL
- Solução B –1mL
- Solução C –10mL
- Solução D –10mL

TABELA 1. Composição de sais minerais, componentes orgânicos e vitaminas dos meios básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

Solução A (Macronutrientes)	**$mg.L^{-1}$**
NH_4NO_3	16.500
KNO_3	19.000
$CaCl_2*2h_2O$	4.400
$MgSO_4*7H_2O$	3.700
KH_2PO_4	1.700
Solução B (Micronutrientes)	**$mg.L^{-1}$**
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4*2H_2O$	16.900
$ZnSO_4*7H_2O$	8.600
KI	830
$Na_2MO4*2H_2O$	250
$CuSO_4*5H_2O$	25
$CoCl_2*6H_2O$	25
Solução C (Fonte de Ferro)	**$mg.L^{-1}$**
$Na_2EDTA*2H_2O$	3.725
$FeSO_4*7H_2O$	2.785
Solução D (Vitaminas e Outros Suplementos Orgânicos)	**$mg.L^{-1}$**
Mioinositol	10.000
Tiamina-HCl	**10**
Piridoxina - HCl	**50**
Ac. Nicotínico	50
Glicina	200

Nos ensaios de multiplicação dos nós cotiledonares, estudou-se o efeito de diferentes combinações e concentrações dos reguladores de crescimento empregados, que consistiram de:

Citocininas

- ✓ BAP (6- bencilaminopurina)
- ✓ KIN (6- y,y- dimetilamino ou kinetina)
- ✓ TDZ (thidiazuron), (N-fenil – N´-1,2,3- tiadiazol-5,1 – uréia)

Para o meio de indução da organogênese, foram utilizados sais minerais do meio MS, vitaminas e compostos orgânicos (Tabela 1). A preparação das soluções concentradas de citocininas é realizada dissolvendo-as previamente em ácido clorídrico a 1N, antes de se adicionar água destilada.

Concentrações das citocininas adicionadas aos meios de cultivo para indução da organogênese, correspondentes a cada caso, estão na (Tabela 2).

TABELA 2. Combinações de citocininas adicionadas ao meio básico MS

Meios	Citocininas		
	TDZ($mg.L^{-1}$)	BAP($mg.L^{-1}$)	KIN($mg.L^{-1}$)
T_0 + MS			
T_1 + MS		0,5	
T_2 + MS		1,0	
T_3 + MS		2,0	
T_4+ MS		2,5	
T_5 + MS		3,0	
T_6 + MS		2,0	1,0
T_7 + MS		2,0	2,0
T_8 + MS		2,5	2,0
T_9 + MS		2,5	2,5
T_{10} + MS		3,0	3,0
T_{11} + MS	1,00		1,0
T_{12} + MS	2,00		2,5
T_{13} + MS	0,25		
T_{14} + MS	0,50		
T_{15} + MS	1,00		
T_{16}+ MS	0,25		0,2

3.1 Indução da organogênese

O explante estudado neste trabalho constou de gemas cotiledonárias dormentes, originadas a partir de plântulas com 25 dias após o plantio. Na câmara de fluxo laminar, com auxílio de instrumentos cirúrgicos esterilizados, os cotilédones e o meristema apical foram excisados e descartados. Assim, cada explante tinha duas gemas axilares dormentes. As gemas cotiledonares dormentes foram inoculadas em meio básico MS MURASHIGE e SKOOG, (1962) suplementado com as seguintes combinações de BAP, KIN e TDZ, em tubos de cultivo dando, ao todo, dezessete diferentes combinações. Essas diferentes combinações de meio foram designadas T_0 a T_{16}. Todos os meios foram suplementados com 3% de sacarose e 0,55% de Agar e o pH foi ajustado para 5,7-5,8 antes da autoclavagem, a 120°C. Em todos os casos, a incubação foi mantida a 25+28°C, comum a intensidade luminosa de 30μmol m^{-2} s^{-1}e um fotoperiodo de 16h no claro e 8h no escuro. Foram utilizados 10 tubos por tratamento, com um explantes por tubos. Após 40 dias, os explantes foram avaliados e somente aqueles que formavam mais do que dois brotos por explante foram considerados como indução de múltiplo broto.

A análise estatística foi realizada em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 4 x 17 (4 cultivares e 17 meios) com dez repetições (explante em cada tubo) para cada tratamento, cujos parâmetros de avaliação foram: número de brotos por explante (BE) e comprimento de brotos (CB). Para a análise de variância, os dados foram ser transformados para $\sqrt{x+1}$, utilizando-se o "Sistema para análise estatística em genética" SAEG (1993), versão 5.0, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Explante do nó cotiledonário

Na Tabela 3 encontra-se o resumo da análise de variância, no qual se observam efeitos significativos em todas as fontes de variação estudadas, inclusive sua interação para a variável número de brotos, enquanto para altura de brotos apenas, efeito significativo para a fonte de variação meios de cultivo.

TABELA 3. Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) do número de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB) de explantes de algodoeiro de pluma colorida e tradicional, cultivados em meio de MS com diferentes concentrações hormonais

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		N B	C B
Cultivares (C)	3	0,22**	0,011^{ns}
Meios de cultivo (M)	16	10,28**	13,75**
(C x M)	48	0,046**	0,025^{ns}
Resíduo	612	0,032	0,016
CV (%)		10,23	11,35

^{ns} Não significativo

** Significativo (P< 0,01)

De acordo com os resultados apresentados Tabela 4, obtiveram-se, ao se utilizar o nó cotiledonar, plantas sadias superbrotamentas, com excelente índice de superbrotamento. Os melhores resultados ocorreram na maioria das cultivares estudadas, quando o explante utilizado foi cultivado em meio MS suplementado com BAP, isolado ou associado a KIN. CARVALHO (2000) utilizou a cultivar CNPA 7H com as combinação das duas citocininas, os resultados foram semelhantes, com a combinação de BAP e kinetina, que induziu maior número de brotos em relação a outros fitormônios

Quando se adicionou o BAP isoladamente ao meio MS, nas concentrações 1mg.L^{-1} e 2mg.L^{-1}, obteve-se superbrotamento satisfatório para explantes da cultivar BRS-200, o mesmo ocorrendo para a 6M-Mocó, quando a concentração foi de 2mg.L^{-1} de BAP, superando os demais meios a que aquela citocinina foi adicionada isoladamente; no entanto, o meio MS suplementado com 2mg.l^{-1} de BAP associado a 1mg.l^{-1} de KIN (T_6) garantiu maior número de brotações por explante em todas as cultivares estudadas (Figura 2), não diferindo estatisticamente da cultivar BRS-Verde, quando explantes foram cultivados no meio em que o BAP foi adicionado isoladamente na concentração de 1mg.L^{-1} de BAP (T_2); da mesma forma e nas cultivares BRS-200 e BRS-187-8H, o número de brotações por explante obtido no tratamento (T_6) não diferiu daqueles obtidos nos meios em que o BAP foi acionado isoladamente, nas concentrações de 1mg.L^{-1} de BAP (T_2) e 2mg.L^{-1} de BAP (T_3) nem no meio MS suplementado 2,5mg.L^{-1} de BAP associado 2,5mg.L^{-1}de KIN (T_9) (Tabela 4), enquanto para a cultivar 6M-mocó o número de brotação obtido no tratamento T_6, não diferiu dos encontrados nos tratamentos (T_3), (T_9 e T_8), (meio MS suplementado com 2,5mg.L^{-1} de BAP, associado a 2,0mg.L^{-1} de KIN). Em outros estudos a indução de superbrotamento foi também obtido em *Vanilla walkeriae* quando por ocasião da combinação de BAP e Kinetina na presença de caseína hidrolisada (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O efeito diferencial entre várias concentrações de BAP na indução de múltiplos brotos com origem no nó cotiledonar, também tem sido reportado em Glycine (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000).

As taxas de multiplicação observadas podem ser consideradas adequadas para a micropropagação dessas cultivares. Os resultados verificados para o número de brotos por explante estão dentro dos valores citados na literatura para diferentes espécies (NAIR, 1984; PÉREZ-TORNERO et al., 2000). Na multiplicação *in vitro* de pessegueiro, Chhappel e Mauney (1967) observaram variação de 1,3 a 9,9 brotos por explante. Com relação ao efeito da citocinina (BAP) na proliferação de brotos (PÉREZ-TORNERO et al. 2000) mostraram que a

taxa de multiplicação *in vitro* foi superior para o porta-enxerto de *Prunus capdeboseq,* nas concentrações de 1,0-2,0mg.L^{-1} de BAP.

ANDRADE et al. (2003) em seu estudo com micropropagação da aroeira, constaram, ao utilizarem o hormônio BAP que, a partir de certa concentração, ocorre redução no desenvolvimento do vegetal. ANDRADE et al. (2003) justificam que, quando utilizadas em determinada concentração e de acordo com a espécie as citocininas que estimulam a produção de partes aéreas, provocam efeito tóxico que se caracteriza, dentre outros, pela falta de altura das culturas; portanto, conforme LU et al., 2000, DZAZIO et al. (2003), concentrações de BAP devem ser adequadas para cada cultivar, otimizando o processo para a obtenção de brotações de boa qualidade.

Os meios em que se empregou a TDZ isolada ou associada a KIN, não promoveram superbrotamento satisfatório em nenhuma das cultivares estudadas (Figuras 4 e 5), apresentando número de brotos semelhante ou inferiores ao obtido pela testemunha (T_0), não se lhe adicionando hormônio; comportamento idêntico a este também foi verificado em explantes cultivados em meio MS suplementado com BAP isolado na concentração de 0,50mg.L^{-1} (T_1) e no meio suplementado com 3,0mg.L^{-1} de BAP, associado a 3,0mg.L^{-1}de KIN (T_{10}).

Com relação às cultivares, observaram-se diferenças significativas entre elas, quando seus explantes foram cultivados nos meios em que se obteve superbrotamente satisfatório, com destaque para as cultivares BRS-Verde, BRS-200 e BRS-187-8H, que superaram a 6M-Mocó nos meios (T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7, T_8 eT_9.). No meio T_5 ocorreu destaque nas cultivares BRS-Verde, BRS-187-8H. A cultivar 6M-Mocó, independente do meio utilizado, apresentou os menores valores de superbrotamento dos seus explantes, demonstrando responder menos à adição de fitohormônios ao meio de cultivo; fato semelhante ocorreu com (KEULEMANS e DEWITTE 1994) quando, trabalhando com macieira cv. Gloster obtiveram média de 1,8 e 2,3 brotações por explante, em ápices cotiledonares e cotilédones feridos, respectivamente; já (CABONI et al.,2000), obtiveram média de 2,8 brotações por explante no porta-enxerto de macieira Jork-9, e utilizando ápices de brotações ou gemas axilares, aos 60 dias após o início do experimento. Ao

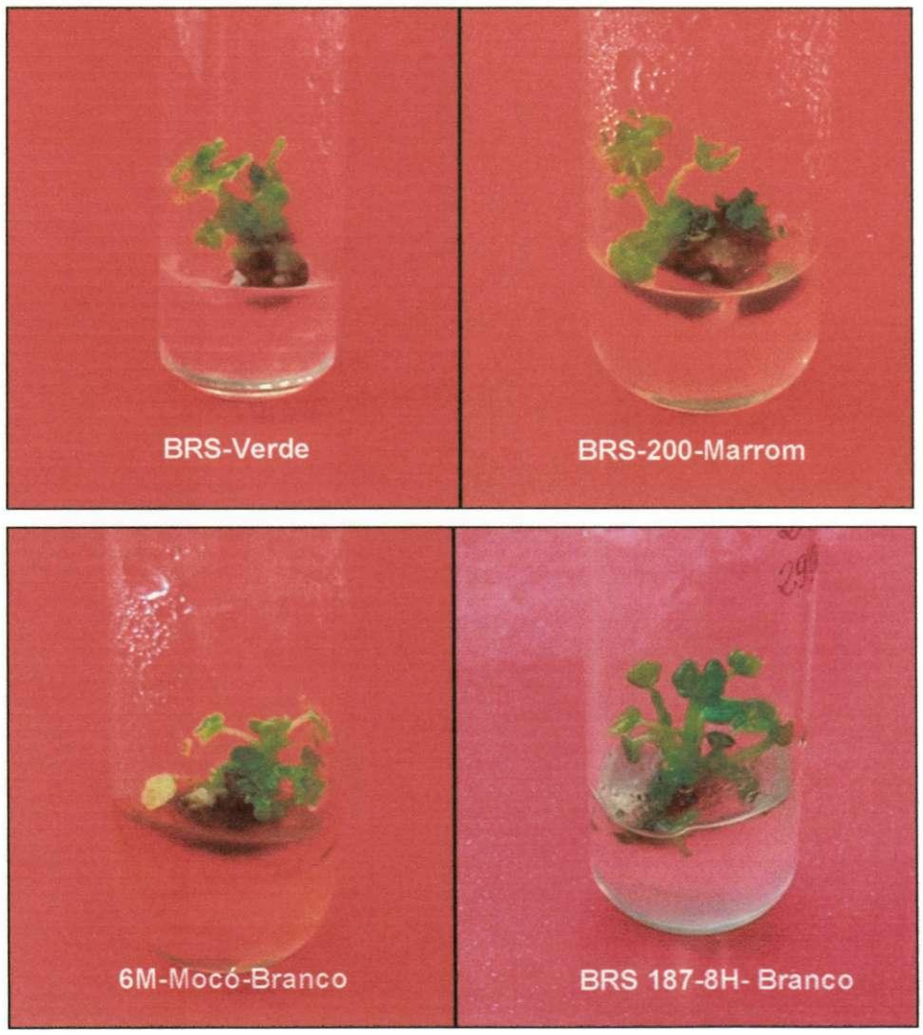
utilizarem esses mesmos hormônios para a micropropagação da babosa (ARAÚJO et al.,2003) obtiveram, por explante, meristema apical, um excelente brotamento; já NICOLOSO et al.(2003) utilizando apenas o hormônio BAP para a micropropagação da grápia (*Apuleia leiocarpa* L.), obtiveram grande índice de brotos.

TABELA 4- Valores médios do número de brotos emitidos de nós cotiledonárias de quatro cultivares de algodoeiro, cultivadas em meio MS com diferentes concentrações hormonais

TRATAMENTOS	Superbrotamento[1]			
	BRS-Verde	BRS-200	6M-Mocó	BRS-187-8H
T_0- MS	1,7650 eA	1,885 dA	1,7312 eA	1,7321 dA
T_1- MS + 0,50mg.l^{-1}BAP	1,1433 eA	1,0828 fA	1,0000 fA	1,0000 eA
T_2- MS + 1,0 mg.l^{-1}BAP	2,4918 abA	2,5673 aA	1,0246 fB	2,5723 abAB
T_3- MS + 2,0 mg.l^{-1}BAP	2,4156 bcA	2,6147 aA	2,0604 aC	2,5567 abAB
T_4- MS + 2,5mg.l^{-1}BAP	2,4130 bcdA	2,2882 bA	1,8981 bcdB	2,3252 cA
T_5- MS + 3,0mg.l^{-1}BAP	2,3187 cdA	2,1196 cB	1,8409 cdeC	2,4304 bcA
T_6- MS + 2,0 mg.l^{-1}BAP+1,0 mg.l^{-1}KIN	2,6378 aA	2,6083 aA	2,1078 aB	2,6601aA
T_7- MS+ 2,0 mg.l^{-1}BAP +2,0 mg.l^{-1} KIN	2,2 818dA	2,3663 bA	1,8480 cdeB	2,3238 cA
T_8- MS + 2,5 mg.l^{-1}BAP +2,0 mg.l^{-1} KIN	2,3022 dA	2,3639 bA	1,9805 abcB	2,3594 cA
T_9- MS + 2,5 mg.l^{-1}BAP +2,5 mg.l^{-1} KIN	2,4619 bcdA	2,5227 aA	2,0385 abB	2,5485 abA
T_{10}- MS + 3,0 mg.l^{-1}BAP +3,0 mg.l^{-1} KIN	1,0000 fA	1,0000 fA	1,0000 fA	1,0000 eA
T_{11}- MS + 1,0 mg.l^{-1}TDZ +1,0 mg.l^{-1} KIN	1.0000 fA	1,0000 fA	1,0000 fA	1,0000 eA
T_{12}- MS + 2,0 mg.l^{-1}TDZ+2,5 mg.l^{-1} KIN	1,0516 fA	1,0725 fA	1,0000 fA	1,0000 eA
T_{13}- MS + 0,25 mg.l^{-1}TDZ	1,6173eBC	1,5892 eC	1,7722 deAB	1,8183 dA
T_{14}- MS + 0,50 mg.l^{-1}TDZ	1,1194 fA	1,0000fA	1,0000 fA	1,0000 eA
T_{15}- MS + 1,0 mg.l^{-1}TDZ	1,1353 fA	1,1036 fA	1,0732 fA	1,0000 eA
T_{16}- MS + 0,25 mg.l^{-1}TDZ+0,2 mg.l^{-1} KIN	1,1194 fA	1,0000 fA	1,0000 fA	1,0000 eA

[1] Dados transformados em y = $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas, pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 2. Brotos em meio MS suplementado com BAP (2,0 $mg.L^{-1}$) isolado ou associado a KIN (1,0$mg.L^{-1}$)

Para a variável comprimento dos brotos, constatou-se (Tabela 5) que o meio MS suplementado com 2,5$mg.L^{-1}$ de BAP (T_4) e com 2,0$mg.L^{-1}$ BAP + 1,0$mg.L^{-1}$ KIN (T_6), resultou em maior comprimento dos brotos, na maioria das cultivares empregadas. Para a cultivar BRS 187-8H, além dos meios já citados, aqueles suplementados com 3,0$mg.L^{-1}$ de BAP (T_5) e com 2,0$mg.L^{-1}$ de BAP, associados a 2,0$mg.L^{-1}$ de KIN (T_7) também garantiram maior altura de brotos. Os resultados aqui obtidos vêm reforçar, a exemplo de outros experimentos em que se utilizaram diferentes tipos de explante em que obteve bom alongamento

de brotos, que fato semelhante com MÁRCIA et al. (2003) quando utilizaram a macieira EM-9 como seu porta-enxerto, cultivados em meio MS suplementado com BAP (4,44µM) e ANA (0,54µM) que garantiu maior comprimento de brotos regenerado e verificaram diferença na regeneração, independente dos explantes e meios utilizados.

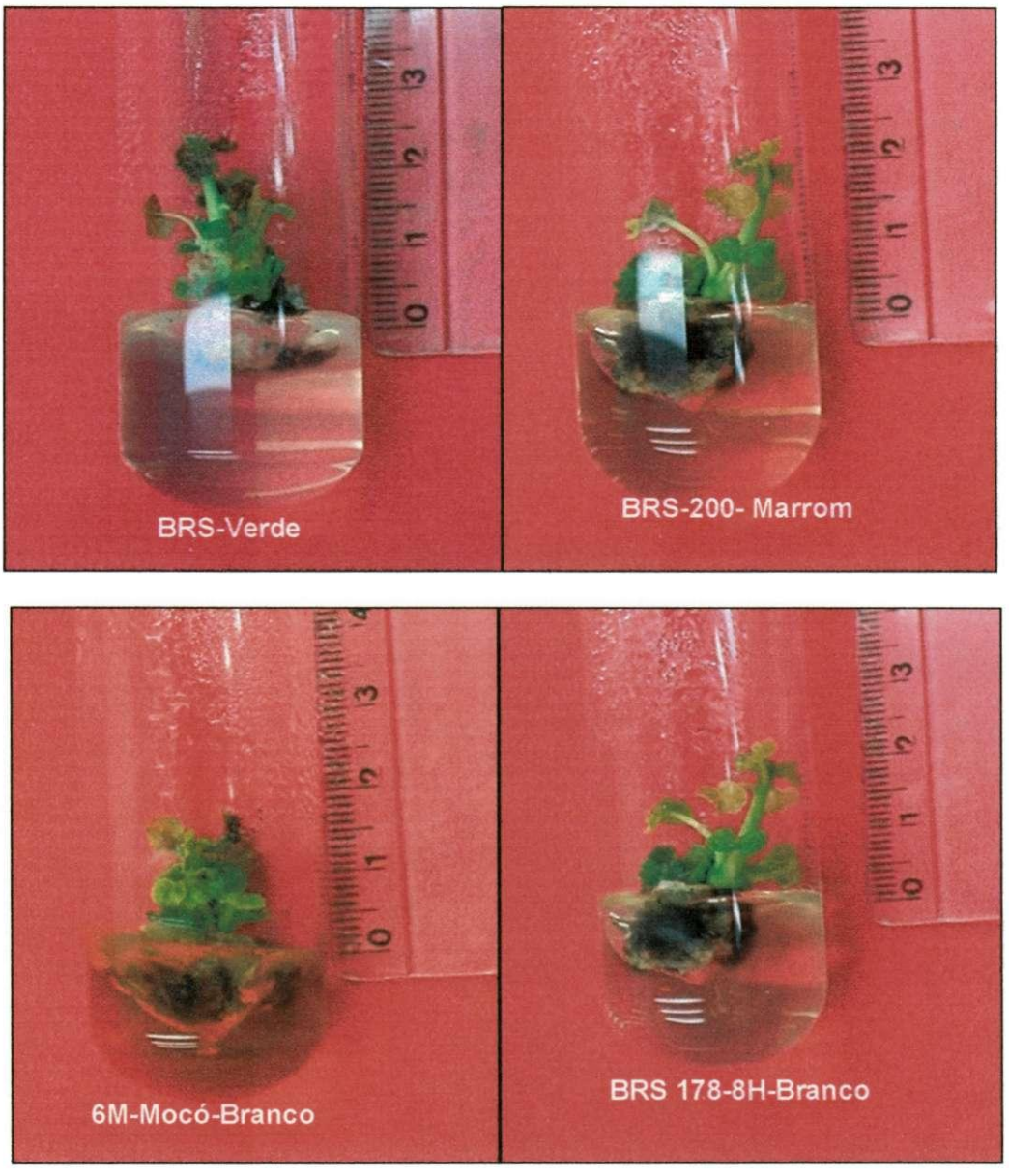
Na Tabela 5 se pode observar, também, ao se comparar as quatro cultivares estudadas para quase todos os tratamentos utilizados, que não ocorreram diferenças significativas com relação ao comprimento dos brotos. LEONTIEV-ORLOV et al (2000) em estudo com ameixa (*Psumunus domestica* L.), obtiveram maior comprimento dos brotos ao utilizarem BAP na concentração de 1,0mg.L^{-1}.

TABELA 5- Valores médios de altura de brotos originadas de explantes das quatro cultivares de algodoeiro, cultivados em meio MS com diferentes concentrações de fitohormônios

TRATAMENTOS	Altura de brotos (cm)[1]			
	BRS-Verde	BRS-200	6M-Mocó	BRS-187-8H
T_0- MS	1,7675 cA	1,9296 bcA	1,9319 bA	1,7888 cA
T_1- MS + 0,50mg.l^{-1}BAP	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 cA	1,0000 dA
T_2- MS + 1,0 mg.l^{-1}BAP	1,9164 bcA	1,9164bcA	1,9164bA	1,9164bcA
T_3- MS + 2,0 mg.l^{-1}BAP	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 cA	1,0000dA
T_4- MS + 2,5mg.l^{-1}BAP	2,2127aA	2,1307abA	2,0421abA	2,0354abA
T_5- MS + 3,0mg.l^{-1}BAP	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 cA	2,2136aA
T_6- MS + 2,0 mg.l^{-1}BAP+1,0 mg.l^{-1}KIN	2,2136aA	2,2136aA	2,2136aA	1,8124bcA
T_7- MS+ 2,0 mg.l^{-1}BAP +2,0 mg.l^{-1} KIN	1,8124bcA	1,8124 cA	1,8174 bcA	2,2136 aA
T_8- MS + 2,5 mg.l^{-1}BAP +2,0 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 dA
T_9- MS + 2,5 mg.l^{-1}BAP +2,5 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dB	2,1082 cA	2,0124 abAB	1,0000dB
T_{10}- MS + 3,0 mg.l^{-1}BAP +3,0 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0074 eA	1,0000 dA
T_{11}- MS + 1,0 mg.l^{-1}TAZ +1,0 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	1,0000 dA
T_{12}- MS + 2,0 mg.l^{-1}TAZ+2,5 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	1,0000 dA
T_{13}- MS + 0,25 mg.l^{-1}TAZ	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	1,0000 dA
T_{14}- MS + 0,50 mg.l^{-1}TAZ	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	11,0000 dA
T_{15}- MS + 1,0 mg.l^{-1}TAZ	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	11,0000 dA
T_{16}- MS + 0,25 mg.l^{-1}TAZ+0,2 mg.l^{-1} KIN	1,0000 dA	1,0000 dA	1,0000 eA	1,0000 cA

[1] Dados transformados em y = $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas, pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade



UFCG - BIBLIOTECA

FIGURA 3. Brotos em meio MS suplementado com BAP (2,5mg.L^{-1}) estimulou maior altura de brotos; com BAP (2,0mg.L^{-1}) associado com KIN (1,0mg.L^{-1})

Explantes cultivados em meios suplementados com BAP em concentração inferior a 1,0mg.L^{-1} e superior a 3,0mg.L^{-1} e com TDZ isolado ou associado a KIN, também apresentaram os menores valores de altura de plantas em todas as

cultivares estudadas verificando-se, nesses casos, a grande ocorrência de calos (Figuras 4 e 5).

O emprego do TDZ isolado ou associado a KIN, não promoveu superbrotamento nos explantes obtidos de plântulas das diferentes cultivares estudadas, apresentando valores inferiores e/ou semelhantes aos do meio isento de reguladores de crescimento (Testemunha – T_0). Os explantes cultivados nesses meios tenderam a produzir maior quantidade de calos em detrimento da formação de brotos. É provável que a ausência do efeito de TDZ sobre o número de brotos tenha sido devida a uma relação inversa entre número de brotos produzidos e dosagens de TDZ (HAN et al. 1997) verificaram que o TDZ a uma concentração acima de 0,01mg/L, não promoveu a multiplicação de brotos em *Fícus benjamina*. Esses resultados estão de acordo com YOO et al. (1996), na propagação de *Hibiscus syriacus* L. Segundo NAYAK et al. (1997), trabalhando com micropropagação de orquídeas, notaram que o TDZ possui efeito inibitório na regeneração de brotos, quando utilizado em concentrações acima do nível ótimo. Este efeito inibitório no crescimento de brotos ocorreu, sem dúvida, em virtude do seu efeito fitotóxico, conforme observado também por MALIK et al. (1992).

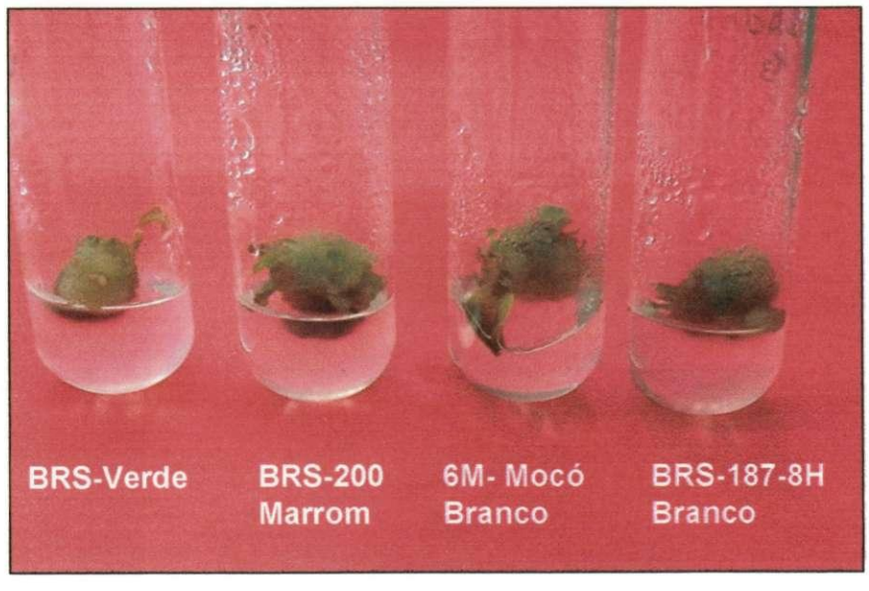


FIGURA 4. Formação de calo no meio MS suplementado com TDZ (1,0; 2,0 e 3,0mg.l^{-1}) associado a KIN (2,0mg L. $^{-1}$2,5 mg L^{-1}3,0mg L^{-1})

Nos meios em que se empregou o TDZ, (0,25mg.L^{-1}) isolado (Figura 5) ou associado com KIN, ocorreu presença de calo (Figura 4), nos explantes das quatro cultivares. Resultados idênticos aos apresentados e discutidos foram registrados por PESCADOR et al. (2000) ao afirmarem que a característica de viabilidade é favorecida por alta relação citocinina e pela adição de outros componentes ao meio nutritivo e, também, que o genótipo tem a facilidade de formar massa celular (calos friáveis) cuja coloração pode variar do amarelo ao bege; isto mesmo relata que a liberação de células a partir de calos friáveis é mais rápida que os calos compactos e as células podem apresentar morfologia, tamanho, coloração colação e ploidia variados, dependendo do período de cultivo e da composição do meio nutritivo.

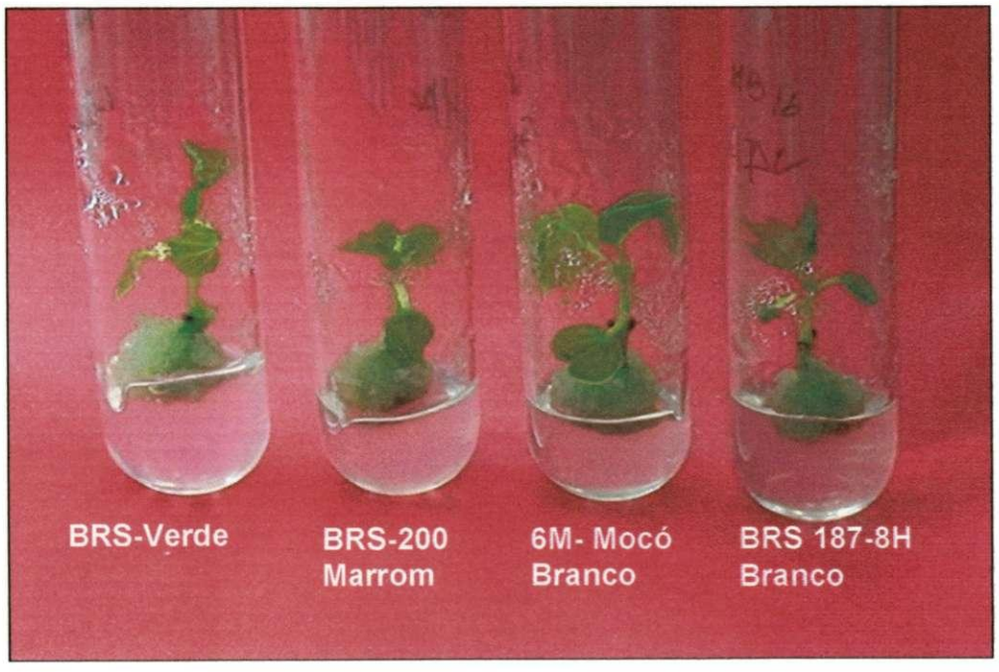


FIGURA 5. Presença de calo no meio com TDZ (Thidiazuron, 0,25mg.L^{-1})

5. CONCLUSÕES

- O meio MS suplementado com BAP (2,0mg.L^{-1}) isolado ou associado a KIN (1,0mg.L^{-1}), promove maior capacidade de regeneração e altura de brotos

- O meio MS suplementado com BAP (2,5mg.L^{-1}) estimula maior altura de brotos

- O meio MS suplementado com TDZ (1,0mg.L^{-1} , 0,50mg.L^{-1}e 0,25mg.L^{-1}) afeta a capacidade de regeneração de brotos e se formação de calos.

UFCG/BIBLIOTECA

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar Passe Crassane seedlings and cultivar Williams: Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amisterdam, v.58, p. 207-214, 1994.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. **Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All).** Disponível na Intermet: www.editora.ufla.br/revista724.17art.21.htm-8k. Acesso em 21 de janeiro de 2003.

ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. **Feijão Transgênico.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Brasília. v.1. 49p. 1998.

ARAÚJO, P.S.; SILVA, J.M.O.D.; NECKEL, C.A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A.C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. **Micropropagação da Babosa (*Aloe vera*).** Disponível na Internet: www.biotecnologia.com.br/bio/bio25/10.html-68K Acesso em 21 de janeiro de 2003.

ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de Gérbera jamesonii Bolus em Hook em cultura de tecido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.269-273, 1991.

BAJAJ, Y.P.S.; GIL, M.S. **Micropropagation and germlasma preservation of cotton (Gossypium spp) through shoot tip and meristem culture.**Indian v.24, p.561-567, 1986.

BHANSALI, R.R.; ARYA, H.C. Organogenesis in *Citrus limettioides* (sweet lime) callus culture Jodppus India. **Phytomorphology**, v.29, n.2, p.97-100,1979.

BONNETT, H.T; TORREY, J.G. chemical control of argan formation in root segmento of convolvulus cultivated *in vitro*. **Plant Physiology**. Washigton, v. 40, p.1228-1236, 1965.

BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.

CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamiento *in-vitro* del portainjerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia* x *Prunus spinosa*), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p. 85-94, 1994.

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA 39p, 1999. (Embrapa CNPA. Documento, 64).

,CARVALHO, J.M.F.C.; PEREZ, E.G.BC.P.; D. M.; SANTOS, W. Efeito da Origem das Gemas, Fonte de Carbono e Agente Solidificante sobre a Micropropagação da Cultivar de Algodão CNPA Precoce. **Rev. De Oleaginosas e Fibrosas**. v.1, nº2. Campina Grande: Embrapa CNPA, 81-86p, 1997.

CARVALHO, J.M.F.C.; SOUSA, D. M.; SANTOS, W. dos. Indução do Superbrotamento e Regeneração de Planta *in vitro* na Cultivar de Algodão CNPA 7H. **Rev. De Oleaginosas e Fibrosas**, v.4, nº2. Campina Grande: Embrapa CNPA, 61-65p, 2000.

CASTRO, O.F.A.; ANDRADE, A.G. Cultura *in vitro* de meristemas de batata-doce (*Ipomoeba batatas* (L) LAM). Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.7, p.917-922, 1995.

CHAPPEL , E.J.; MAUNEY, J.R. **Culture of apical meristem of *Gossypium hirsutum in vitro*.** Phyton, v.24 p.93-100, 1967.

CHRITIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis in vitro as a developmental process. **HortScience**, v.23, p.515-519, 1988.

CID, L.B.; GOMES, A.C.M.; COSTA, S.B.R. da; TEIXEIRA, J.B.; DA COSTA, S.B. R. Micropropagation of *Miconia* sp. A woody Melastomataceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.9, n.1, p.21-25, 1997.

COBONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot ápices in apple shoot culture. **Plant cell reports**, New York, v. 19, p .755-760, 2000.

CUNHA, R.; PUIGNAU, J.P. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: ed. 2. **Conservacion de germoplasma vegetal.** Monte Vídeo: IICA, p. 129 -138, 1996. (IICA - PROCISUR, Diálogo, 45)

DEBERGH, P.C.; MAENE, I.V.A scheme for comercial propagation of ornamental plasnts by tissue culture **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v 14, p.335-345, 1981.

DESJARDINS, Y. Photosynthesis *in vitro* – on the factors regulating CO_2 assimilation in micropropagation systems, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.393, p.45-61, 1995.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. *Rev. Bras. Frutic.* [on line]. dez. 2002, vol.24, no.3 [citado 7 Agosto 2003], p.759-764. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S0100-29452002000300050&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0100-2945.

EICHHORN, S. E. Regulação do crescimento e do desenvolvimento: Os hormônio vegetais, **Biology of Plants**, Publishers Inc. Editora Guanabara Koogan S.A New York -York, ed. 5, v.5, 515p, 1994.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R de L. **6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira - preta (Rubus idaeus L.), cv. Tupy. *Cienc. Rural.*** [online]. set./out., vol.32, 2003 no.5 [citado 7 Agosto 2003], p.765-770. Disponívelna World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S0103-84782002000500005&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0103-8478

FIGUEIREDO, S.F.L.; ESQUIBEL, M.A. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis Barb. Rodr.* Brasília-DF, **Revista brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.2, p.63-68, 1991.

UFCG - BIBLIOTECA

GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S.; SILVA, J. R.e MACHADO, M.A. Cultura de tecidos e estaquia de maracujá **In: Anais do 3° Simpósio Nacional de Maracujá**, Vitória da Conquista, Editora Fundação Cargill,1998.

HAN, B.H.; JOUNG, H.Y.; KO, J.Y. *In vitro* propagation of Fícus benjamina by schoot tip culture. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v.38, n.3, p.315-319, 1997.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. **Handook of Plant Cell Culture**. New York: MacMillan,v.1,p.177-227, 1983.

HUSTADO, D.V.; MERINO, M.E. **Cultivo *In vitro* de tecidos vegetais**. Ed. Trillos, Mexico D.F. 1987.

KAMAT, M.G.; ERAO P.S. Vegetative multiplication of eggplants sokanum melongena using tessue techiniques. **Plant Sciense Lelters**. Limerick, v.13, p.57-65.1978.

KE, S.; SKIRUIN, R.M.; WCPHEETERS, K. D.; OTTER BNCNER, A.G.; GALEETA. D. *In vitro* germinotion and growth of Rubus seeds embrryon. **Hotisciense**, Alexandria. V.20,n.6 p.1047-1049, 1985.

KERBAURY, G. B.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. ed.2 Brasília: Embrapa SPI/Embrapa - CNPH, v. 2, p. 519 - 531, 2000.

KERBAUY, G.B.; HANDRO, W. Comparative growth of pith from haploid and diploid plants of Nicotiana tabacum. **Zeitshrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.79, p.455-458, 1986.

KEULENANS, J.; DEWITTE, K. Plant- regeneration from cotyledons and embryonic axes in applier - sites of reaction and effect of per culture in the light, **Euphytica**, Wagering, n. 77, v. 1-2, p.135-139, 1994.

KOCHBA, J. E.; SAFRAN, H. **Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. Planta**, p.237-245,1972.

LANE, W.D. Regeneration of pear plant from shoot meristem: tips. **Pant Science Letters**, Amsterdam, v. 16 p. 337-342, 1979.

LEONTIEV-ORLOV, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* e ameixas (*Prumunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.268-271, 2000.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v.62,p.271-276, 1988.

LOH, C.S.; RAO, A.N. Clonal propagation ofguava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitions shoot formations *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.39, p.31-39,1989.

LU, TIE-GRANG.; JIAN, HING-CHENG.; SUN, CHING-SAN. Current status of cryopreservation in China. In **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. Itália: International Plant Genetic Resources Institute, p.310-314, 2000.

MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. Thidiazuron induces high frequeney shoot regeration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*) chickpea (*Cicer arietnum*) and lentil (*Lens culinaris*). **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.19, n.6, p.731-740,1992.

MÁRCIA, W.S.; ALA, C.E.; LUCIANE, C.S. Indução de brotações em gema apical e axilar do porta-enxerto de macieira 'M-9' cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal, SP, v.25, n.2, p.361-362, 2003.

MARÍN, J.A.; GELLA, R. Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock 'Masto de Montañana' (*Prunus cerasus* L.), **Acta Horticulturae**, Leuven, v.212, p. 603-606, 1987.

MARÍN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L., **Annals of Botany**, London, v.62, p. 663-670, 1988.

MARTINELLI, L.; SCIENZA, A.; GIANAZZA, E.; VILA, P.L. Somatic embryogenesis from leaves and petioles of grapevine. **Act Horticulture**, Wagering, n. 289. p 243-244, 1985.

MOHAMED, Y.Y.; SPLITTSTOESSER, W. E.; LITZ, R. E. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflotrdcences. **Hortscience**, Virginia, v.28, n.10, p.1052, 1993

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarem**, Copenhagen, n. 15, p. 473 – 497, 1962.

NAIR, S.; GUPTA, P.K.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A.F. In vitro organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.3, p.29-40, 1984.

NAYAK, N.R.; RATH, S.P.; SATYANARAYAN, P. *In vitro* propagation of thee epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch and *Dendrobium* induced high frequeney shoot proliferation. **Scientia icuiturae.** Buch-4, p.243-250, 1997.

NICOLOSO, F.T.; GARLET, A.; ZANCHETTI, F.; SEBEM, E. **Micropropagação *in vitro* da Grápia (*Apuleia leiocarpa*).** Disponível na Internet: www.cnpt.embrapa.br/redbiobr/anais/redv96/res39.html-4K. Acesso em 30 de julho de 2003.

OVERBEEK, J.V. Regulação do crescimento e do desenvolvimento: Os hormônios vegetais, **Biology of plants** , Publishers Inc. Editora Guanabara Koogan S.A New York, v.5, 512p, 1941.

PERCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H. Protocolos para obtenção de Safrol. **Biotcnologia Ciências e Desenvolvimeto**, Brasília, v.3, n.15, p.18-23, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , Dordrecht, v.63,p133-141, 2000.

PINTO, J.E.B.P.; BARBOSA, M.H.P.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* do porta enxerto trifoliata com gemas axilares provenientes de árvore adulta. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Sociedade Brasileira de Fruticultura, Campinas-SP, v.9, 1989.

POSPÍSILOVÁ, J.; HAISEL, D.; SYNKOVA, H.; CATSKY, J.; WILHELMOVÁ, N.; PLZÁKOVÁ, S.; PROCHÁRKOVÁ, D.; SRÁMEK, F. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO_2 supply and abscisic acid, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.125-133, 2000.

,POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, **Biologia Plantarum**, Prague, v.42, n.4, p. 481-497, 1999.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) **Micropropagation**: technology and application. Kluwer: Dordrecht, p. 71-93. 1991.

RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del gênero *Prunus* para la Pampa Deprimida, **FYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.

REDDY, K.R.K.; RAO, G.P.; BAHADUR, B. *In vitro* morfhogenesis from seedling explants and callus cultures of castor (*Ricinus communis* L.). **Phytomorphology**, New Delhi – India, v. 37, n. 4, p. 337 – 340, 1991.

RICHARDS, K.W; SUPERT, E.A. In vitro ferilization and seed development in Trifolium. **In vitro**, v.16. p.925-935, 1980.

RUZIC, D.; ROSATI, P.; MARINO, G. Effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell'ibrido pesco x mandorlo GF677, **Rivista Ortoflorofruttícole Italiana**, Firenze, v.68, p.413-422 , 1984.

UFCG - BIBLIOTECA

SAEG-Sistema para **Análise estatística em genética**, Fundação Arthur Bernardes, UFU, MG, v.5.0, 1993.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival, **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.7, p. 153-156, 1993.

SELBY, C.; e HARVEY, B.M.R. **The influence of natural and in vitro bud flushing on adventitious bud production in Sitka apruce (Picea sitchensis (Bong) Carr.) bud and needle cultures.**The New Plytol, p. 549-562, 1985.

SHININGER, T.L. Hormone regulation of development in plant cells. ***In vitro***, v.14, p.31-50, 1978.

SILVA, L.C.; AMORIM NETO, M. da S.; BELTRÃO, N.E. de M. **Recomendações técnicas para o cultivo e época de plantio de mamoneira cv. BRS 149 (Nordestina) na micror-região de irecê, Bahia**. Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, p.6 (EMBRAPA-CNPA, Comunicado Técnico, 112) ,2000.

SUDARSONO.; GOLDY, R.G. Growth regulator and *in vitro* Vitis rotundifolia **Hortscience**, p.307, 1991.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot (Ricinus communis). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, n.6 p.566,1998.

SUTTER, E.G.; AHMADI,H.; LABAVITCH, J.M.; ALTMAN, A.; ZIV, M. direct regeneration of disks. **Acta Horticulturae** p.234, 1997.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. Oxford: Pergamon, 1985.

WATAD, A.A.; AHRONI, A.; ZUKER, A.; SHEJTMAN, H.; NISSIM, A.; VANINTEIN, Adventitious shoot formation from carnation stem procedures. **Scientia Horticulturae** v.65, n.4, p.313,1996.

WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.58, p. 231-238, 1983.

WHIGHT, M.; ANDERSON, W.C. Tissure culture propagation of red and black raspberries. *Rubus accidentals* and *Rubus idaues*. **Acta Hortacultural**, La Prata, v,7, p.13-20. 1980.

WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: The Jacques Chattel Press. 277p, 1963.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstock, and effect of antibiotics on proliferation, **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p.55-67, 1994.

YOO, E. H.; YOO, Y.K.; KIM, K. S. Induction of Hibiscus syriacus L. by suspension cultures.**Jounal** v.37, n.4, p.607-610,1996.

ZENKTELER, M. Intraovarían and *in vitro* pollination. Inter. **Rev. of Cyt**., v.11p.137-156, 1980.

Apêndices

FICHA TÉCNICA UTILIZADA NO TESTE DE GERMINAÇÃO – TG E DE VIGOR –V.

TESTE DE GERMINAÇÃO

Esp. Algodão Colorido (*Gossypium hirsutum* L.).

Cultivares: ( ) 6M-Mocó-Branco ( ) BRS-187-8H-Branco ( ) BRS-200-Marrom ( ) BRS-Verde

Períodos: ( ) 5 dias ( ) 30 dias ( ) 60 dias ( ) 90 dias

Temperaturas: ( ) Imersão em N_2L a -196°C ( ) Conservação em vapor de N_2L a -170°C

DATA: ____ / ____ / ____ - ____ / ____ / ____

Tamanho da amostra: 200 sementes

1. Repetições com 50 sementes em Papel Germiteste, no total de 4 repetições.

R = Z x 2 = Y

Z = Número de sementes;

Y = Número total em porcentagem;

Contagem de dias (4° e 12°dias)

Teste de germinação avaliação (4°dias)	Teste de germinação avaliação 12° dias
R.1 = ( ) x 2 = (%)	R.1 = ( ) x 2 = (%)
R.2 = ( ) x 2 = (%)	R.2 = ( ) x 2 = (%)
R.3 = ( ) x 2 = (%)	R.3 = ( ) x 2 = (%)
R.4 = ( ) x 2 = (%)	R.4 = ( ) x 2 = (%)
R total = (%)	R total = (%)

VIGORES

2. Comprimento de plântulas

R. 1 = (cm)	R. 2 = (cm)	R. 3 = (cm)
R. 4 = (cm)	R. 5 = (cm)	R. 6 = (cm)
R total = (cm)		

3. Peso da Matéria Seca

R. 1 = (g)	R. 3 = (g)
R. 2 = (g)	R. 4 = (g)
R. total = (g)	

PREPARAÇÃO DE MEIO

FICHA:1 DATA: 17/01/2004

ESPÉCIE: Algodão

MEIO: MS (Murashige e Skoog)

VOLUME FINAL:1.000

ETAPAS:

1ª

Solução	A	B	C	D	Fonte de carbono (g)	$MgCl_2$	
(mL)	100	1,0	10	10	35		

Nome e conc.desejada	Conc.Sol. Madre.	mL	Meio

3ªACRESCENTAR ÁGUA ATÉ O VOLUME FINAL

4ªpH :

5ªSOLIDIFICANTE: (g/l) , (g/l)

6ªDISSOLUÇÃO DO SOLIDIFICANTE: AUTOCLAVE. 10"

7ªDISTRIBUIR NOS TUBOS: 100

8ªESTERILIZAÇÃO: AUTOCLAVE-20"

PREPARAÇÃO DE MEIO

FICHA:2 DATA:
ESPÉCIE: Algodão colorido
EXPERIMENTO: Indução à orgonogênese
MEIO: MS
VOLUME FINAL:1.000 mL
ETAPAS: 2ª

1ª

Solução	A	B	C	D	Fonte de carbono (g)	$MgCl_2$	
(ml)	100	1,0	10	10	35	10	

REGULADORES DE CRESCIMENTO: CITOCININAS (BAP, KIN e TDZ)

2ª

Nome e conc.desejada	Conc.Sol. Madre.	mL	Meio

3ªACRESCENTAR ÁGUA ATÉ O VOLUME FINAL
4ªph:
5ªSOLIDIFICANTE: (g/l) , (g/l)
6ªDISSOLUÇÃO DO SOLIDIFICANTE: AUTOCLAVE. 10"
7ªDISTRIBUIR NOS TUBOS:
8ªESTERILIZAÇÃO: AUTOCLAVE-20"

Tabela .2:
Data: 23/02/2004
Ensaio: Indução da organogênese
Avaliação: Superbrotamento

MEIO CULT.	Nº TUBOS	EV*	PR*	B/E*	TMB*

*Explante vivo (EV); *Proliferação (PR); Nº de brotos/explante (B/E); Tamanho do maior broto (TMB).